

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300133

研究課題名(和文)新規脳傷害モデル「光傷害」における脳組織再生とネスチン陽性活性化アストロサイト

研究課題名(英文)Cortical regeneration and nestin-expressing reactive astrocyte in a novel closed-head injury model "photo-injury mouse"

研究代表者

森田 光洋(Morita, Mitsuhiro)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50297602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,900,000円

研究成果の概要(和文)：独自に開発した脳傷害モデル「光傷害マウス」は顕著な脳組織再生を示す。この再生部位には神経幹細胞マーカーであるネスチンを発現する活性化アストロサイトが集積することが見出された。この細胞の増殖を促進または抑制することにより、組織再生が促進または抑制されたことから、ネスチン陽性活性化アストロサイトは脳組織再生に主要な役割を果たすことが明らかとなった。また、この細胞は損傷の回復過程においてほとんどが除去されることが明らかとなった。これらのことから、ネスチン陽性活性化アストロサイトの増加と除去が脳組織の創傷治癒過程の重要な要因であり、診断と治療の有望なターゲットであることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel brain injury model designated "photo-injury", which shows substantial cortical tissue regeneration. Further histological analysis showed a robust accumulation of nestin-expressing reactive astrocyte in the regenerating region. Since the genetic modification of the accumulation of the reactive astrocyte caused significant alteration of cortical regeneration, these cells were indicated to play a pivotal role in regeneration. Meanwhile, the majority of the reactive astrocyte was ablated during wound healing in our fate mapping study. These results suggest the nestin-expressing reactive astrocyte is one of the determinant of the process brain lesion and a potent diagnostic as well as therapeutic target of brain injury.

研究分野：神経科学

キーワード：脳傷害 組織再生 活性化アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 脳傷害研究

頭部外傷や脳梗塞といった脳傷害は世界的に重要な医療課題である。転倒、交通事故、スポーツ事故、戦闘などに起因する頭部の外傷は、成人男性が身体障害に陥る最大の原因であり、米国における社会経済的損失は 7.2 兆円に及ぶ。一方、高齢化社会に伴い、脳梗塞は増加の傾向にあり、米国では死因の第 3 位、医療費は 6.9 兆円に及ぶ。これら脳傷害患者の回復と社会復帰を促進することは、介護負担など、社会的な意義が大きい。

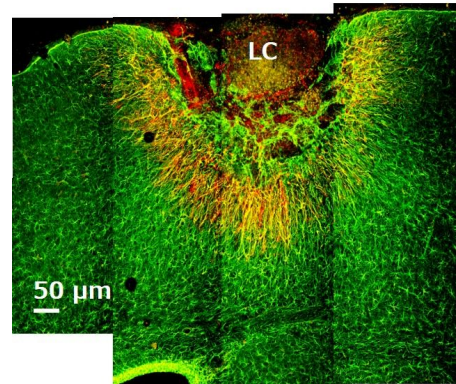
### (2) 活性化アストロサイト研究

主要なグリア細胞の一つであるアストロサイトの肥大化、増殖、GFAP の発現増加などに象徴される活性化は、脳傷害に伴う最も顕著な病変のひとつである。しかし、「活性化アストロサイトが、損傷を悪化させるか、それとも回復に寄与するか？」は、未だに解決していない。申請者のこれまでの研究が示すように、アストロサイトの活性化状態が複数存在する (Morita et al, J Neurosci 2003; Morita et al, Glia 2007)。しかし、実際の病態における活性化アストロサイトの多様性については不明な点が多く残されている。

