

今回、機械的脳損傷モデルにおける神経幹細胞の動向を検討し、側脳室周囲の神経幹細胞は増殖することと、gliosisにもneurogenesisにも寄与していないことが判明した。さらに側脳室周囲における遺伝子発現を解析し、発現上昇・低下している遺伝子を多数発見できた。今後はこれを利用し、外傷後の神経幹細胞を増殖させ、分化を抑制している因子・メカニズムを解明していく予定である。また、外傷後の海馬歯状回での細胞増殖は、外傷部位周囲の細胞増殖と考えるか、神経幹細胞増殖と考えるか、判断できないため、今回解析を行わなかった。

今後は、海馬歯状回、更には外傷部位における遺伝子発現の解析も今後の課題である。一方、発生過程での神経幹細胞からニューロン、グリアへの分化制御機構は、近年、めざましい速さで解明されつつあり、in vitroにおいては神経幹細胞からニューロン、グリアへの分化

を制御できるようになった。このようなメカニズムを中枢神経損傷モデルへ応用し、内在性神経幹細胞からneurogenesisを促すことが出来ないか現在検討中である。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 2001年日本救急医学会(東京)頭部外傷ラットにおける神経幹細胞の動向と神経再生への応用

2) 2002年日本炎症再生学会(東京)予定ラット頭部外傷後の側脳室周囲における遺伝子発現

知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

中枢神経損傷後の細胞応答反応とその修飾の研究

分担研究者 吉峰俊樹

大阪大学大学院 医学系研究科 神経機能制御外科学講座 教授

研究要旨: 中枢神経の損傷を最小限に抑えるためには、中枢神経損傷後の細胞応答反応を把握することが必要である。中枢神経の外傷性並びに虚血性損傷モデルを作成して、近年注目されている Apo E の発現に関して検討し、その発現様式と産生細胞を明らかにした。さらにこれらの細胞応答反応を修飾することにより、損傷を最小限にする試みを行った。Src family kinase inhibitor である PP1 の投与あるいは、NF κ B デコイの投与による遺伝子レベルでの NF κ B の抑制により、脊髄損傷の範囲、浮腫の広がり、あるいは脊髄虚血に伴う細胞応答反応を軽減させることが明らかとなった。現在、温存された神経細胞並びに軸索脱髄損傷の程度を把握し、移植による神経再生、軸索の再髄鞘化を促すことによる神経機能の改善を検討している。

A. 研究目的

近年の救急医療体制の進歩により、重症脳損傷患者の救命率は向上しつつあるも、依然社会に適應できるレベルまで回復させられていないのが現状であり、社会問題化している。脊髄損傷、重症脳梗塞においても同様な問題が存在する。初期傷害の程度を最小限に抑えることは極めて重要であり、これが達成されていなければ、さらなる目標に向かうことすらできない。近年、神経幹細胞の存在やその他の前駆細胞の移植により、“ひとたび傷害された脳、並びに脊髄は回復不可能である”と言うこれまでの常識はくつがえされてきており、傷害の程度によ

っては修復の可能性が残されていると考えられてきている。本研究は脳、並びに脊髄損傷後の細胞応答反応を把握し、それらを制御することにより一次損傷ならびに、引き続き生じる二次損傷を最小限に抑えることを目的とする。第一の方法は Src kinase inhibitor である PP1 を用いて VEGF に関連して生じる浮腫形成を抑制し、二次損傷の広がりを抑制しようとする試みであり、第二の方法は NF κ B デコイを、HVJ を用いて遺伝子導入することにより一次損傷に引き続き生じる二次的細胞応答反応を最小限に抑えようとする試みである。さらに亜急性期には、残された神経回路網の傷害の程度を検

討し、希突起膠細胞前駆細胞の移植による再髄鞘化を促すことにより修復し、神経機能の正常化を計ろうとするものである。

B. 研究の方法と結果

脳損傷モデルは、びまん性軸索損傷モデルを Marmarou らにより開発された方法を一部改変して作成した。さらに脳虚血モデルとしてラット中大脳動脈閉塞モデルを作成した。脊髄損傷モデルは、ラット第 10 胸椎の椎弓切除後に脳動脈瘤用のテンポラリークリップを用いて 5 秒間圧控するラット胸髄一定圧挫傷モデルと、2F-Fogarty カテーテルを大動脈内で 10 分間インフレーションして作成する脊髄虚血モデルを作成して検討を行った。

