

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501009

研究課題名(和文) 緑茶が及ぼす脳外傷局所に出現する神経幹細胞の成熟、分化への影響に関する研究

研究課題名(英文) (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury

研究代表者

佐藤 隆夫 (SATOU, Takao)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70162443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エピガロカテキンガレート(EGCG)は緑茶に含まれる抗酸化作用を有する物質である。EGCG 飲水による脳外傷後の神経幹細胞の出現・分化について調べた。EGCGは0.1%水溶液としてラットに与えた(EGCG群)。対照群は通常水を用いた(water群)。EGCG群ではwater群に比較し神経細胞数及び神経幹細胞数が多数であった。water群では神経細胞や神経幹細胞にアポトーシスを認めたがEGCG群ではほとんど認めなかった。EGCG群での神経幹細胞は神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化を認めた。EGCG飲水は脳外傷後の神経細胞・神経幹細胞の生存・維持に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：A major component of green tea is (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), which has strong antioxidant properties. we investigated the effect of EGCG on neural stem cell (NSC) proliferation following traumatic brain injury (TBI). Male Wistar rats that had access to normal drinking water, or water containing 0.1% (w/v) EGCG, ad libitum. Immunohistochemistry revealed that the number of nestin-positive cells after TBI in the EGCG group increased significantly. The number of single-stranded DNA (ssDNA)-positive cells after TBI significantly decreased in the EGCG group. Almost all ssDNA-positive cells in the water group co-localized with NeuN and nestin-staining. Spheres could only be isolated in the water group at 3 days. In the EGCG group, spheres could be isolated at all days following TBI. Spheres differentiated into neurons and glia. These results indicate that EGCG inhibits degradation of NSCs, which have the potential to differentiate into neurons and glia following TBI.

研究分野：神経病理学

キーワード：脳外傷 神経再生 カテキン 緑茶飲料 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

日本では交通事故や不慮の事故による脳外傷による死亡や神経障害の後遺症を有する患者が激増している。このように脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、脳外傷後の脳障害や神経障害の軽減を目指す臨床的アプローチの開発は非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

緑茶カテキン(エピガロカテキンガレート、EGCG)による脳外傷後における大脳の外傷局所の神経再生との関連を組織学的、生化学的および運動学的手法を用いて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)群分け

EGCG群; Wistar ラット()6週齢を用いて飲料水の代わりに0.1%EGCG溶液を与えて10週齢まで飼育し、10週齢で脳外傷を受傷させ、さらにラットを屠殺するまで0.1%EGCGを自由摂取させた。

water群; 飲料水のみを自由摂取させ脳外傷受傷後も屠殺まで飲料水を自由摂取させたラットを用いた。

(2) モデル動物の作製

Pneumatic control injury deviceを用いてWistar ラット(10週齢)に脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。

(3)免疫組織染色

損傷後1、3、及7日後にwater群及びEGCG群のラットを4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、脳を取り出し、損傷最大径の部分より20µmの連続切片を作製した。連続切片3枚ずつをnestin, ssDNA抗体で免疫染色し、損傷周囲に発現しているそれぞれの陽性細胞数を対物20倍の顕微鏡下で計数した。

(4)nestin又はNeuNとssDNAに関する二重染色

損傷後3日のEGCG群及びwater群の切片を用いてnestin又はNeuNとssDNAの蛍光二重染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察及び写真撮影を行い、EGCG群及びwater群の評価を行った。

(5)神経幹細胞の単離

損傷後1、3、7日に非運動群及び運動群のラット脳の損傷部位を中心に径2mmの大きさで大脳皮質部分のみを実体顕微鏡下で取り出し、神経幹細胞の培養培地にて大脳皮質をピペティングにより分散させた。分散させた細胞を1脳当たりオルニチンおよびフィブロネクチン処理した培養皿(径6cm)一枚に蒔き、5%CO₂下にて3日間培養した。培養4日目に培養皿に接着した細胞を回収し、無処理培養皿に再び細胞を蒔き、上記培地にて

10-14日培養し、sphereを得た。培養皿一枚ずつ当たりのsphereの数を測定した。さらに細胞の分化を調べるためにsphereをオルニチン処理した丸形カバーガラスが入った24wellの培養プレートにて4日間培養した。

(6) 培養細胞の免疫染色

分離されたsphereが神経幹細胞であるか調べるために分化誘導実験を行った。sphereを上記カバーガラス上にて分化誘導用培地を用いて培養を行い、培養4日後に細胞を固定し、幼弱な神経細胞のマーカ-; Tuj1, アストログリア細胞のマーカ-; GFAP, オリゴデンドログリア細胞のマーカ-; O4抗体を用いて免疫染色を行い、神経細胞やグリア細胞への分化を確認した。

