

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791609

研究課題名（和文） 正常型プリオン蛋白に注目した脳梗塞に対する神経再生医療

研究課題名（英文） Neurorestorative therapy for Stroke based on PrP^c protein

研究代表者

石坂 俊輔（ISHIZAKA SHUNSUKE）

長崎大学・大学病院・研究協力員

研究者番号：10597363

研究成果の概要（和文）：

PrPc 過剰発現マウスは脳梗塞に対する障害が軽度であることが示唆され、strain は異なるものの、PrPc による脳保護効果が考えられた。脳梗塞・脳血管性認知症においては髄液中の total プリオン蛋白が減少するという仮説ではあったが、結果としては脳梗塞・脳血管性認知症においては髄液中の total プリオン蛋白は維持される。しかしながらヒトプリオン病における髄液中のプリオン蛋白の減少していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Our study clearly suggests that PrPc plays an important role against stroke. Although, the effect depends on the rodent strain, PrPc could provide neuro-protective or neuro-restrative effect and enhance functional recovery after stroke. In terms of the PrPc protein, total PrPc protein is preserved in stroke or vascular dementia and significantly reduced total PrPc protein in cerebrospinal fluid in Prion disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：stroke, PrP^c, neuroprotection

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞は神経学的障害を遺し、QOL の低下や介護・経済的負担など多くの問題を伴う疾患である。しかし後遺症に対してはリハビリテーション以外に抜本的な治療法がなく、新たな治療法の開発は急務となっている。そこで注目を集めているのが再生医療である。しかし脳の生理機能、構造は非常に複雑であり、他の臓器より再生医療を現実化するためのハードルは高い。

(2) 我々はこれまで再生医療のソースとして期待されている神経幹細胞の研究を行い、

虚血後に神経幹細胞が領域特異性、時期特異性を持つことを報告した(Horie et al, FEBS Lett. 2004)。更に脳梗塞モデル動物に対しヒト神経幹細胞移植を行い、内在性修復機構の変化につき検討した。特に①angiogenesis, ② axonal sprouting, ③ dendritic plasticity に着目し、神経幹細胞移植が脳梗塞後の内在性修復機構をどのように修飾し functional recovery に寄与しているか解析した (Horie et. al, Stem cells 2011, Andres and Horie et al. Brain 2011)。その研究過程において、移植細胞の生着率がわずか数%と低いことが治療効果の発揮されない因子であることが判明した。特に、梗塞巣にお

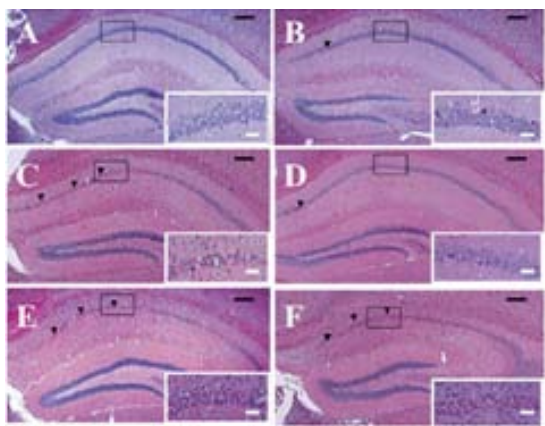
る炎症反応が移植細胞の遊走、生着、さらには個体の functional recovery に影響していることが示された。また、脳内の炎症反応には制御性T細胞などの免疫系細胞、またサイトカイン、ケモカインが深く関わるのが近年、報告されている (Liez A et al, Nat Med. 2009)。

2. 研究の目的

(1) そこで申請者は、炎症反応などのホスト脳内環境を制御する更なる因子の同定が必要であると考え、当大学感染分子学教室との共同研究を計画した。

脳虚血に対する細胞移植療法の効果をより高めるには、脳梗塞後の炎症反応をコントロールし移植細胞の生存に適した環境を作ることが重要である。PrPc は脳内に広く存在する蛋白であるが、特異的構造ゆえ解析が難しく生理機能は不明であった。しかし近年の神経保護作用、免疫賦活作用、アポトーシス関連の細胞内シグナル伝達への関与が報告され、Alzheimer 病等の神経変性疾患との関わりも明らかとなってきた。脳梗塞に関してはマウス脳梗塞モデルにおいて PrPc が神経保護的に働く事が報告されている (McLennan et al. A J Neuropatholo. 2004)。

(2) 申請者は移植細胞の生着に影響を与える factor として、PrPc に着目した。共同研究者である長崎大学大学院感染分子解析学のグループは、独自に開発した PrPc ノックアウトマウス (Ngsk Prnp0/0) における神経細胞死を報告し、プリオン蛋白類似蛋白 (ドッペル) が細胞死に関わることを発見した (Sakaguchi et al. Nature 1996)。そして PrPc ノックアウトマウス (Ngsk Prnp0/0) を用いた一過性脳虚血モデルの海馬における神経細胞死が促進されることを報告した (Yamashita et al. Cell Mol Neurobiol, 2005)。