① 梗塞モデルでの *Apolipoprotein E (Apo E)* ならびに *Apo E receptor* の発現変化の検討

Apo E は中枢神経系の主要なアポ蛋白であり、脂質代謝に関与している。近年 Apo E4 が中枢神経損傷時の病態悪化因子として報告されており、Apo E の病態への関与が注目されてきている。中大脳動脈閉塞後 3 日目から 7 日目にかけて脳梗塞部ならびに梗塞周囲部に Apo E mRNA の発現を認めた。マイクロオートラジオグラムにより、Apo E mRNA 発現細胞が、神経膠細胞並びに浸潤マクロファージであることが確認された。神経細胞では Apo E mRNA の発現は認めなかった。Apo E のレセプターである LDLr、

VLDLr、LRP の mRNA の発現は脳虚血により明らかな影響を受けなかった。

免疫組織化学による Apo E 蛋白の発現の検討では、神経膠細胞で 3 日目から 14 日目にかけて 7 日目をピークに梗塞巣ならびにその周辺に発現を認めた。神経細胞でも、虚血巣周囲に 14 日目をピークに発現を認めた。

② 脊髄外傷モデルを用いた *Src family kinase inhibitor PP1* 投与による外傷性脊髄損傷抑制効果の検討

中枢神経損傷後に生じる浮腫形成は二次的に損傷拡大をもたらすが、この浮腫形成に VEGF が関与していることが知られている。Src kinase inhibitor である PP1 は VEGF の下流に作用して浮腫形成を抑制し得ると報告されている。動脈瘤テンポラリークリップを用いて第 10 胸椎レベルで脊髄圧挫損傷モデルを作成した。損傷直後に PP1 並びに溶解液を腹腔内投与し、経時的に、損傷範囲の検討並びに、ラット抗 Ig-G 抗体による浮腫の広がり、抗 ED-1 抗体によるマクロファージの浸潤の程度を検討した。損傷後の VEGF の発現はいずれの群でも認められたが、両群間で明らかな差は認めなかった。一方、浮腫進展範囲の検討では、損傷 24 時間後、PP1 群では対照群と比べて、有意に縮小を認めた。またマクロファージの浸潤も、PP1 群においてより有意な浸潤の抑制を認めた。さらに 72 時間後での損傷範囲の検討でも損傷範囲が軽減されることを明らかにした。

③ 脊髄虚血モデルでの細胞応答反応の検討

2F-Fogarty カテーテルを左頸動脈から挿入し、大動脈内で10分間インフレーションする大動脈遮断、脊髄虚血再灌流モデルを作成した。本モデルでは脊髄後角神経細胞が温存されるが、前角神経細胞は虚血性変化を呈していた。脊髄後角神経細胞では HSP-70 の遺伝子、蛋白発現ともに認められた。一方、脊髄前角神経細胞では HSP-70 遺伝子の発現が認められたが、蛋白は発現されなかった。Apo E 遺伝子は損傷後1日では遺伝子、蛋白ともアストロサイトに発現を認めたが、3日後では損傷周囲の神経細胞に Apo E 蛋白のみ認められた。脊髄虚血時の組織反応でも脳虚血に類似した部位的特異性が認められた。

④ NF- κ B デコイを用いた脊髄虚血性損傷の修復

NF- κ B は細胞内転写因子の一つであり、虚血再灌流障害時のサイトカイン誘導に寄与している。大動脈遮断により脊髄虚血再灌流モデルを作成し、FITC 標識 NF- κ B デコイを遮断時に動脈内投与することにより NF- κ B デコイが脊髄血管内皮、脊髄神経細胞などに十分導入されることが確認された。さらに、デコイの作用により脊髄前角細胞の虚血性損傷の抑制、炎症性マクロファージの浸潤抑制に効果があることを明らかにした。