4. 研究成果

(1)nestin及びssDNA陽性細胞数の変化

損傷後1、3、7日においてEGCG群ではwater群に比較して大型の細胞質を有するnestin陽性細胞が多数存在した(図1)。また7日後ではwater群では損傷周囲にnestin陽性の突起を多数認められたが、EGCG群では見られなかった(図1)。nestin陽性細胞数はwater群に比較し、EGCG群で有意に増加した(P<0.01, 図1)。また損傷後1、3、7日においてssDNA陽性細胞数はEGCG群に比較しwater群で有意に増加していた(P<0.05, 図2)。

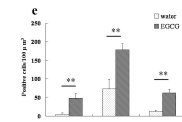
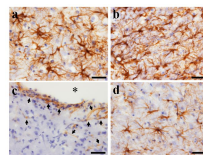


図-1. nestin の発現

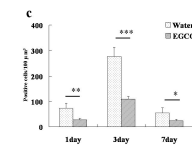
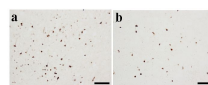


図-2. ssDNA の発現

(2) nestin又はNeuNとssDNAに関する二重染色

脳外傷後の損傷周囲組織によるnestin又はNeuN及びssDNAの蛍光二重染色像を図-3に示した。

損傷後3日ではEGCG群及びwater群でNeuN陽性細胞が認められたがwater群ではNeuN陽性細胞のほとんどがssDNA陽性を示した。さらにEGCG群に比較し、water群で多くの

nestin 陽性細胞が ssDNA 陽性を示した。

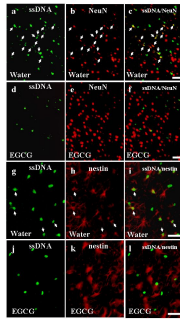


図-3. Nestin 又は NeuN 及び ssDNA 蛍光二重染色

(3) 神経幹細胞の分離

損傷周囲組織から損傷後1日では water 群で neurosphere の分離はできなかつた。しかしながら ECGC 群では分離できた ($P < 0.05$, 図4)。損傷後3日では water 群及び ECGC 群の組織から neurosphere の分離ができ、その数は water 群に比較して ECGC 群の損傷周囲組織から得られた neurosphere の数が有意に多く分離できた ($P < 0.01$, 図4)。しかしながら、損傷後7日では water 群からは neurosphere の分離はできなかつたが ECGC 群の組織からは分離できた。さらに、その neurosphere はほとんどが nestin に陽性を示した ($P < 0.05$, 図4)。

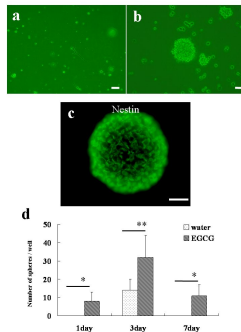


図-4. neurosphere の分離

(4) 神経幹細胞の分化誘導

分離された neurosphere は神経細胞、アストログリア細胞及びオリゴデンドログリア細胞へ分化した(図5)。

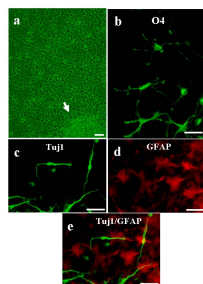


図-5. 神経幹細胞の神経細胞及びグリア細胞への分化

(5) 考察

ラット脳外傷モデルでは water 群及び ECGC

群で損傷後1日より7日まで nestin の陽性細胞が認められ、nestin 陽性細胞数が損傷後3日で最大になった。この結果は以前我々の報告した結果と一致した[11,12]。さらに Changjong Moon ら[14]が行った cryoinjury では大脳皮質の損傷周囲で nestin 陽性細胞が損傷後24時間から増加し始め4日まで増加し、次いで減少することを報告している。さらに A.G.Douen ら[4]が行った ablation injury 実験では nestin の陽性細胞は大脳皮質の損傷周囲で損傷後3日で最大になることを報告している。また S.Chen ら[2]による CCI モデル実験でも損傷後24時間から7日で nestin 陽性像が見られ4日で陽性数が最大になることを報告している。これらのことから損傷周囲では損傷後3,4日後に nestin の発現のピークをむかえると考えられた。

我々の研究グループは、water 群に比較し ECGC 投与群で 8-OHdG、4-HNE 陽性細胞数や MDA 量の有意な減少が見られた。脳障害後に発生する O₂-や-OH などのフリーラジカルにより組織中の不飽和脂肪酸から MDA が産生され、その産生された MDA 測定は細胞や組織の酸化ストレスの指標になることを報告した[7]。さらに我々の最近の報告において脳外傷により発生したフリーラジカルにより脳内の 8-OHdG、4-HNE 陽性細胞数が有意に増加することや MDA 量や過酸化脂質量が有意に増加することを報告した[10,12]。これらのことから脳外傷モデルにおいて ECGC が脳外傷後に発生するフリーラジカルの産生抑制や吸収を行うことにより、8-OHdG および 4-HNE 陽性細胞数の減少や MDA 量の有意な減少が認められたものと考えられた。このことは ECGC が脳外傷後に外傷局所で発生するフリーラジカルの除去に有効に作用することを報告した[7]。

