

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462410

研究課題名(和文) 周術期低酸素虚血後の脳白質傷害の発生機序解明と再生療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of brain white matter injury caused by perioperative hypoxic ischemia and the development of regeneration therapy

研究代表者

加古 英介 (KAKO, Eisuke)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70464576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児の周術期における脳白質傷害は頻度が高いが、治療法はない。まず、新生児マウスを用いた脳白質傷害モデルを作成した。幼弱脳では、脳虚血によりオリゴデンドロサイト前駆体細胞(oligodendrocyte progenitor cell: OPC)が、虚血部位に移動するが、分化しないことがわかった。そこで、分化促進因子としてアシアロエリスロポイエチン(EPO)を採用した。培養細胞と脳白質傷害モデルにおいて、EPOによりOPCのオリゴデンドロサイトへの分化が促進した。脳虚血による白質傷害の治療法として、自己再生能の活性化によるOPC移動とEPOによる分化促進は、臨床応用の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Brain white matter injury in the perioperative period of childhood has a high frequency is no cure. First, we create a brain white matter injury model using a newborn mouse. The immature brain, oligodendrocyte progenitor cells (OPC) moved to the ischemic site by cerebral ischemia, but were found not to differentiate. Therefore, we adopted the asialo-erythropoietin (EPO) as a promoting factor of differentiation. In cultured cells and brain white matter injury model, differentiation from the OPC to oligodendrocytes has been promoted by the EPO. As a treatment for white matter injury by cerebral ischemia, the moving of endogenous OPC and promoting differentiation by and EPO has a possibility of clinical application.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：再生医療 白質傷害 小児 周術期

1. 研究開始当初の背景

周術期中枢神経傷害は、麻酔科医が最も注意すべき合併症のひとつである。意識や運動機能が大きく低下するような脳傷害だけでなく、高次脳機能障害を代表とする高度な脳機能の傷害が問題となっている。このような高次脳機能障害は、退院できても完全なる社会復帰を妨げ、大きな社会的損失となるが、一方で有効な治療法がほとんどないのが、研究開始当ても現在も現状である。

周術期脳傷害の発症機序は、大きな機能傷害の場合は脳細胞への酸素・エネルギー供給不全が多くを占める。一方、前述したような部分的な機能障害の場合、その機序として特異的な脳細胞の傷害が注目されている。特にオリゴデンドロサイトの低酸素への脆弱性と白質傷害が関与するとの報告が近年増加してきている。その代表例として、小児の心臓手術の周術期において高率に脳室付近の白質に傷害をきたしているとの報告がある (Lin R J Thorac Cardiovasc Surg 2007、Ishibashi N et al. Circulation 2012)。この病態は未熟児に多い脳室周囲白質軟化症と同じであり、患児に不可逆的で重篤な脳障害を残し、長く残る児の人生に与える影響は計り知れない。この病態の標的となる白質は、主にオリゴデンドロサイトとミエリン (髄鞘) によって構成される。オリゴデンドロサイトは、神経細胞の軸索周囲へ巻き付きミエリンを構成することによって、跳躍伝導とよばれる神経情報伝達速度の飛躍的な向上を果たし、さらには軸索を絶縁することによって神経細胞の異常発火を防いでいる。また、白質は哺乳類においてはヒトで最も発達しており、高度に発達した白質こそが人類の高度な脳機能を支えているとされているが、神経細胞ほど研究が進んでおらず、傷害された白質に対する治療法は、研究開始当ても現在も確立していない。

一方近年、脳にも再生能力があることが明らかとなってきている。脳室を取り囲む脳室下帯と呼ばれる部位には、胎生期のみならず、成人した後も神経細胞やオリゴデンドロサイトへ分化できる神経幹細胞があり、様々な傷害後に神経幹細胞から新生細胞が産生され、傷害部を修復するように移動していくことを申請者らのグループが報告してきている (Kako E et al. Stem Cells 2012)。申請者らは、白質傷害が発症した場合、傷害の本体であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞が新生され、傷害された白質へ移動することも明らかにしている (Kako E et al. Stem Cells 2012)。このことから脳には傷害後に失われた細胞を新生し再生する潜在的自己再生能力があるといえる。ES細胞やiPS細胞は、再生医療への応用が期待されるが、癌化などの問題が残っている。それに対して体内に存在する神経幹細胞を再生医療に応用できれば、より安全性が高い可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、オリゴデンドロサイトに注目して脳白質傷害の発症機序を解明し、新たな治療法の開発を目指した。治療法として、体内にある神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化させる再生医療の開発を目指した。アシアロエリスロポイエチン(AEPO)を含め、さらなる分化促進薬物を探索し、臨床応用を視野に入れて検討を行った。