⑤ ラットびまん性軸索損傷モデルでの細胞応答反応の検討

ラットびまん性軸索損傷後、青斑核神経細胞の萎縮や、BDNF 発現の低下、脳幹部での軸索の障害が確認された。また大脳でのカテコールアミンの発現の変化を検討し、ラットの行動解析結果との比較を行ってきた。その結果、びまん性軸索損傷後ラットの行動は著しく抑制され、その程度は大脳でのカテコールアミンの量と相関が認められることを明らかにした。軸索の障害の程度を組織学的に評価し、脱髄部位に対し希突起膠細胞前駆細胞の移植による再髄鞘化を促すことにより神経機能の正常化を計るべく研究を行っている。

C. 考察

さまざまな中枢神経損傷病態における細胞応答反応は、損傷の種類、程度、部位により異なり、さらに細胞の種類によっても異なる。この反応を経時的に検討し、把握していくことは、目的とする細胞を保護するのにきわめて有用な情報となる。今回は、中枢神経系の主要なアポ蛋白であり、脂質代謝に関与している Apo E の発現に注目した。Apo E は中枢神経損傷時の病態悪化因子として重要な役割を果たしていることが近年注目されてきている。本研究では脳、脊髄における、虚血性並びに外傷性損傷モデルを作成し検討した。Apo E は損傷後に脳、脊髄ともに神経膠細胞並びにマクロファージでその産生が亢進していた。Apo E 蛋白は神経細胞にも発現を認めたが、その mRNA は神経細胞においては確認され

なかったことから、神経細胞での発現は他の細胞で作成された Apo E 蛋白を取り込んだものである可能性が示唆された。Apo E ノックアウトマウスを用いた報告では、局所脳虚血により、wild type に比べ、障害の程度が大きくなるとされている。また、Apo E は free radical scavenger として酸化ストレスに対し保護的に働くことが報告されている。以上より神経細胞で認められた Apo E は神経細胞に対し保護的に作用している可能性が考えられた。

また、Src kinase inhibitor である PP1 が、脊髄損傷モデルにおいて損傷範囲の縮小効果を持つことを明らかとした。この作用機序としては、これまで報告されている VEGF の血管透過性亢進作用を Src の下流で抑えることにより浮腫を抑制し得ることが関与していると考えられる。今回、さらにマクロファージの広がりにも注目し、より強力にその広がりが抑制されることを明らかにした。このことは MCP-1 などのケモカインの関与も推察させる。

NF κ B デコイを用いた遺伝子治療はまさに遺伝子レベルで細胞応答反応を抑えようとするものであり、その効果は虚血に陥り、蛋白合成能の低下した細胞にも作用し得ると考えられる。損傷を最小限に抑えると言う意味では極めて有用であると考えられるが、すべての NF κ B に関連した情報伝達が抑制されると修復関連の応答反応も低下する危険性が危惧される。したがって、亜急性期には神経栄養因子などの投与や、残された神経回路網の修復を、希突起膠細胞前駆

細胞の移植による再髄鞘化を促すことによる神経機能の正常化を計ることが望まれる。

D. 結論

中枢神経損傷後の細胞応答反応を検討し、それらを PP1 あるいは NF κ B デコイを用いて修飾することにより、一定の効果が得られた。今後は、最小限に抑えられた損傷部位に対して、細胞移植を用いた神経回路網の修復に期待される。

E. 研究発表

学会発表

1. ラット一過性脊髄虚血モデルでの Apolipoprotein E の発現変化。第 24 回日本神経外傷学会 平成 13 年 3 月
2. HVJ-liposome を用いた Nuclear Factor-kappa B decoy によるラット脊髄虚血治療。第 60 回日本脳神経外科学会 平成 13 年 10 月
3. Src family kinase inhibitor PP1 による外傷性脊髄浮腫抑制効果の検討。第 60 回日本脳神経外科学会 平成 13 年 10 月

論文発表

1. Nishio M, Kohmura E, Yuguchi T, Fujinaka T, Nonaka M, Akiyama C, Yoshimine T (2000) Expression of Heat Shock Protein-70 mRNA following transient spinal cord ischemia in rat. Neurotrauma Res. 12:52-56.
2. Nishio M, Kohmura E, Yuguchi T,