### (3) 動物モデル開発

脳傷害の病態に活性化アストロサイトが果たす役割を明らかにするためには、モデル動物を用いた研究が不可欠である。しかし、既存のモデルは必ずしもこの目的に適さない。げっ歯類の脳は小さいため、頭蓋に直接与えた衝撃は、容易に脳幹にダメージを与え、生存を脅かす。そこで、従来モデルでは、頭蓋の除去し、脳の実質に局限した衝撃を加えて傷害を作成する。しかし、この頭蓋の除去が、それ自体アストロサイトを活性化することが、研究計画段階で明らかとなった (Wu et al, Nat Neurosci 2006)。このため、従来モデルにおける活性化アストロサイトは、人為的な影響を大きく受けており、研究に適さない。こういった背景から、申請者はニューメキシコ大学脳外科において NIH の助成を受け、ヒト閉鎖性頭部外傷 (closed-head injury) のモデルとして、光傷害マウスを開発した。このモデルでは、頭蓋の一部を薄く削り、光の透過性を高め、顕微鏡の対物レンズを介して大脳皮質の一部に強い光を照射することにより脳傷害を作製される。頭蓋を削ることは、人為的なアストロサイト活性化を引き起こさない。また、光傷害マウスはヒト脳挫傷と類似した病態、すなわち遅延性の出血とこれに引き続く組織変性を再現す。さらに、この人為的アストロサイト活性化を伴わない局所性脳傷害モデルでは、下図に示すように、神経幹細胞のマーカーであるネスチンを発現する活性化アストロサイト (Nestin-expressing reactive astrocyte、以下 NRA) が損傷中心 (Lesion core; LC) の周辺部位に集積し、この領域が顕著な組織再生と、神経細胞の再配列を示す。

Nestin/GFAP



### (4) 脳組織再生研究

脳組織の再生は、MRI などにより、臨床的に確認されているが、これを再現する動物モデルは存在しなかった。光傷害マウスは再現性良く脳組織再生を示す初めてのモデルであり、再生のメカニズムを解明し、新しい脳傷害の診断・治療方法の開発を実現可能にする実験系として研究開始当初、期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は「光損傷モデルにおける NRA は、傷害後の脳組織再生と神経回路の再構築を促進する」という仮説を立て、光傷害マウスを脳組織再生のモデルとして確立し、NRA がこの分野における主要な研究ターゲットであることを立証することを目標とし、以下の計画 1 - 4 を行うことを目指した。

計画 1 . 「NRA は組織再生に必要なか？」; 損傷部位を覆う NRA が、組織再生に与える影響を検討する。ネスチン遺伝子のプロモーターを用いた NRA 選択的な遺伝子操作により、この細胞の集積を抑制または促進し、組織再生に与える影響を決定する。NRA の集積に関連して組織再生が変化すれば、この細胞が組織再生に主要な役割を担っていることが立証される。

計画 2 . 「再生過程における NRA の運命は？」; 神経幹細胞のマーカーを発現する NRA は、再生過程において多分化能を示すと考えられる。この可能性を検討するために、ネスチンプロモーターを用いて NRA を不可逆的に GFP 標識し、細胞種マーカー染色を用いて、再生後の分化状態を決定する。結果として、NRA の (1) 神経細胞など、アストロサイト以外の細胞への分化、(2) 活性化状態から正常アストロサイトへの分化、(3) 再生部分からの消滅、などが考えられる。この検討により NRA が再生後に果たす役割が明らかになる。

計画 3 . 「再生部位において、神経回路は再構築されるか？」; 再生部位における神経細胞の再配列と、機能回復の関係を明らかにするため、神経回路を組織学的および電気生理学的に解析する。神経線維の再構築、シナプス伝達の再生などが予想される一方、顕著な

組織再生を示す光傷害は、過剰なシナプス形成に伴う癲癇を発症する可能性も考えられる。臨床的にみられる、頭部外傷に伴う癲癇を再現する動物モデルは今のところ無い。このため、癲癇が発症した場合、光傷害は、臨床研究に有用なモデルとして、再発見される。計画4「炎症は NRA の発生と組織再生を抑制するか?」; 申請者の研究は、炎症性サイトカインが成長因子(EGF と bFGF)によるアストロサイトの活性化を抑制することを示している (Morita et al, J Neurosci 2003; Morita et al, Glia 2007)。一方、これらの成長因子は、神経幹細胞の維持に必要であり、ネスチンの発現を上昇させる。このことから、NRA は成長因子によるアストロサイトの活性化状態であり、炎症によって抑制されると予想される。これが正しければ、光傷害における顕著な組織再生は、頭蓋の除去に伴う炎症が抑えられていることに起因すると考えられる。また、臨床的に見られる、傷害後の回復のばらつきは、炎症のレベルに起因し、炎症のコントロールが脳損傷の機能回復を制御する手段として有効であることが示唆される。この可能性を検討するため、炎症誘発物質を投与した動物に光傷害を作成し、NRA の発生と組織再生を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 光傷害の作成; 光傷害の作成方法とその病態については論文として発表した。イソフラレン麻酔下のマウスを用い、体性感覚野に相当する部分の頭蓋(直径約 0.5 cm の領域)を電動ドリルおよび歯科用ナイフを用いて 20 - 30  $\mu\text{m}$  の厚さに削る。この部分を顕微鏡の対物レンズ下に置き、脳内の血管構造が見えることを確認した後、頭蓋から約 300  $\mu\text{m}$  下に焦点を合わせ、90W ハロゲンランプの光を 2.5 分間照射する。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた NRA 集積の抑制または促進; STAT3 遺伝子はアストロサイトの活性化に必須であることが知られている。ネスチンプロモーターにより Cre リコンビナーゼを発現させ、ネスチン陽性細胞選択的に STAT3 遺伝子を相同組み換えにより破壊すれば NRA の集積を抑制することができると考えられる。一方、SOCS3 遺伝子は STAT3 の活性化を抑制するため、同様にこの遺伝子を破壊した場合、NRA の集積は促進すると考えられる。本研究では Nes-Cre;STAT3<sup>fl/fl</sup> または Nes-Cre;SOCS3<sup>fl/fl</sup> マウスに光傷害を作成し、アストロサイトの活性化と組織再生を解析する。なお、脊髄損傷モデルにおいて、これらのマウスは NRA の集積と回復に影響を与えることが示されている (Okada et al, Nature Medicine 2006)。

