

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：2 2 5 9 1 5 9 3

研究課題名（和文）

脳梗塞に対する間葉系幹細胞移植におけるガングリオシドの神経再生への関与

研究課題名（英文）

The role of gangliosides for neuroregeneration in ischemic stroke

研究代表者

三上 毅 (MIKAMI TAKESHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：3 0 3 7 2 8 1 6

研究成果の概要（和文）：脳梗塞巣と正常脳における糖脂質の違いを検討するため、糖脂質をアセトン抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で検出したところ検出感度が不十分であったため、マイクロアレイを用いて解析した。この結果、脳梗塞巣では正常脳と比較して phosphodiesterase 10A(PDE10A)の活性が高いことが判明した。この結果に基づき、免疫組織学的な解析を行ったところ、PDE10A が神経再生に関与することを示唆する結果が得られたため、今後、更に詳細な研究を行う予定である。

研究成果の概要（英文）： High performance liquid chromatography (HPLC) was performed to detect the difference of glycolipid between the normal and the infarcted brains, however, the sensitivity was not enough to detect the differences. The microarray analysis indicated that the expression of phosphodiesterase 10A (PDE10A) was high in the infarcted brain compared to the normal brain. We performed immunohistochemical analysis with anti-PDE10A antibody. The results indicated that the PDE10A is associated with neural regeneration. Thus, we will perform further studies for neuroregeneration with these results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳神経疾患、糖脂質、ガングリオシド、脳虚血、神経再生

1. 研究開始当初の背景

本研究は、脳梗塞に対する細胞療法における神経再生のメカニズムの解明であり、全く新しい治療概念を探るものである。

近年、脳梗塞に対する細胞療法が注目されており、現在までの知見では、ラット脳梗塞モデルに間葉系幹細胞を移植した場合、良好な治療効果が得られている。また、functional MRI (fMRI)を用いた検討では、細胞移植後の脳皮質の可塑性が機能回復と密接に関与することが示唆されていた。現在のところ、細胞移植による治療メカニズムは、①サイトカインによる神経栄養作用、②血管新生、③神経再生、が強く関与していることは判明しているが、特に神経ネットワークの再構築における生化学的メカニズムは、ほとんど解明されていない。

ガングリオシドはセラミドから合成され、細胞膜表面の脂質ラフトに集中して存在し、細胞のシグナル伝達に関与する免疫学的に重要な役割を果たしている糖脂質である。なかでも GD3 などの b-series のガングリオシドは神経再生に関与しているといわれ、GD3 合成酵素ノックアウトマウスで神経再生度の明らかな低下を認めている。具体的には、b-series のガングリオシドは神経突起の伸展を促進することにより、神経再生に重要な役割を果たしているといわれており、細胞治療のメカニズムとして有力である。ガングリオシドは脳や皮膚において含有量が多く、われわれの研究成果でも、その生合成は胎生期に活性が強いことが判明している（研究業績参照）。なかでも GM3 はラット胎児の脳において、速やかに b-series のガングリオシドに変換され、神経の再生に関与することが推測されている。

2. 研究の目的

本研究では、GD3 などの b-series のガングリオシドが、脳梗塞に対する細胞療法における神経再生において、再生促進に関与している可能性を検証するとともに、細胞治療の治療効果を向上させるターゲット分子となりうるかどうか併せて検討することを主目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞巣におけるガングリオシドの発現を解析した。具体的には、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを作成後、梗塞部位を摘出し、アセトン抽出にてガングリオシドを抽出。カラムクロマトグラフィーを用いて分離後、ガスクロマトグラフィーと HPLC にてガングリオシドを同定した。各々のガングリオシドは必要に応じて、NMR spectroscopy にて成

分解解析を行った。

(2) 中大脳動脈永久閉塞モデルを作成後、梗塞部位を摘出し、マイクロアレイ解析を行った。HPLC 解析で、脳梗塞巣において優位な差のあった脂質を解析した。さらに、脳梗塞巣と正常脳の差が 5 倍以上の変化のみられたものを抽出した。