脳外傷後早期に損傷部位周で発現しているアポトーシスのマーカーである ssDNA 陽性細胞数が ECGC 群で water 群に比較して有意に減少した。さらに ssDNA と NeuN 二重染色陽性細胞数が water 群に比較し、減少していた。加えて、損傷後7日で ECGC 群は water 群に比較し NeuN 陽性細胞が有意に増加していた。Sugawara et al [16]は脳虚血3日後に海馬 CA1 の神経細胞やグリア細胞のミトコンドリアが活性化されフリーラジカルが産生され、さらに活性化されたミトコンドリアからのシトクロムC放出によりカスプー3の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告している[16]。脳虚血後の ECGC の投与は海馬や大脳皮質神経細胞やグリア細胞質内のミトコンドリアでのフリーラジカルの産生を抑制し、カスプー3の活性化を有意に阻害することにより神経細胞死を抑制することが知られている[16]。

一方、Bcl-2 は O₂-の産生抑制、シトクロムCの放出抑制やカスプー3依存性アポトーシスカスケード抑制をすることによりアンチアポトーシス因子として知られている[6]。

Bcl-2の過剰発現はBcl-2 ノックアウトマウスの虚血実験から神経保護作用を有することが報告されている[5,13]。ECGCはBcl-2の発現を有意に増加させ、アポトーシスを誘導するBaxの発現を抑制し、神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを減少させ、神経保護作用を有することが報告された[6]。これらのことからECGCが損傷後に発生したフリーラジカルによる神経細胞のアポトーシスを阻害することにより、ECGC群で神経細胞数が増加したと考えられた。本実験においてもECGCは脳外傷後の神経細胞死に対し神経保護作用を有することが示された。さらに神経幹細胞の障害が軽減され、nestin陽性細胞が増加したかも知れない。

損傷後1日、3日、7日の損傷周囲の大脳皮質部分のみを実体顕微鏡下で分離しnestin陽性細胞の単離を試みた。また、1、7日ではwater群ではsphereの単離ができなかったが1、3、7日後でECGC群ではnestin陽性のsphereを単離することが出来た。さらにsphere数においてECGC群では有意な増加が見られた。

脳組織損傷周囲におけるECGC群ではnestin陽性細胞の増加及びssDNA陽性細胞数の減少が認められた。しかしながらwater群ではssDNA陽性細胞の増加が認められた。これはECGCが脳外傷後に損傷周囲組織におけるnestin陽性細胞に含まれる神経幹細胞の増殖能を高めていると考えられた。

water群とECGC群で単離されたsphereの免疫染色ではsphere全体的にnestin陽性を示しTuj1、Vimentinには陰性であった。本実験で得られたsphereの培養液よりbFGFおよびEGFを取り除き、更に4日後の免疫染色でTuj1とGFAPの陽性細胞が認められた。さらにO4陽性細胞が認められた。我々は損傷早期の損傷周囲組織からneurosphereが得られ、神経細胞やグリア細胞への分化能を有することを報告した[8]。このことから本実験で単離培養されたsphereはneurosphereであり神経細胞とグリア細胞への分化をすることが確認された。

神経幹細胞の由来に関して、損傷後、周囲のアストロサイトが反応性に幼若化しnestinを持つ神経前駆体となり新しい神経細胞に分化するということが報告されている[8]。さらに我々はラット培養型アストロサイトがbFGF存在下で幼若化しnestin陽性神経幹細胞へと変化し、神経細胞やグリア細胞へ分化することを報告した[9]。またSVZやSEZに存在する神経幹細胞が障害部位にmigrationするという報告も見られる[1,3,15]。しかしながら現在の所、脳外傷後に出現するnestin陽性細胞の起源はSVZやSEZから神経幹細胞が移動してきたのかアストロサイトが反応性に幼若化しnestin陽性細胞が増加したのかは明確ではない。本実験でも明らかではなく今後の実験課題である。

(9)まとめ

本実験において、ECGC群は脳外傷後に発生するO₂-やOHなどのフリーラジカルの産生抑制や直接的にラジカル吸収を行う。さらにECGC群は脳外傷後のフリーラジカルによる神経細胞及び神経幹細胞のアポトーシスを抑制することにより神経保護作用及び神経幹細胞の生存・分化・維持に関与することが示された。以上のことから脳外傷後に出現する脳機能不全を改善させると考えられた。緑茶飲料は脳外傷の治療に有効なであることが示された。

