

論文の内容の要旨

論文題目 成体哺乳類における内在性神経幹細胞の虚血性脳損傷に対する反応と、その治療への応用可能性に関する研究
—特に Notch 情報伝達系に着目して

指導教員 齊藤延人教授
東京大学大学院医学系研究科
平成16年4月入学
医学博士課程
脳神経医学専攻
大宅宗一

【背景】

脳梗塞に対する治療手段は現在でもきわめて限られている。いったん発症した虚血性脳損傷に対する治療手段には、克服されていない多くの限界がある。中でも治療開始までの時間が大きな障害となっており、虚血発症から3時間以内に虚血が解除されなかった場合には、リハビリなどの他には有効な治療方法がないのが現状である。

一方基礎研究では、胎生期中枢神経系の形成に働く神経幹細胞が成体脳でもごく限られた領域には存在していることが明らかとなり、以下のような事実も知られてきた。

- 成体脳の神経幹細胞は主に前脳室下帯(anterior subventricular zone: aSVZ)と海馬歯状回顆粒細胞下層(subgranular zone: SGZ)に存在する。
- これらの成体内在性神経幹細胞は、虚血損傷に対して反応性に増殖する。さらに、脳室内へ成長因子などを投与するとその増殖が増幅される。
- こうして増殖した内在性神経幹細胞はその一部が神経細胞へと分化する。
- これらの再生された神経細胞により、限定的ではあるが、組織学的・機能的な虚血損傷の回復がみられる。

しかしながら脳梗塞治療における内在性神経幹細胞の利用を考えると、いくつもの大きな問題がある。中でも、動物モデルにおいてさえも再生規模が小さく、依然として大きな規模の神経細胞再生を得る方法がないということは、重大な問題である。

今までに様々な物質が成体神経幹細胞の増殖を刺激することが報告されてきたが、その治療効果に関して比較した研究はない。そこで本研究実験1では、過去の脳室内投与の報告から、EGF(epidermal growth factor)、FGF2(fibroblast growth factor-2)、EGF/FGF2の混合投与、IGF-I(insulin-like growth factor-I)、EPO(erythropoietin)、BDNF(brain-derived growth factor)、を選択し、同一条件下で比較することによって内在性神経幹細胞の増殖を刺激する最適な方法を検討した。評価する部位としては、上記のaSVZとSGZ以外の神経細胞新生部位の候補である後脳室壁 (posterior periventricle: pPV) と第3脳室周囲の視床下部 (hypothalamus: HT) を、神経幹細胞の存在の確認と増殖刺激効果の評価を行った。

さらに、様々な幹細胞の維持と分化を制御する Notch 情報伝達系の神経幹細胞における機能に注目した。Notch 情報伝達系の虚血性脳損傷への関与については、現在までに次のようなことがわかってきた。

- Notch 情報伝達系は、胎生期のみではなく成体脳にも存在する。
- Notch 情報伝達系の活性化により、神経幹細胞の維持・増殖が促され、また神経細胞への分化は抑制される。
- Notch 情報伝達系のリガンドを成体マウスの脳室内へ投与したところ、脳室周囲の神経幹細胞の増殖が促され、これらの神経幹細胞から分化した神経細胞が梗塞巣内に認められた。
- Notch 情報伝達系を阻害するγセクレターゼ阻害剤を脳室内へ投与すると、マウス多発性硬化症モデルにおいてオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化が促進され、再髄鞘化が促進された。

以上の報告から、神経再生療法の規模向上のために、Notch情報伝達系はきわめて有望な治療のターゲットとしての性質を有しているといえる。そこで本研究実験2では、Notch情報伝達系の活性化あるいは抑制によって、成体ラット一過性全脳虚血モデルにおける海馬CA1 錐体細胞の虚血損傷に対する再生治療効果の改善が得られるかについて検討した。

【方法と結果】

○実験 1

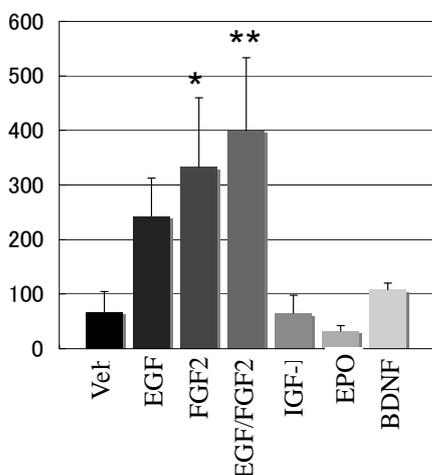
雄性ラット（8週齢）の6分間一過性全脳虚血モデルを使用した。虚血後2日目（Day2）からDay5にかけての3日間に渡り、下記に示す各物質を脳室内へ持続投与した。