- Nakajima Y, Fujinaka T, Akiyama C, Yoshimine T (2001) Changes in Apolipoprotein E expression after transient spinal cord ischemia in rat. Neurotraumatology 24:63-67
3. Nishio M, Kohmura E, Yuguchi T, Nakajima Y, Fujinaka T, Nonaka M, Yoshimine T (2001) Expression of Apo E and Apo E receptor after focal ischemia in rat brain. J cereb. blood flow. Metab. Suppl.
4. Kohmura E, Yuguchi T, Sakaki T, Nonaka M, Fujinaka T, Hayakawa T, Yoshimine T.(2000) Changes in tissue-plasminogen activator mRNA expression following cortical ablation in the rat brain. J Mol Neurosci 14:53-9

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他 | なし |

分担研究報告書

(脳科学研究事業「中枢神経損傷後の機能回復機構の解明、治療法の開発」)

「二次的脳損傷におけるミクログリアの役割に関する研究」

分担研究者 種子田 護 近畿大学医学部脳神経外科学 教授
研究協力者 片岡 和夫 近畿大学医学部脳神経外科学 助教授

研究要旨:脳損傷に引き続いて起こる二次的脳損傷がさらに脳病態を悪化させる。脳損傷部に集積するミクログリアでは、ケモカイン／サイトカインである LPS/IFN- γ 刺激により、誘導型プロテアーゼである MMP-9 および組織線溶に関与するプロテアーゼである uPA の受容体 (uPA receptor) の発現が誘導されることが明らかとなった。しかし、これまで二次的脳損傷との関与が疑われていた MMP-2, tPA, uPA は LPS/IFN- γ 刺激では誘導されないことが明らかとなった。

A. 研究目的

外傷性脳損傷, 虚血性脳損傷いずれにおいても最初の脳損傷後に引き続いて生じる脳浮腫, 神経細胞死など二次的脳損傷がさらに病態を悪化させる。現在, 二次的脳損傷に関与しうるものとしてプロテアーゼが考えられている。すなわちプロテアーゼ matrix metallo- proteinase-2 (MMP-2), MMP-9 や tissue type plasminogen activator (tPA), urokinase type PA (uPA) は脳浮腫や組織損傷に関与しうる。脳内にて免疫反応を担い, 脳損傷部位に出現するミクログリアはこうしたプロテアーゼを産生し, 脳損傷病態への関与が推定され注目されている。未解明な部分の多いミクログリアの細胞機能をミクログリア細胞培養により検討した。

B. 研究方法

Mouse 由来のミクログリアを分離培養しその細胞応答について分子生物学的に検討した。培養ミクログリアを用いてサイトカイン/

ケモカインである LPS/IFN- γ 刺激に対するミクログリアの細胞反応をプロテアーゼである MMP-2, MMP-9, tPA, uPA, uPA receptor の mRNA 発現の変化にフォーカスをあてリアルタイム定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

C. 研究結果

tPA については, どの条件下においても tPA mRNA の発現は乏しく, コントロールとの間に有意差を認めなかった。uPA はミクログリアでは恒常的に発現していることが明らかとなった。しかし, LPS/IFN- γ 刺激ではむしろ uPA 発現は抑制された。一方, uPA receptor もミクログリアには恒常的に発現しているが, LPS/IFN- γ 刺激により, より一層の uPA receptor 発現量の上昇を認めた。MMP-2 mRNA の発現量に関しては, いずれの刺激に対しても有意な変化を認めなかった。MMP-9 は LPS/IFN- γ 刺激にて明かな発現量の上昇を認めた。

D. 考察

マトリックス蛋白の一つである collagen Type IV は血管の基底膜を構成し、その破綻は脳浮腫発生に関与すると考えられる。したがって、collagen Type IV を破壊するプロテアーゼである MMP-2, MMP-9 は、脳損傷後の浮腫や出血に関与しうると考えられている。今回の培養マイクログリア実験において LPS/IFN gamma 刺激をマイクログリアに加えても MMP-2 mRNA の発現量は上昇しなかった。一方、LPS/IFN-gamma によるマイクログリアの活性化により MMP-9 の発現誘導を生じることが明らかとなった。また LPS/IFN-gamma 刺激により組織線溶に関与するプロテアーゼである uPA の受容体 uPA receptor の発現も誘導された。これまで、興奮性アミノ酸・脳虚血の神経障害にマイクログリア由来の tPA が関与している可能性が指摘されている。しかし、今回の培養実験では LPS/IFN-gamma 刺激にてもマイクログリア細胞からの tPA 発現量の上昇は認められなかった。

