

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 29 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670348

研究課題名(和文) 頭部外傷後の脳虚血侵襲時に出現する神経幹細胞の性質及び動的変化の病理組織学的検討

研究課題名(英文) Histopathological analysis of the nature and dynamic change of neural stem cell during ischemic insult following head injury

研究代表者

原田 一樹 (Harada, Kazuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・法医学・准教授)

研究者番号：00253146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、頭部外傷による虚血侵襲を受けた剖検脳において、成人脳のニューロン新生の舞台である側脳室・脳室下帯の形態学的変化を病理組織学的に解析することである。しかし、必要とされる頭部外傷事例が研究期間内に集積できず、さらにいくつかの事例は死後変化のため本研究から外さざるを得なかった。集積された事例に関しては、ルーチン染色標本までは作製したが、免疫組織化学染色は予備実験として数例施行したに留まった。この予備染色はルーチン染色と合わせて、脳室下帯の正常構造を把握するために役立てた。

研究期間中には、数多くの学会、セミナーに参加して最新の知識を集積した。今後とも本実験を継続して行く予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to histopathologically analyze the morphological changes of the lateral ventricles and subventricular zone where neurogenesis occurs, in postmortem human brain with ischemic insult due to head injury. However, the required cases of head injury could not be completely accumulated during the study period. In addition, some cases had to be excluded from the study due to significant postmortem changes.

Routine stains such as hematoxylin-eosin stain were performed for partially accumulated cases, but immunohistochemical stain was only performed as preliminary for a few cases because I believe that from the technical point of view, this stain should be performed in a relatively short period after all necessary cases are accumulated. Both routine and immunohistochemical stains are very useful for the future study to grasp the normal structure of the subventricular zone.

I will further continue to accumulate the cases and intend to finish this promising study.

研究分野：頭部外傷の神経病理

キーワード：再生医学 神経幹細胞 脳・神経 頭部外傷 病理学 神経病理 法医病理 脳室下帯

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は胎生期に神経幹細胞から生まれ、「成人の脳では神経細胞は再生しない」というのが近年までの通説であった。しかし最近の研究により、成人の脳にも神経幹細胞が存在してニューロン新生が継続していることが報告され、その通説はすでに過去のものとなった。

現在、成人脳のニューロン再生の場所としては前脳の脳室下帯と海馬の顆粒細胞下層の2ヶ所が知られているが、現時点で、ヒト脳室下帯における神経幹細胞の正体は明確に特定されておらず、上衣細胞層を含む脳室下帯自体の機能もあまりよく知られていない。またヒト脳室下帯の構造は齧歯類のそれとは大きく異なっているため、ラットやマウスなどを用いての実験結果を安易にヒトに当てはめることはできない上、ヒトの脳組織を用いての検討自体ほとんどない。

本研究では、頭部外傷による虚血侵襲を受けた剖検脳を用いて、側脳室の上衣細胞及び脳室下帯の変化を、免疫組織化学的手法などを用いて病理組織学的に検討する。さらに脳室下帯に出現する神経幹細胞を同定し、その性質、及び虚血侵襲時の経時的変化の解析を行う。

2. 研究の目的

本研究は、頭部外傷による虚血侵襲を受けた剖検脳を用いて、以下の点を病理組織学的に解析する。

(1) 虚血侵襲時の側脳室上衣細胞及び脳室下帯の形態学的変化

(2) 虚血侵襲時に側脳室の脳室下帯に出現する神経幹細胞の経時的変化

(3) 虚血侵襲時生存期間の異なる剖検脳における神経幹細胞の経時的変化

以上の研究から得られた結果より、神経再生のメカニズムを解明し、脳の再生医療の進歩に有益な情報を法医学領域より提供する。虚血などの侵襲を受けた脳に出現する神経幹細胞の解析は近年に始まったばかりであるが、頭部外傷事例の剖検脳を用いて病理組織学的に解析するという点が学術的特色であり、独創的な点である。

本研究により神経幹細胞が同定され、その細胞の性質や虚血侵襲時の経時的変化が解明されれば、中枢神経系疾患の病態の解明の一助となるのみならず、脳の再生医療に関して大変有益な情報を提示することができる。

3. 研究の方法

(1) 対象症例の選択、顕微鏡用標本の切り出し、顕微鏡用組織の保存・・・頭部外傷事例(年間20症例と予想)は、硬膜外・硬膜下血腫、クモ膜下出血、脳挫傷、びまん性軸索損傷などを含む。対象症例としては内因性突然死(脳出血や脳梗塞などの中枢神経系疾患の既往を持つ事例を除く)や縊死(遷延性に死亡した事例を除く)を選択する(年間20症例)。中枢神経系の既往を持つ事例は除外する。

側脳室体部の側室壁(上衣細胞及び脳室下帯を含む)を体部の前方と後方に分けて切り出す。事例によっては左右の大脳半球で虚血侵襲の程度が異なることが予想されるため、同一事例で左右の比較ができるように必ず両側を切り出す。脳室壁は以前に報告された分類に従い、背側部 dorsal、中間部 intermediate、腹側部 ventral に分割して組織カセットに入れる。また、電子顕微鏡用組織(2mm角以内)を、顕微鏡用標本を切り出した部位に隣接した部位から切り出して固定する(後にエポキシ樹脂を用いた包埋までを行っておく)。

(2) 上衣細胞・脳室下帯の組織切片作製・・・上記の頭部外傷事例及び対象事例から採取された左右側脳室(背側部、中間部、腹側部)のパラフィン包埋ブロックより、厚さ5µmの組織切片を作製する。