分裂細胞を標識するために、Day2-5にかけて12時間おきに計6回 bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg)を腹腔内へ投与した。Day5の最終BrdU投与2時間後に脳を取り出し、aSVZ、SGZ、pPV、およびHTの4カ所におけるBrdU陽性細胞数を、投与物質ごとに比較した。

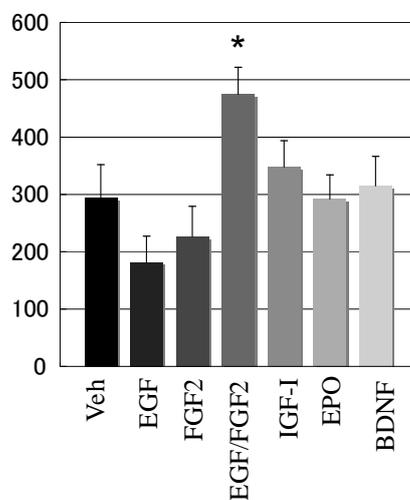
すると、BrdU陽性細胞がaSVZ/SGZ/pPV/HTの4領域全てにおいて観察され、その多く（40-80%）は、BrdU/MCM2/Nestinの免疫三重染色にて陽性となる細胞であり、分裂して新たに生じた神経幹細胞または前駆細胞であると考えられた。部位別に各物質の神経幹細胞増殖刺激効果を検討するためBrdU陽性細胞数を比較した（図1）。

図1 BrdU陽性細胞数

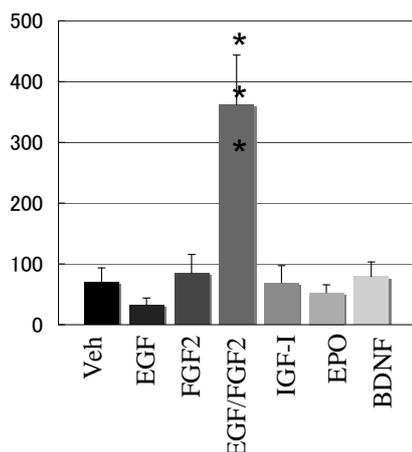
A. aSVZ



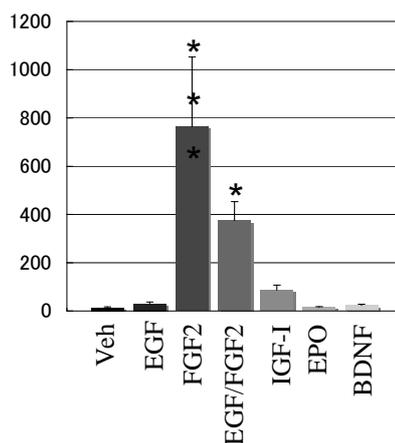
B. SGZ



C. pPV



D. HT



以上より、部位による反応性の違いはあるものの EGF と FGF2 の混合投与が各部位の神経幹細胞増殖を広く刺激することが明らかとなった。また第 3 脳室周囲 (HT) にも免疫組織学的に幹細胞の性質を示す細胞が存在し、FGF2 による強い増殖刺激を受けることが明らかとなった。

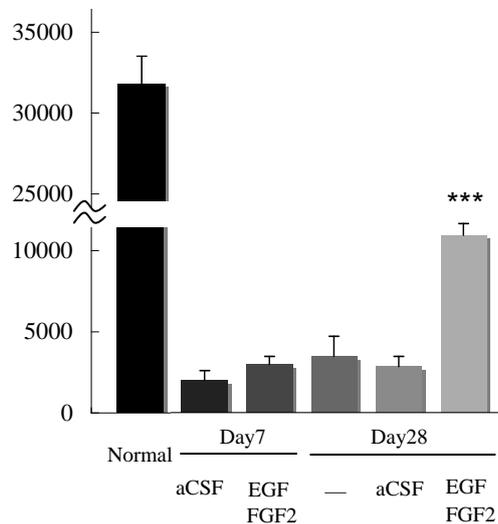
○実験 2

実験 1 と同様にラット 6 分間一過性全脳虚血後の Day2-5 に EGF/FGF2 を脳室内投与するモデルとを用いた。

本モデルでは、虚血後に海馬 CA1 錐体細胞に神経細胞死が生じる

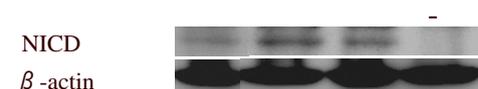
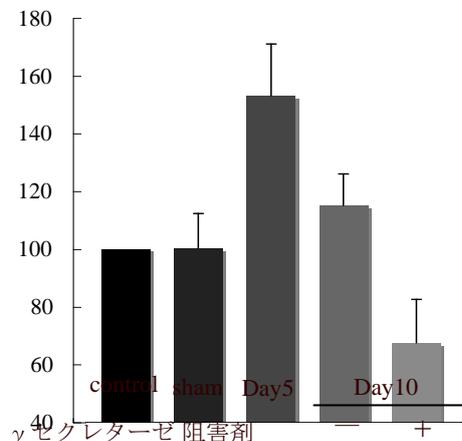
(図 2)。Day7 では成長因子を投与しても CA1 細胞数に有意な変化はないが、虚血後 28 日後には成長因子投与にて有意に細胞数が増加する。BrdU を投与して分裂細胞を標識すると、CA1 錐体細胞の一部は BrdU 陽性であり、神経再生の関与が考えられた。