(3) これは PrPc の脳虚血に対する保護作用を示すものであるが、メカニズムの解明には

至っていない。また、使用モデルが一過性全脳虚血による学習障害モデルであるため、脳卒中臨床に近い局所脳虚血 (中大脳動脈閉塞) モデルでの追加実験が必要である。海外から中大脳動脈閉塞モデルで PrPc の神経保護効果を示す報告が数例あるが、神経保護メカニズムの解明は不十分であり、更に脳梗塞に対する細胞移植研究で PrPc に着目したものはない。脳梗塞に対する PrPc の神経保護作用のメカニズムを解明することは、脳梗塞の病態理解、ひいては神経再生医療の実現に重要であると考えられる。

(3) 脳梗塞における神経再生医療、細胞治療の報告は数多く存在するが、PrPc と移植細胞の interaction に注目した研究はほぼ皆無であり、その点で独創的である。

また臨床と基礎共同によるトランスレショナルリサーチであるため、臨床応用の可能性を常に模索できる。PrPc ノックアウトマウス (Ngsk Prnp0/0) は感染分子学教室が独自に開発したものであるため基礎データが蓄積されており、他の追従を許さない。

予想される結果として、PrPc は脳虚血後の炎症反応、アポトーシスなど重要な細胞内シグナルに関与している可能性が高い。よって細胞移植の効果にも大きな影響を与えていると考える。過去1報のみ、in vitro の検討で、神経細胞内で CXCR4 (白血球の遊走シグナルに関わる受容体) と PrPc の共発現が細胞移植によって誘導され、神経再生を促進しているという報告があり、我々の研究においても PrPc の神経再生効果を証明できると考えている。PrPc の細胞移植における生理機能、リコンビナント PrPc の治療効果が明らかになれば、移植効果を促進する脳内環境制御に関する新たな知見となり、神経再生医療の実現に近づく。更に、不明であった PrPc の生理機能の一部でも明らかになれば、他のプリオン関連神経変性疾患 (Creutzfeldt-Jakob 病、Alzheimer 病など) の病態解明についての貴重なデータとなる。

3. 研究の方法

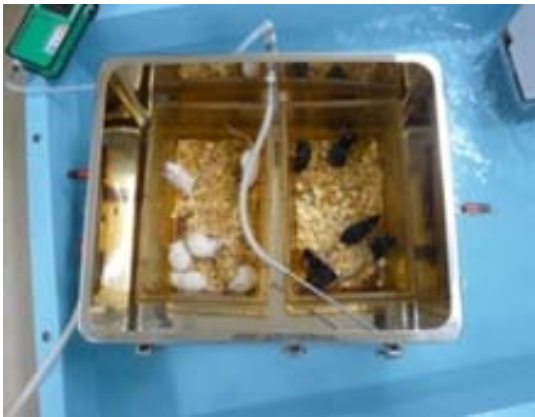
(1) 野生型マウスと PrPc ノックアウトマウスの中大脳動脈閉塞モデルに対して細胞移植を行い、以下の項目について比較検討する。

- ① 脳梗塞サイズ、脳循環代謝、functional recovery
- ② 脳梗塞における細胞内シグナル蛋白の発現
- ③ 細胞移植時の移植細胞の生着、遊走、分化、神経再生効果
- ④ 脳梗塞に対するリコンビナント PrPc の治療効果
- ⑤ ヒト脳梗塞・脳血管性認知症患者における

髄液中の total prion protein の検討

4. 研究成果

低酸素脳虚血モデルを作成すべく、低酸素チャンバーを作成。装置内の酸素濃度を 8% に一定すべく酸素流量を調整した。マウスに対しては、アイソフルレンを用いた全身麻酔下に両側総頸動脈を永久結紮した。すべての手術が完了し、1 時間経過した後に低酸素チャンバーにて低酸素負荷を行った。行動学的解析には cylinder test を、また組織学的解析には TTC 染色を行い mitochondria dysfunction の評価を行った。



(1) BL6 mouse vs. Tg20 mouse (PrPc 過剰発現)。30 分低酸素負荷. n=5

cylinder test	R	L	both	R+both	L+both	R+both/L+both	
B6 #1		5	9	6	11	15	0.73
#2		1	9	2	3	11	0.27
#3		2	11	7	9	18	0.5
Tg20 #1		6	5	9	15	14	1.07
#2		8	1	11	19	12	1.58
#3							
#4		3	2	15	18	17	1.06