(3) ルーチン染色(HE染色、KB染色、ゴルジ染色、EVG染色など)・・・(2)で作成された組織切片からHE染色、ゴルジ染色標本を作製する。また、場合によっては認められた形態学的異常と脈管構造との関係性を検討するためにエラスチカ・ヴァン・ギーソン(EVG)染色標本を作製する。上衣細胞層に関しては、萎縮 atrophy、不連続性 discontinuity、陥入 invagination、結節形成 nodule、口ゼット形成 rosette、チューブ形成 tubule、肉芽腫 granuloma などの形態学的変化の有無に関して記録する。これらの変化の病的意義には未だに不明な点が多い。

(4) 免疫組織化学染色

使用予定の主な抗体(カッコ内は抗体の持つ意義)

- ・GFAP(グリアマーカーであるが上衣細胞でも陽性となる)
- ・Cytokeratin(上衣細胞を含む上皮系細胞のマーカー)
- ・Vimentin(間葉系細胞のマーカー)
- ・Ki-67(細胞増殖マーカー)
- ・PCNA(細胞増殖マーカー)
- ・NeuN(成熟ニューロンのマーカー)
- ・Doublecortin(幼若ニューロンのマーカー)
- ・CD133 or Prominin-1(神経幹細胞マーカー)

一)

・Nestin (神経幹細胞マーカー)
・Aquaporin (水輸送に関連した膜蛋白で、上衣細胞に豊富に存在する)
・Tuj1 (微小管の構成蛋白 - Tubulin に対する抗体で、ニューロンの伸長時に強く陽性になると報告されている)

免疫染色 (酵素抗体法)・・・脱パラ及び抗原賦活化した組織切片を前期の1次抗体、及び適切な動物種を用いて作製された2次抗体と反応させた後、ABC試薬 (Vectastain® ABCKit、Vector Laboratories社製)及びDAB (3,3'-ジアミノベンゼン)を使用して発色させる。

蛍光二重染色・・・[免疫染色 (酵素抗体法)]の結果に基づいて、前記1次抗体の中から2種類の抗体 (例えば神経幹細胞マーカーとグリア細胞マーカー)を選択して、それぞれ赤 (ローダミン)と緑 (FITC: フルオレセイン・イソチオシアネート)に蛍光標識することによって免疫二重染色を行う。

画像解析・・・染色像は、デジタル顕微鏡システム用ソフトウェア AxioVision (Carl Zeiss: 現有品)によりデジタル画像として取り込み、染色 (蛍光)強度、陽性細胞数、陽性細胞同士の相互関係などに関して同ソフトウェアを用いて解析を行う。

神経幹細胞と思われる細胞が同定できた場合、電子顕微鏡用に保存した組織 (エポキシ樹脂で包埋済み)を薄切し、電子顕微鏡を用いて観察し、神経幹細胞の性質や他の細胞との相互関係についてさらに検討を加える。

以上の実験結果を総合的に検討して、虚血侵襲時に出現する神経幹細胞の性質や虚血後の時間経過に伴う経時的变化、その変化の際に上衣細胞や脳室下帯が果たす役割について解析する。

4. 研究成果

前述のように、本研究の主な目的は、頭部外傷による虚血侵襲を受けた剖検脳において、成人脳のニューロン再生の舞台として知られている側脳室・脳室下帯 (及び上衣細胞)の形態学的変化を病理組織学的に解析することである。さらに研究で得られた結果から神経再生のメカニズムを解析し、最終的には脳の再生医療に有益な情報を法医学領域より提供することを目指した。

通常、頭部外傷事例を解剖する機会を持つのは、(病理学者ではなく)法医学者である。したがって、法医解剖からのみ得られるヒト頭部外傷の剖検脳を用いての神経再生に関する研究には前例がなく、独創的である。

以上のことから、研究計画立案時より、本研究のために最も重要なプロセスは、解析に

必要な数の頭部外傷事例、及び年齢をマッチさせた対象事例の集積であった。しかし予定された研究期間中に、必要とされる頭部外傷事例の数が予想よりはるかに少なく、さらにいくつかの頭部外傷事例は、死後変化の影響が強かったため、本研究の対象から外さざるを得なかった。この頭部外傷事例の集積の見込み、および法医解剖特有の因子である“死後変化”の影響を過小評価していたことが、本研究遂行における一番の大きな反省点であった。

集積された事例に関しては、組織ブロック及びルーチン染色標本までは作製したが、免疫組織化学染色に関しては、染色条件を決定し、手技を安定させてから、比較的短期間に集積した事例すべてを染色した方が好ましいという観点から、予備実験として数例を染色したのみに留まった。なお、これらの予備染色は、ルーチン染色と合わせて、本研究のターゲットである脳室下帯の正常構造を把握するために役立てた。脳室下帯の正常及び正常変異 normal variant の組織像に関して記載してある成書はほとんど無いため、この“正常構造の理解”自体、今後研究を継続する上で非常に有益な情報となることが期待される。

研究期間中には、頭部外傷、法医病理、神経病理、神経科学、画像神経診断など様々な分野にわたる、多数の脳神経関係の学会、セミナー、研究会に参加したが、今後の実験の継続に必要な最新の情報を得るために非常に有益であった。

科学研究費助成事業の助けによって得られた知識および研究実績を土台として、今後とも本実験を継続して行く予定である。

<引用文献>

Eriksson PS et al, Nat Med 4, 1313-1317, 1998
Chojnacki AK et al, Nat Rev Neurosci 10, 153-163, 2009
Sanai N et al, Nature, 427, 740-744, 2004
Quinones-Hinojosa A et al, J Comp Neurol 494, 415-434, 2006

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等・・・なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 一樹 (HARADA, Kazuki)
防衛医科大学校医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：00253140

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()