

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463159

研究課題名(和文) 一過性脳虚血が誘導する神経再生機転と幹細胞の検討

研究課題名(英文) Induction of neural stem cells and possible contribution to neurogenesis following transient brain ischemia

研究代表者

百田 義弘 (MOMOTA, Yoshihiro)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60247880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一過性脳虚血/再灌流モデルを用い、致死的虚血負荷閾値を明確にすることで、神経産生メカニズム、新生神経細胞の起源の解明を試みた。その結果、30分間以上の致死的虚血傷害下において、神経産生能をもつ神経幹細胞が誘導されることが明らかとなった。15分間の非致死的虚血傷害下においても細胞数は少ないものの神経幹細胞の誘導を認め、その起源は、虚血負荷にて刺激を受けた脳ペリサイトであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of transient ischemia/reperfusion injury, we investigated the threshold of ischemic periods. In addition, we examined the origin of injury-induced neural stem cells: iNSCs and their possible contribution to neurogenesis under such pathologic conditions. Although iNSCs were induced following not only lethal ischemic injury by more than 30-min ischemia but also non-lethal ischemic injury by 15-min ischemia, the numbers of iNSCs were fewer under 15-min ischemic conditions compared with those observed under 30-min ischemic conditions. We also found that iNSCs are likely derived from brain pericytes stimulated by ischemic insult and that they had an activity of producing neuronal cells.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経幹細胞 ペリサイト 一過性脳虚血 再灌流傷害

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脳梗塞の急性期治療において血栓溶解剤や血管内手術などを用いた血流再開療法が大きく進歩している。とりわけ虚血性脳卒中の治療においては、1. 一過性脳血管閉塞による非致命的虚血/再灌流傷害、2. 一過性脳血管閉塞による致命的虚血/再灌流傷害、3. 永久的脳血管閉塞による致命的虚血傷害、を含む少なくとも3つの主な病態を考慮する必要がある。我々は、内在性神経幹細胞をターゲットとした神経再生療法の観点から、これまで傷害誘導性神経幹細胞 (injury-induced neural stem cells; iNSCs) は永久的脳血管閉塞による致命的な虚血傷害後に誘導されることを報告し、これらの細胞の起源は、脳血管周囲に存在するペリサイトであることを示してきた。しかし、一過性脳虚血/再灌流傷害後の病態下における iNSCs の誘導・産生については明確でない。最近、一過性脳虚血負荷後にもニューロンが新生されることが報告されている。その起源は GFAP/nestin 陽性の反応性アストロサイトとされているが、ペリサイト由来の iNSCs である可能性もある。

### 2. 研究の目的

一過性脳虚血/再灌流モデルを用い、致命的・非致命的虚血/再灌流傷害後においても永久閉塞時と同様に iNSCs が誘導されニューロンを産生するかを検討し、ペリサイトが血流再開療法後における神経再生療法の標的になるかどうかを評価した。

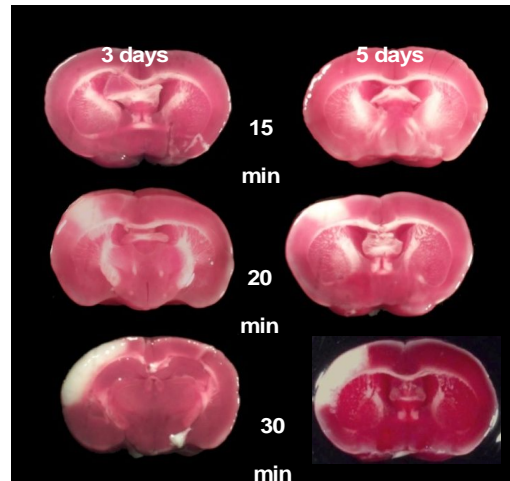
### 3. 研究の方法

我々はこれまで、CB-17 系統マウス中大脳動脈を凝固させることで再現性よく大脳皮質に梗塞を作成できるモデルを用いて研究を行ってきた。本研究では、このモデルを改変することで一過性脳虚血/再灌流を行い、虚血時間を変えて再灌流を行い、3, 5, 7 日後に TTC 染色にて梗塞巣の同在と大きさを観察した。さらに、一過性虚血負荷再灌流後の神経幹細胞の発現とその起源、さらには、神経再生能メカニズムについて免疫組織染色、免疫電子顕微鏡観察および RT-PCR 法を用いて評価した。