E. 結論

培養マイクログリア細胞は LPS/IFN-gamma 刺激にて MMP-9, uPA receptor を発現することが明らかとなった。脳外傷後の脳浮腫などの病態にマイクログリア由来のプロテアーゼ MMP-9, uPA が関与しうる可能性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kataoka K, Nakamura H, Asai T, Iwasaki H, Taneda M: Expression of mRNA of uPA, tPA, MMP-2, and MMP-9 in microglia cell cultures and brain stabwounds. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 (Suppl 1):s75-s75,2001

Asai T, Kataoka K, Nakamura H, Iwasaki H, Taneda M: Neuroprotective mechanisms of

hypothermia due to suppressed expression of iNOS and COX2 mRNA in activated microglia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 (Suppl 1):s76-s76,2001

Kawabata A, Kuroda R, Morimoto N, Kawao N, Masuko T, Kakehi K, Kataoka K, Taneda M, Nishikawa H, Araki H: Lipopolysaccharide-induced subsensitivity of protease-activated receptor-2 in the mouse salivary glands in vivo. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 364:281-284, 2001

Kitano M, Taneda M: Extended transsphenoidal approach with submucosal posterior ethmoidectomy for parasellar tumors. Technical note. *J Neurosurg* 94:999-1004,2001

Shiozaki T, Hayakata T, Taneda M, Nakajima Y, Hashiguchi N, Fujimi S, Nakamori Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H: A multicenter prospective randomized controlled trial of the efficacy of mild hypothermia for severely head injured patients with low intracranial pressure. Mild Hypothermia Study Group in Japan. *J Neurosurg* 94:50-54,2001

2. 学会発表

片岡和夫, 種子田護, 朝井俊治, 山田恭史, 中村英剛, 寺本佳史: 破裂脳動脈瘤形成のプロセス. 第60回 日本脳神経外科学会 2001年10月 岡山

寺本佳史, 山田恭史, 中村英剛, 片岡和夫, 中西欣弥, 種子田護: 頸部頸動脈狭窄病変に対する超音波検査(B-Flow)の有用性. 第60回 日本脳神経外科学会 2001年10月 岡山

朝井俊治, 片岡和夫, 中村英剛, 辻潔,
種子田護:低温下での活性化ミクログリアの
MMP9 発現抑制:低体温療法による二次的
脳損傷抑制のメカニズム. 第60回 日本脳
神経外科学会 2001年10月 岡山

中村英剛, 片岡和夫, 朝井俊治, 黒田良
太郎, 種子田護:活性化 Microglia におけ

る Proteinase 発現と二次性脳損傷の検討.
第60回 日本脳神経外科学会 2001年10
月 岡山

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案特許 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Neumann H, et al.	Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho-dependent mechanism.	J. Neurosci	22	854 - 862	2002
Yamaguchi A, et al.	Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia.	J. Biol. Chem	277	623 - 629	2002
Shiozaki T, et al.	Delayed hemispheric neuronal loss in severely head-injured patients.	J. Neurotrauma	18	665 - 674	2001
Aoki M, et al.	Hypothermic treatment restores glucose regulated protein 78 (GRP78) expression in ischemic brain.	Mol. Brain Res.	95	117 - 128	2001
Mizuno-Matsumoto Y, et al.	Transient global amnesia (TGA) in an MEG study.	Brain Topography	13	269 - 274	2001
Nishikawa T, et al.	Conflict of intentions due to callosal disconnection.	J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry	71	462 - 471	2001
Kobayashi S, et al.	Brain state recognition using Fuzzy C-Means (FCM) clustering with near infrared spectroscopy (NIRS).	Fuzzy Days 2001 B. Reusch (Ed.) Spriger-Verlag Berlin Heidelberg.	LNC S 2206	124 - 136	2001
Hata Y, et al.	On an architecture of medical image registration system based on multiple-valued logic.	30 th International symposium on multiple-valued logic. Proceedings		273 - 278	2001
西尾 雅実、他	ラット一過性脊髄虚血モデルでの Apolipoprotein E の発現変化	神経外傷	24	63 - 67	2001

20010631

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。