(3) 中大脳動脈永久閉塞モデルを作成後、梗塞部位を摘出し、phosphodiesterase 10A(PDE10A)の抗体を用いて脳梗塞を染色した。また、脳梗塞モデルに間葉系骨髄幹細胞移植を移植し、梗塞部位における PDE10A の発現を比較解析した。

4. 研究成果

(1) まず、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを作成後、梗塞部位を動物実験用 MRI で確認した（図 1）。

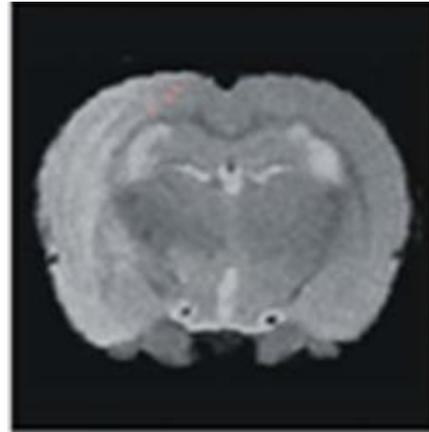


図 1：ラット中大脳動脈永久閉塞モデルの MRI 画像（T2WI）。

この静止画像に、動的・機能的画像である fMRI 画像をスーパーインポーズすると、体性運動感覚野に fMRI シグナル一致することが判明した（図 2）。

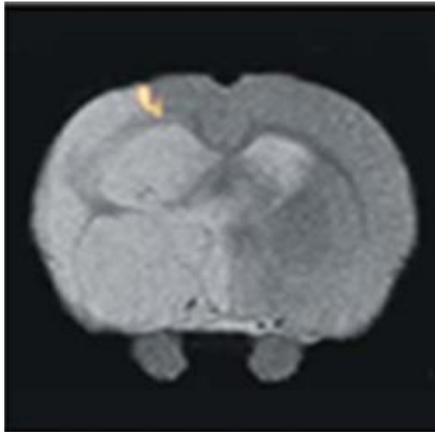


図2：通常のMRI(T2WI)画像にfMRI信号を重ね合わせた画像。

このfMRIの信号は、行動学的な回復と相関して、時間経過とともに次第に強く検出されることが確認された(図3)。

さらには、間葉系骨髄幹細胞移植を移植することで、fMRIの信号も、行動学的な回復も増強されることが判明した(図3、4)。

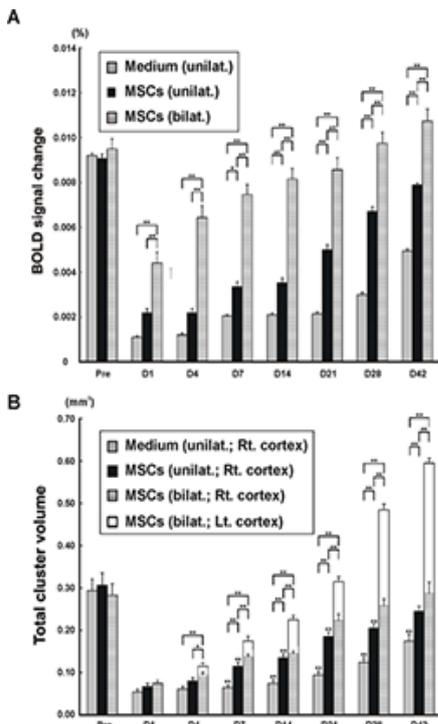


図3：fMRI信号を定量化し、経時的に表示した。

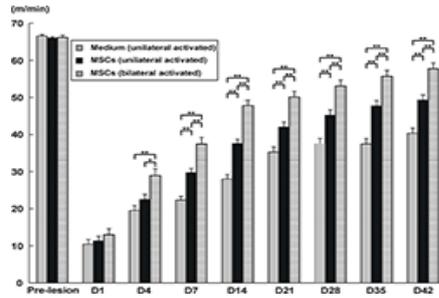


図4：トレッドミルテストによる行動学的解析の結果。

以上より、ラット脳での機能的な回復を画像診断学的に確認することに成功した(Suzuki et al., 2013)。これらのことを総合的に考察すると、fMRI信号が増強する脳組織で神経再生機転が起きていると推測された。