### 4. 研究成果

15 分間虚血負荷では、再灌流後に梗塞巣は認められなかったが、20 分間虚血負荷では再灌流 3 日後、5 日後に梗塞巣が観察されるマウスが散見され、30 分間虚血負荷では再灌流 3, 5 日後はすべてのマウスで梗塞巣が観察された。20 分間、30 分間の一過性致命的虚血負荷後の梗塞範囲については、再灌流後の時間経過の影

響はみられず、30 分間虚血負荷後の梗塞領域は永久閉塞時とほぼ同様であった。このことからマウス一過性虚血/再灌流傷害モデルにおいて、15 分間の虚血負荷は比較的軽度な非致命的負荷であり、虚血領域の神経細胞がほぼ死に至る 30 分以上の脳虚血負荷は致命的虚血負荷と考えられた。(Fig.1)



(Fig.1)

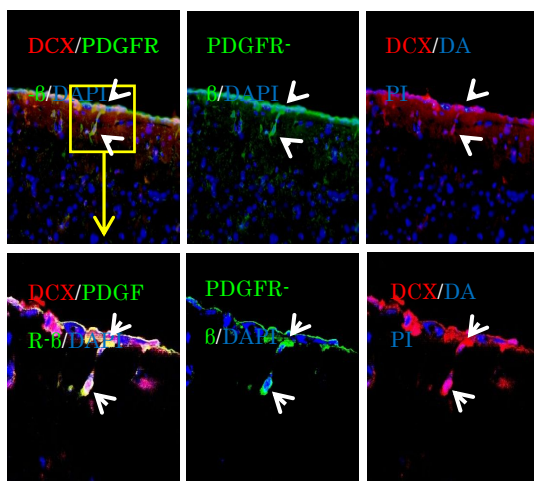
15, 20, 30 分間の一過性脳虚血/再灌流 3 日後の神経細胞の変化を免疫組織染色にて評価すると、非致命的な 15 分間虚血/再灌流後では明らかな梗塞はみられなかったが、虚血領域において MAP2 陽性成熟神経細胞の減少がみられた。神経細胞死は 20 分間の虚血負荷ではさらに明らかとなり、30 分間虚血負荷後では MAP2 陽性成熟神経細胞はほとんど観察されなかった。GFAP 陽性細胞は 15 分間虚血負荷により虚血中心領域とペナンプラにおいて反応性が増加し、30 分間虚血負荷ではペナンプラでわずかに GFAP 陽性細胞が観察されたものの虚血中心領域ではみられなかった。従って、30 分間の一過性虚血は永久閉塞による脳梗塞とほぼ同様の細胞死を引き起こす負荷であると考えられた。

非致命的な一過性虚血後の脳では nestin は PDGFR $\beta$  陽性ペリサイトと GFAP 陽性アストロサイトの両方に発現していた。この虚血領域を bFGF、EGF 添加培地で培養すると iNSCs が誘導されたが、この iNSCs の一部は GFAP 陽性アストロサイト由来であるかもしれない。しかし、非致命的虚血脳から抽出した iNSCs は GFAP 陰性であり、反応性アストロサイトは致命的な一過性虚血/再灌流傷害においてはほとんど観察されなかった。それにもかかわらず、虚血領域から抽出・培養した iNSCs 数は致命的虚血負荷後のほうが、非致命的負荷後より多かったことから、反応性アストロサイト以外の細胞 (PDGFR $\beta$  陽性ペリサイ

ト)が iNSCs の本質的な起源であると推察された。また、非致命的、致命的にかかわらず、一過性虚血/再灌流傷害で誘導される iNSCs は、我々がすでに発見した永久的虚血後に誘導される iNSCs と同様であり、一過性脳虚血状態下においても iNSCs が治療のターゲットとなりうると考えられた。

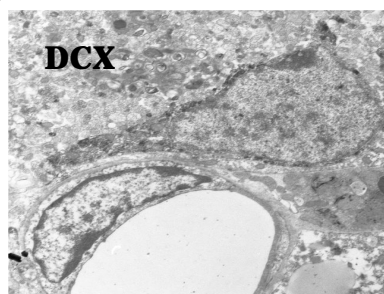
免疫電子顕微鏡観察では脳微小血管のペリサイトは血管内皮細胞と基底層をはさんで接しているが、15 分間虚血/再灌流 3 日後のペリサイトは核の電子密度が低下し、基底層も多様な薄い層を形成するなど形態的外観に顕著な変化を示した。このペリサイトは PDGFR $\beta$ 陽性でかつ nestin 陽性であるため、iNSCs と考えられる。この所見より、一過性脳虚血/再灌流傷害においても微小血管周囲のペリサイトが iNSCs に変化することが証明された。