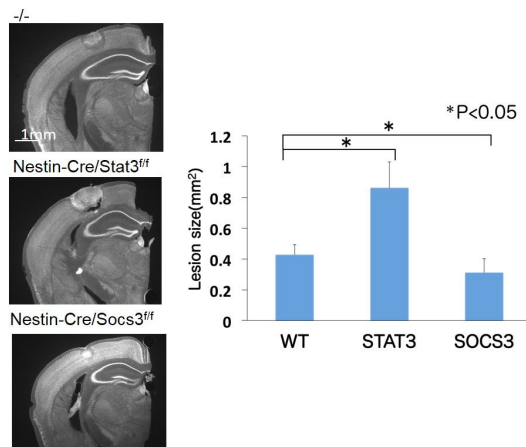
(3) 遺伝子改変マウスを用いた NRA の運命決定; 上記の Nes-Cre、またはタモキシフェン投与によって活性を誘導することができる Nes-CreERT2 により、ネスチン陽性細胞選択的に GFP を発現するマウス

(Nes-Cre:CAG-CAT<sup>fl/fl</sup>-GFP) に光傷害を作成し、NRA を不可逆的に GFP 標識する。この動物を、細胞種マーカーで染色し、再生過程における NRA の運命決定を行う。

(4) 再生部位における神経細胞の標識; 光傷害マウスから急性またはホルマリン固定スライス標本を作製し、微小電極を用いた電流注入により、組織再生部位の神経細胞に色素を注入し、形態を評価する。

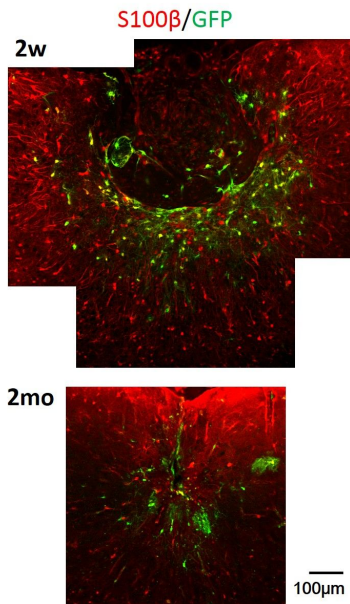
### 4. 研究成果

(1) 脳組織再生における NRA の必要性  
光傷害マウスの脳組織再生における NRA の必要性を決定するために、ネスチン陽性選択的な STAT3 または SOCS3 遺伝子の破壊を行った。その結果、下図に示すように STAT3 遺伝子の破壊に伴い損傷が拡大した一方、SOCS3 遺伝子の破壊は損傷を縮小させた。これらのマウスを組織学的に解析した結果、STAT3 遺伝子の破壊は NRA を減させるとともに、損傷周辺部位の神経突起を減少させた。これに対して SOCS3 遺伝子の破壊は NRA と神経突起を増加させた。これらの結果から、NRA は組織再生と、再生部位における神経突起の保護・再生に必須であることが示唆された。