以上の結果に基づき、まず、正常脳と脳梗塞巣から、カラムクロマトグラフィーに分離後にHPLCを用いて脳梗塞巣と正常脳との糖脂質の違いを検出した。その結果、優位差を持った糖脂質の検出は認められなかった。

抽出量やラットの週数などを変えても同様の結果であり、この原因として、手法として検出感度が低いと考え、より検出感度の高い次の実験を計画した。

(2) 中大脳動脈永久閉塞モデルの脳梗塞部位と正常脳から脳組織を摘出し、発現している遺伝子をマイクロアレイで解析を行った。その結果、マイクロアレイの結果においても脳梗塞巣において優位に発現が変化していると認められる糖脂質は見られなかった。

Rat	Affymetrix	Code Link (Filgen)	Agilent			
商品名	Rat Genome 230 2.0 Array	Whole genome Bioarray	SurePrint G3 Rat GE マイクロアレイキット	Whole Rat Genome#1 DNA マイクロアレイキット Ver3.0	Whole Rat Genome#2 DNA マイクロアレイキット	
全プローブ数(コントロール含む)	31,099	33,849	30,461	30,461	41,022	
アプリケーション情報より抽出したプローブ数	glycolipid	10	7	9	12	
	lipid+glycolipid	815	607	709	709	785
割合	glycolipid	0.02%	0.02%	0.02	0.02	0.03
	lipid+glycolipid	2.60%	1.80%	2.30%	2.30%	1.90%

表1 DNAアレイ 糖脂質の占める割合

そこで、脳梗塞巣のマイクロアレイで正常脳よりも5倍以上の変化のみられたものを全て抽出すると、PDE10Aの発現が最も著しかった(図5、6)。PDE10Aはシグナル伝達に重要な役割をもっているといわれている酵素である。

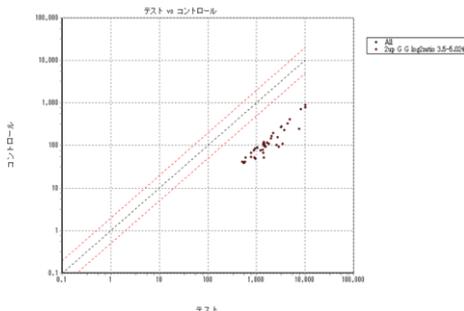


図 5 : DNA アレイの結果のサマリー。

Gene name	net
phosphodiesterase 10A	0.202228
phosphodiesterase 10A	0.237405
Purkinje cell protein 4	0.319961
phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	0.32188
synaptoporin	0.350564

Gene name	net
Cd68 molecule	5.0247
glycoprotein (transmembrane) nmb	4.991189
lectin, galactoside-binding, soluble, 3	4.962077
Fc receptor-like S, scavenger receptor	4.797811
Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor	4.678258

表 2 : DNA アレイの結果

(3) 上記結果を受けて、PDE10A の抗体を用いてラット脳梗塞を染色すると、脳梗塞巣で明らかに染色性が変化することが観察され、細胞移植によって正常組織における染色性に近づくことも示唆された。

PDE10A は、虚血の病態生理ばかりでなく、幹細胞移植による神経再生や、内因性の神経再生にも関与することが推測され、今後の更なる検討が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Suzuki J, Sasaki M, Harada K, Bando M, Kataoka Y, Onodera R, Mikami T, Wanibuchi M, Mikuni N, Kocsis JD, Honmou O, Bilateral cortical hyperactivity detected by fMRI associates with improved motor function following intravenous infusion of mesenchymal stem cells in a rat stroke model, Brain Res, 査読有, 1497C, 2013, 15-22
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.12.028
2.05.010

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 毅 (MIKAMI TAKESHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30372816