次の4点を本研究の目標とした。

マウス脳白質傷害モデルの確立

脳白質傷害における自己再生機構の解明

培養細胞系を用いたオリゴデンドロサイト分化促進物質の発見

マウス脳白質傷害モデルにおけるオリゴデンドロサイト分化促進薬剤の効果

3. 研究の方法

(1) マウス脳白質傷害モデルの作成

小児モデルは、新生児マウスの片側総頸動脈を焼灼後、低酸素チャンバー（現有）に置くことで作成した。

(2) 脳白質傷害の発生機序と自己再生機構の調査

(1)のモデルを用い、オリゴデンドロサイトのアポトーシスをいくつかのアポトーシスマーカーにより経時的に調査することにより、白質傷害の発生機序を検討した。また、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化の状況の評価するため、オリゴデンドロサイトだけが光る遺伝子改変マウス(オリゴデンドロサイトのマーカーOlig2 が CFP で発光)を用いて(1)のモデルを作成し、脳白質傷害後のオリゴデンドロサイト前駆細胞を組織学的に検討した。

(3) 培養細胞系を用いたオリゴデンドロサイト分化促進物質のスクリーニング

マウスの脳より分離した培養オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いてスクリーニングを行った。細胞を分化させる可能性のある物質（AEPO、甲状腺ホルモン、上皮成長因子、インスリン用成長因子1 など）を投与し、組織学的・生化学的手法により分化を促進する候補物質の探索を行った。

(4) マウス脳白質傷害モデルにおけるオリゴデンドロサイト分化促進物質の効果の確認

(3)で候補となった分化促進物質を(1)で確立したマウス脳白質傷害モデルに投与し、その効果をミエリンのマーカー（ミエリン塩基性タンパク質）や増殖マーカー（BrdU）により組織学的手法により確認した。分化促進物質は血管内投与、腹腔内投与、脳室内投与など数種類を試みた。また、分化促進物質による副作用の確認も行った。

4. 研究成果

(1) マウス脳白質傷害モデル

生後5日目の新生児マウスを用いて安定したモデルが作成できた。本モデルは、白質におけるミエリン形成が極度に低下することを確認した。

成体マウスにも同様に白質傷害を発症させる条件を検討したが、安定した傷害を与える条件を確定できなかった。

(2) 脳白質傷害の発生機序と自己再生機構の調査

低酸素によりオリゴデンドロサイト前駆細胞（Oligodendrocyte Progenitor Cells: OPC）の産生が一旦低下し、ミエリンの形成が低下することが、白質傷害の原因の一旦であることが明らかとなった。一方で、低酸素により OPC の産生が脳室下帯において細胞新生が増加することが明らかとなった。増加した細胞は OPC であり、さらには白質への移動が増加することも確認できた。

(Fig. 1)

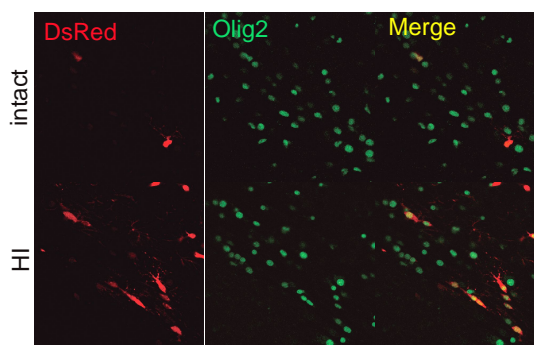


Fig.1 脳室下帯から白質への OPC の移動

脳室下帯に存在した細胞は DsRED により染色されている。OPC は Olig2 で染色される。低酸素による虚血で、白質における黄色に染まる細胞が増加している。つまり、脳室下帯で新生された OPC が白質へ移動している数が増加することがわかる。