Cylinder test では BL6 mouse に比べ Tg20 mouse は有意に行動学的障害が軽度であった。梗塞サイズについても BL6 mouse に比べて Tg20 はサイズが小さい傾向であった。しかしながら、梗塞を呈さないものも多く見られ、低酸素負荷が短いことが示唆された。

(2) BL6 mouse vs. FVB mouse (Tg20 と同じ strain)。60 分低酸素負荷. n=5

cylinder test	R	L	both	R+both	L+both	R+both/L+both	
FVB #34		9	3	8	17	11	1.55
#36							
#37		4	1	5	9	6	1.5
#38		6	5	9	15	14	1.07
#39		7	10	3	10	13	0.77
B6 #40		4	1	5	9	6	1.5
#41		1	5	4	5	9	0.56
#42		2	7	1	3	8	0.38
#43		5	3	2	7	5	1.4
#44		2	4	4	6	8	0.75
#45							

BL6 mouse に比べて FVB mouse は有意差はないものの行動学的障害が軽度である傾向であった。梗塞サイズについても同様であり、BL6 mouse に比べて梗塞サイズが有意に小さかった。

【FVB】



【BL6】

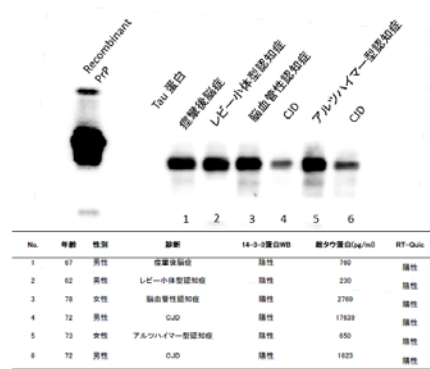


→以上より、PrPc 過剰発現マウスは脳梗塞に対する障害が軽度であることが示唆され、strain は異なるものの、PrPc による脳保護効果が考えられた。

(3) 脳梗塞・脳血管性認知症患者の髄液中の total prion protein の検討

脳梗塞や脳血管性認知症においてプリオン蛋白が利用されているのであれば、脳内のプリオン蛋白や髄液中の total prion protein が減少している可能性を考えた。

ヒトプリオン病患者と脳梗塞・脳血管性認知症患者と健常者における髄液中の total prion protein について検討を行った。



我々の仮説では脳梗塞・脳血管性認知症においては髄液中の total プリオン蛋白が減少するという仮説ではあったが、結果としては脳梗塞・脳血管性認知症においては髄液中の total プリオン蛋白は維持される。しかしながらヒトプリオン病における髄液中のプリオン蛋白の減少していることが明らかにな

った。今回の目的からは外れるが、多数例での検討が必要ではあるが、プリオン病の新たなバイオマーカーとなる可能性が示された。

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) Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke.
Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I.
Stroke. 2013 Mar;44(3):720-6

[学会発表] (計6件)

- (1) 平成23年11月22日 第8回九州山口脳循環代謝フォーラム 福岡
脳梗塞に対する幹細胞動注療法における投与時期の相違 石坂俊輔 堀江信貴 佐藤克也 西田教之 永田泉
- (2) 平成24年2月1-3日 International Stroke Conference, Poster presentation, New Orleans, USA
Timing of intra-arterial cell transplantation drastically affects the behavior of the transplanted cells and functional recovery after stroke.
Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Nishida N, Nagata I
- (3) 平成24年3月13日
第14回長崎障害者支援再生医療研究会、ポンペ会館
ラット脳梗塞モデルに対するヒト間葉系幹細胞の経動脈的移植～移植時期が細胞の挙動、治療効果に及ぼす影響について～ 石坂俊輔、堀江信貴、佐藤克也、西田教行、永田泉
- (4) 平成24年4月26日
第37回日本脳卒中学会総会 シンポジウム 脳卒中最先端の基礎研究から、福岡脳梗塞に対するヒト骨髄間質細胞の経動脈的移植の可能性 ～移植時期が細胞の挙動、治療効果に及ぼす影響～ 石坂俊輔、堀江信貴、佐藤克也、西田教行、永田泉
- (5) 平成24年11月8日
第24回日本脳循環代謝学会、広島
ラット脳梗塞に対するヒト骨髄間葉系幹細胞の経動脈的移植 ～移植タイミングが治療メカニズムに及ぼす影響～

石坂俊輔、堀江信貴、佐藤克也、西田教行、永田泉

- (6) 平成25年2月7日 International Stroke Conference, Oral presentation, Honolulu, USA
Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Nishida N, Nagata I

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石坂 俊輔 (ISHIZAKA SHUNSUKE)
長崎大学・大学病院・研究協力員
研究者番号：10597363