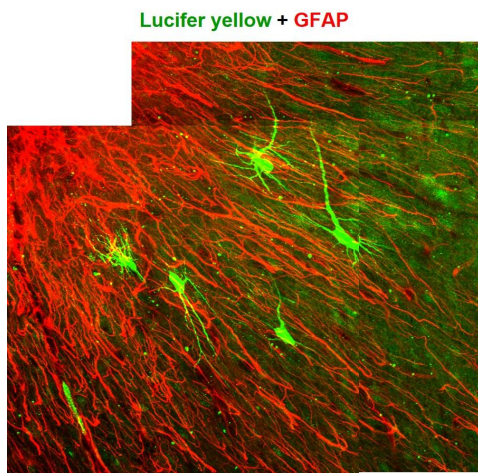
### (2) NRA の運命決定

ネスチン陽性細胞選択的に GFP を発現する遺伝子改変マウスを用いて、NRA の運命決定を行った。その結果、下図に示すように傷害 2 週間で損傷周辺部位に集積したネスチン陽性細胞は、傷害 2 ヶ月において 1/10 に減少することが明らかとなった。また、GFP 陽性細胞は TUNEL 陰性であったことから、NRA の減少はアポトーシスによらないことが明らかとなった。傷害 2 ヶ月後の GFP 陽性細胞には神経細胞などのマーカーを発現しているものが見られたが、これらの一部は SVZ の神経肝細胞が進入してきたものである可能性がある。以上の結果から大部分の NRA は組織再生の後に除去されることが明らかとなった。



(3) 再生部位における神経細胞

再生部位における神経細胞にルシファーイエローなどの色素を注入し、形態学的に評価した。下図に示すように、神経細胞の突起が NRA と平行して走行することが明らかとなった。このことから、NRA の突起は神経回路再生の足場となることが示唆された。再生部位の神経活動は、強く抑制されている蛍光が見られた。



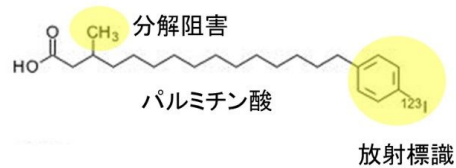
(4) 炎症が NRA と脳組織再生に与える影響  
光傷害マウスに LPS を投与することにより、炎症が NRA と脳組織再生に与える影響を検討した。その結果、NRA の集積には影響が見られなかったが、CD68 を指標としたミクログリアの活性化が亢進するとともに、損傷が収縮することが明らかとなった。この結果から、炎症は NRA による組織再生には影響を与えない一方で、ミクログリアの貪食を促進することにより、損傷部位の除去が加速され、結果として回復が促進されることが示唆された。

(5) NRA を指標とした脳組織再生の診断方法開発

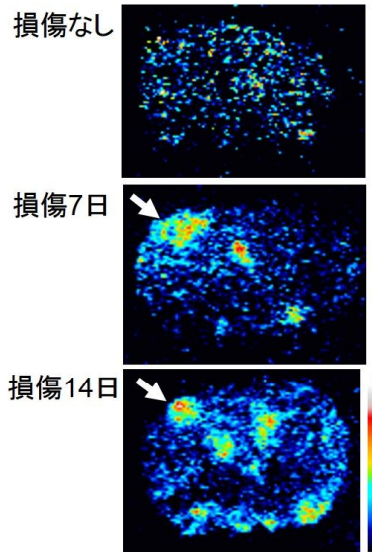
この研究を進める過程で、NRA の検出が脳組織再生の診断に有用であることが示唆され、実用面の重要性が製薬企業と臨床医から多

く指摘された。こういった事情から、NRA を検出する方法を検討したところ、活性化アストロサイトにおける脂肪酸代謝の亢進を利用して NRA を検出することが可能であると予想された。脂肪酸標識化合物を放射性診断薬として販売しているニホンメジフィジクス(株)の提案で、脂肪酸の一種であるパルミチン酸を基本骨格とした BMIPP (カルディオダイン) をテストしたところ、下図に示すように、オートラジオグラフィと SPECT を用いた画像化において、光傷害マウスの損傷部位に、顕著な集積が見られた。この結果を特許として取得するとともに、実用化の検討を進めている。