(10)参考文献

1. Bernal GM, Peterson DA (2004) Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair. *Aging Cell* 3: 345-351
2. Chen S, Pickard JD, Harris NG (2003) Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 182: 87-102
3. Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Kuhn HG (2004) Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77: 155-165
4. Douen AG, Dong L, Vanance S et al (2004) Regulation of nestin expression after cortical ablation in adult rat brain. *Brain Res* 1008: 139-146
5. Hata R, Gillardon F, Michaelidis TM, Hossmann KA (1999) Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis* 14: 117-124
6. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C et al (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336
7. Itoh T, Imano M, Nishida S et al (2011) Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. *J Neural Transm* 118: 193-202
8. Itoh T, Satou T, Hashimoto S, Ito H (2005) Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after TBI. *Neuroreport* 16:

1687-1691

9. Itoh T, Satou T, Nishida S et al (2006)
Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells. *Neurochem Res* 31: 1381-1387
10. Itoh T, Satou T, Nishida S et al (2009)
Expression of amyloid precursor protein after rat traumatic brain injury. *Neurol Res* 31: 103-109
11. Itoh T, Satou T, Nishida S et al (2009) The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury. *Neurotox Res* 16: 378-389
12. Itoh T, Satou T, Nishida S et al (2010)
Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res* 35: 348-355
13. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK et al (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13: 1017-1030
14. Moon C, Ahn M, Kim S et al (2004)
Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res* 1028: 238-242
15. Properzi F, Carulli D, Asher RA et al (2005)
Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur J Neurosci* 21: 378-390
16. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N et al (2004) Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 1: 17-25

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 5 件)

Itoh T, Tabuchi M, Mizuguchi N, Imano M, Tsubaki M, Nishida S, Hashimoto S, Matsuo K, Nakayama T, Ito A, Munakata H, Satou T, Neuroprotective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in rats when administered pre- or post-traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, 120 巻, 2013, 877-890, DOI: 10.1007/s00702-012-0918-4

Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Increased apoptotic neuronal cell death and cerebral dysfunction after traumatic brain injury in aged rats, *Brain Struct Func*, 査読有, 218 巻, 2013, 209-220, DOI: 10.1007/s00429-012-0394-5

Imano M, Itoh T, Satou T, Yasuda A, Nishiki K, Kato H, Shiraishi O, Peng YF, Shinkai M, Tsubaki M, Yasuda T, Imamoto H, Nishida S, Takeyama Y, Furukawa H, Okuno K, Shiozaki H, High expression of epithelial cellular adhesion molecule in peritoneal metastasis of gastric cancer, *Target Oncol*, 査読有, 8 巻, 2013, 231-235, DOI: 10.1007/s11523-012-0239-4

Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Nakayama T, Mizuguchi N, Yamanaka S, Tabuchi M, Munakata H, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Appearance of neural stem cells around the damaged area following traumatic brain injury in aged rats, *J Neural Transm*, 査読有, 120 巻, 2013, 361-374, DOI: 10.1007/s00702-012-0895-7

Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, 119 巻, 2012, 877-890, DOI: 10.1007/s00702-011-0764-9

[学会発表] (計 5 件)

佐藤隆夫、伊藤龍生、エピガロカテキンの実験的脳外傷後に出現する神経幹細胞への影響, 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24日発表, 広島国際会議場, 広島市

伊藤龍生、佐藤隆夫、脳外傷後の緑茶飲料による神経保護作用の検討, 第103回日本病理学会総会, 2014年4月24日発表, 広島国際会議場, 広島市

伊藤龍生、佐藤隆夫、緑茶飲料による脳外傷後の神経保護作用及び脳機能の改善効果の検討, 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6日発表, ロイトン札幌・さ

つぼろ文芸会館，札幌市

伊藤龍生、佐藤隆夫，緑茶飲料による脳外傷後の脳機能の改善効果の検討，第 67 回日本栄養・食糧学会大会，2013 年 5 月 11 日発表，名古屋大学（東山キャンパス），名古屋市

伊藤龍生、佐藤隆夫，脳外傷後の緑茶飲料による神経細胞保護作用の検討，第 66 回日本栄養・食糧学会大会，2012 年 5 月 18 日発表，東北大学（川内北キャンパス）・東北大学百周年記念会館（川内萩ホール），仙台市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/patho/gyouseki2009.htm>

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 隆夫 (TAKAO, Satou)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70162443

(2)研究分担者

伊藤 龍生 (TATSUKI, Itoh)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40330245

井上 敬夫 (TAKAO, Inoue)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：441006

(3)連携研究者

()

研究者番号：