しかしながら、白質へ移動した細胞はオリゴデンドロサイトへ分化が進まないことが

明らかとなった。そこで、OPC からオリゴデンドロサイトへの分化を促進する物質を検索することとした。

(3) 培養細胞系を用いたオリゴデンドロサイト分化促進物質のスクリーニング

マウスの脳より分離した培養オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いてスクリーニングを行った。細胞を分化させる可能性のある物質 (AEPO、甲状腺ホルモン、上皮成長因子、インスリン用成長因子 1 など) を投与し、組織学的手法により分化を促進する候補物質の探索を行った。

その結果、AEPO に強力な OPC の分化促進作用があることが明らかとなった。

(4) マウス脳白質傷害モデルにおけるオリゴデンドロサイト分化促進物質の効果の確認

培養 OPC に AEPO を作用させたところ、CNRase 陽性のオリゴデンドロサイトが増加することがわかった (Fig. 2)。

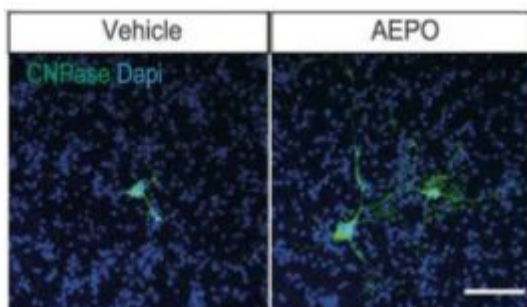


Fig.2 培養オリゴデンドロサイトのアシアロエリスロポイエンチンによる分化
CNRase 陽性の細胞はオリゴデンドロサイトであり、AEPO を作用させると OPC から分化することがわかる。

また、マウス脳白質傷害モデルにおいても AEPO の腹腔内投与により、白質における OPC のオリゴデンドロサイトへの分化が有意に増加していた。これらの作用はエリスロポイエンチン受容体の siRNA によるノックダウンにより、その効果が減弱したことから、AEPO の効果であることが確認できた。なお、AEPO による造血等の副作用はなかった。

今後、臨床においても応用できる可能性が示唆される研究結果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ota H, Hikita T, Sawada M, Nishioka T, Matsumoto M, Komura M, Ohno A, Kamiya Y, Miyamoto T, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K: Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmp-mediated local inactivation of RhoA. *Nat Commun.* 2014; 5: 4532.

doi: 10.1038/ncomms5532.

査読あり

Ota H, Hikita T, Nishioka T, Matsumoto M, Ito J, Asai N, Enomoto A, Takahashi M, Kaibuchi K, Sobue K, Sawamoto K: Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 442: 16-21.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.126.

査読あり

Kaneko N, Kako E, Sawamoto K: Enhancement of ventricular-subventricular zone-derived neurogenesis and oligodendrogenesis by erythropoietin and its derivatives. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 235.

doi: 10.3389/fncel.2013.00235.

査読なし

藤掛数馬、匹田貴夫、祖父江和哉、澤本和延: 脳梗塞後の修復メカニズムと細胞治療 脳修復過程における内在性神経前駆細胞の移動. *脳循環代謝* 2013; 24: 102-6.

査読なし

〔学会発表〕(計 4 件)

田村哲也、太田晴子、藤田義人、祖父江和哉: エリスロポエチン (EPO) による脳保護効果とミクログリアの活性. 第 18 回日本神経麻酔集中治療学会 2014 年 4 月 18 日 沖縄県自治会館 (沖縄県・那覇市)

藤掛数馬、匹田貴夫、祖父江和哉、澤本和延: 阻害剤ライブラリーを用いた新生ニューロン移動機構の解明. 日本麻

酔科学会第 61 回学術集会 2014 年 5 月 15 日-17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

田村哲也、青山峰芳、藤田義人、仲野実輝、浅井清文、祖父江和哉：エリスロポエチン投与によるミクログリアを介した脳保護効果。日本麻酔科学会第 61 回学術集会 2014 年 5 月 15 日-17 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

田村哲也、青山峰芳、小宮良輔、富田麻衣子、藤掛数馬、吉澤佐也、播磨恵、太田晴子、藤田義人、祖父江和哉：エリスロポチエンの脳保護効果の発現機序解明 - 脳内免疫担当細胞ミクログリアに対する効果に注目して - 。第 41 回日本集中治療医学会学術集会 2014 年 2 月 27 日-3 月 1 日 京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加古 英介 (KAKO, Eisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70464576

(2) 研究分担者

笹野 寛 (SASANO, Hiroshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20215742

祖父江 和哉 (SOBUE, Kazuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90264738

(3) 連携研究者

なし