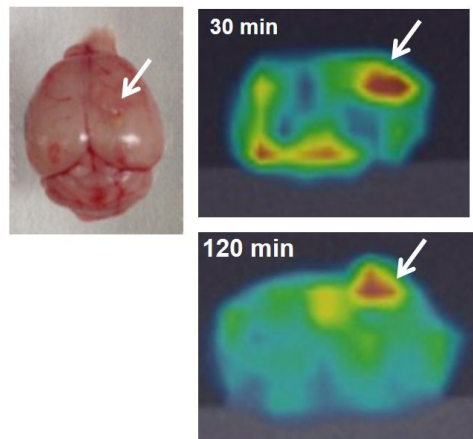
BMIPP (カルディオダイン)



BMIPP / ARG



SPECT / ex vivo



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7件)

Takaichi, R., Odagaki, S., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., and Maekawa, S. Inhibitory effect of NAP-22 on the phosphatase activity of synaptojanin-1. J Neurosci Res 90, 21-27 (2011) 査読有

Suzuki T, Sakata H, Kato C, Connor JA, and Morita M. Astrocyte activation and wound healing in intact-skull mouse after focal brain injury. Eur J Neurosci. 36 (12), 3653-3664 (2012) 査読有

Maimaitiyiming, M., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., and Maekawa, S. Structures of septin filaments prepared from rat brain and expressed in bacteria. Protein expression and purification 87, 67-71 (2013) 査読有

Maimaitiyiming, M., Kobayashi, Y., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., and Maekawa, S. Identification of dynamin as a septin-binding protein. Neurosci Lett, 534:322-6 (2013) 査読有

Maekawa, M., Kobayashi, Y., Odagaki, S., Makino, M., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., Hayashi, F., Interaction of NAP-22 with brain glutamic acid decarboxylase (GAD), Neurosci Lett, 537, 50-4 (2013) 査読有

Furube, E. Morita, M. Miyata, S., Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse, Cell & Tissue Research (2015) in press 査読有

Kobayashi, Y., Ronan da Silva, Kumanogoh, H., Miyata, S., Sato, C., Kitajima, K., Nakamura, S., Morita, M., Hayashi, F., Maekawa, S., Ganglioside contained in the NAP-22 fraction prepared from the detergent-resistant membrane microdomain of rat brain inhibits the phosphatase activity of calcineurin. J Neurosci Res (2015) in press 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Morita, M., Perilesional nestin-expressing reactive astrocytes and cortical tissue recovery in a novel closed-head injury model, photo injury (2011) 10th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Prague, Czech Republic)

Morita, M. and Yamashiro, K., Monitoring adenosine level in rat hippocampal slice by adenosine sensor

cell (2012) Neuroscience 2012, Nagoya (日本神経科学会、名古屋)

Morita, M. and Yamashiro, K., Adenosine release in rat hippocampal slice measured by a novel adenosine sensor cell (2012) The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting for the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe (第11回アジア・太平洋神経化学会 / 第55回日本神経化学会 合同大会 神戸)

Morita, M. and Yamashiro, K., Monitoring adenosine level in rat hippocampal slice by adenosine sensor cell (2012) Society for Neuroscience, Abstract 47.11, New Orleans

Morita, M. and Yamashiro, K. The evoked increase of extracellular adenosine in rat hippocampus CA1 region depends on L-type Ca<sup>2+</sup> channel.(2013) Neuro2013, Kyoto (日本神経科学会 京都)

Fujii, Y. Yamashiro, K. and Morita, M. Two adenosine release mechanisms in rat hippocampus Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜 ポスター)

Watanabe, A and Morita, M., STAT3 signaling in perilesional nestin-expressing reactive astrocyte is required for cortical recovery after closed-head injury. Neuroscience 2014 (日本神経科学会 横浜 ポスター)

Morita, M. and Watanabe, A. STAT3 Signaling in Perilesional Nestin-Expressing Reactive Astrocyte is Required for Cortical Recovery after Closed-Head Injury. (2014) Society for Neurosci, Washington DC, Poster Abstract 522.16

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：ネスチン陽性活性化アストロサイトの放射性イメージング剤  
発明者：森田光洋、岩井久美子  
権利者：神戸大学

種類：特許  
番号：特許公開 2015-086195  
出願年月日：平成 25 年 10 月 31 日  
取得年月日：平成 27 年 5 月 7 日  
国内外の別： 国内

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森田 光洋 (MORITA, Mitsuhiro)  
神戸大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：50297602

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：60160694

前川 昌平 (MAEKAWA, Shohei)  
神戸大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：40173695