ペリサイト由来 iNSCs の生体脳における分化能については不明である。一方、非致命的虚血/再灌流傷害後の脳では幼弱なニューロンである DCX 陽性細胞の産生が血管周囲にみられ、一部の細胞は同時にペリサイトのマーカーである PDGFR $\beta$ を発現していた。(Fig.2)



(Fig.2)

免疫電子顕微鏡観察でも血管内皮細胞に隣接する DCX 陽性細胞の存在が確認され、ペリサイト由来 iNSCs が DCX 陽性細胞に分化したことを示唆している。(Fig.3)



(Fig.3)

しかし、これら DCX 陽性の幼弱ニューロンは永久的虚血負荷と似た病態と考えられる致命的虚血/再灌流傷害 7 日後ではほとんど観察されなかった。このことは、強度の虚血状態下では、iNSCs 由来幼弱ニューロンは致命的虚血状態下では生存できない可能性が考えられた。今後は、虚血状態下における iNSCs の生存・分化環境としての Neurovascular Unit の動的な役割を解明することが重要である。

iNSCs は脳動脈の閉塞による非致命的虚血/再灌流傷害の病態下でも誘導されることが明らかとなった。さらに、このような病態下において誘導される iNSCs は脳ペリサイトを起源とし、in vivo、in vitro においてニューロンを産生する能力を持っていることがわかった。脳血管ペリサイトは BBB/neurovascular unit の構成細胞として正常脳の機能維持に重要な役割を果たしている細胞であるが、ひとたび虚血に陥ると内在性神経幹細胞として脳の再生起点に働く細胞となり、脳梗塞の再生療法に大いに活用できる細胞であると考えられる。

#### 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 2 件)

1. Nakata M, Nakagomi T, Maeda M, Nakano-Doi A, Momota Y, Matsuyama T. Induction of Perivascular Neural Stem Cells and Possible Contribution to Neurogenesis Following Transient Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *Transl Stroke Res* 8: 131-143, 2017.
2. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. A high reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res* 76: 163-168, 2013.

[学会発表](計 6 件)

1. 中田雅代, 中込隆之, 前田光代, 土居亜紀子, 百田義弘, 松山知弘. 神経再生療法は脳虚血再灌流病態時でも可能か. 第 59 回日本脳循環代謝学会, 2016/11/12 あわぎんホール(徳島県・徳島市)
2. 覚道知樹, 岸本直隆, 土居亜紀子, 中込隆之, 百田義弘, 松山知弘. 脱分化脂肪細胞の神経系分化とマウス脳梗塞モデルへの細胞移植による脳分布. 第 59 回日本脳循環代謝学会,

2016/11/12 あわぎんホール（徳島県・徳島市）

3. 覚道知樹，岸本直隆，百田義弘．脱分化脂肪細胞の神経系分化．第43回日本歯科麻酔学会，2015/10/31 学術総合センター（東京都・千代田区）
4. 松山知弘，中田雅代，百田義弘，中込隆之．一過性脳虚血負荷後のペリサイトからの神経再生．第27回日本脳循環代謝学会，2015/10/30 富山国際会議場（富山県・富山市）
5. 中田雅代，百田義弘．脳虚血再灌流傷害における内因性神経再生．第42回日本歯科麻酔学会，2014/10/11 日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟県・新潟市）
6. 柴田啓貴，百田義弘．大脳皮質梗塞後には胎生期の機能神経が再生される．第42回日本歯科麻酔学会，2014/10/11 日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟県・新潟市）

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

百田 義弘 (MOMOTA, Yoshihiro)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：60247880

##### (3)連携研究者

前田 光代 (MAEDA, Mitsuyo)  
理化学研究所・CLST-JEOL 連携  
センターマルチモダル微細構造解析  
ユニット・客員主管研究員  
研究者番号：40122080

松山 知弘 (MATSUYAMA,  
Tomohiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10219529

##### (4)研究協力者

中田 雅代 (NAKATA, Masayo)