図 2. CA1 における NeuN 陽性細胞数 (/mm³)



そこでまず、海馬 CA1 における NICD (Notch intracellular domain) のウェスタンブロッティングを行い、虚血後の Notch 情報伝達系活性の時間的経過と、脳室内への γ セクレターゼ阻害剤の投与による影響を調べた (図 3)。細胞膜に存在する Notch 受容体は γ セクレターゼによる開裂を受け、NICD が生じる。NICD の増加は Notch 情報伝達系の活性化を反映する。本モデルでは、図 2 のように虚血の急性期 (Day5) には NICD が増加し、Day10 にかけて通

図 3 NICD level (% Control)



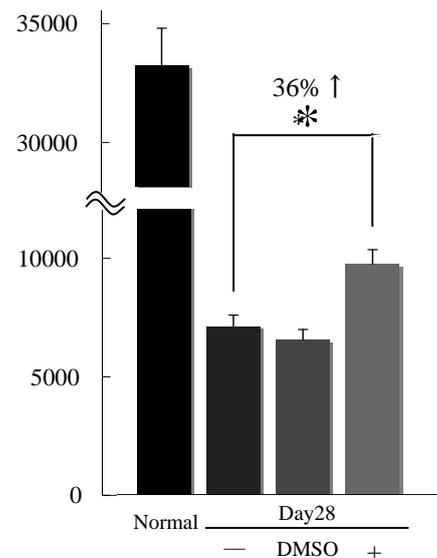
常の活性へ戻るが、 γ セクレターゼ阻害剤を投与することによりさらに活性が抑えられることがわかった。

ここで、活性化した Notch 情報伝達系は神経幹細胞の神経細胞への分化を阻害することに着目し、Day2-5 にかけて EGF/FGF2 を脳室内へ治療し神経幹細胞を増殖させ次にこれらの神経幹細胞が分化へ向かう Day5-12 にかけて γ セクレターゼ阻害剤を脳室内へ投与すると、Notch 情報伝達系の抑制による CA1 錐体細胞の再出現現象が促進されるか、について検討することとした。

すると、 γ セクレターゼ投与群では非投与群と比べて、Day28 における CA1 錐体細胞数が 36% 増加した (図 4)。

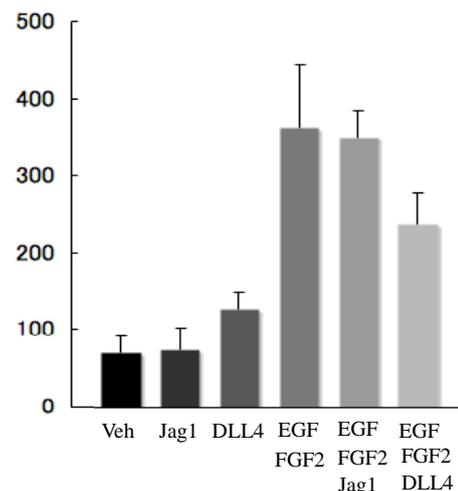
また γ セクレターゼ阻害剤投与群では Day12 における幼弱な遊走中ニューロンで発現する Doublecortin が陽性の細胞が増加していた。さらに、阻害剤投与治療による炎症反応やアミロイド前駆体タンパクを介した経路などに関する明らかな影響は認められず、 γ セクレターゼ阻害剤投与によって、神経細胞への分化が促進される可能性が示唆された。

図 4. CA1 における NeuN 陽性細胞数



次に虚血急性期に Notch 情報伝達系をさらに活性化させることで神経幹細胞の増殖を促すことができるかどうかを検討した。Day2 から Day5 にかけて Notch 情報伝達系のリガンドである DLL4 あるいは Jag1 を、単独あるいは EGF/FGF2 混合投与に追加して、脳室内へ投与し pPV における BrdU 陽性細胞数を数えた (図 5)。

図 5 Notch リガンド投与後の BrdU 陽性細胞数



すると、リガンド単独投与では増殖刺激効果は認められず、また EGF と FGF2 の混合投与にリガンドを加えても付加的な増殖刺激効果は得られなかった。すなわち海馬においては Notch リガンド脳室内投与による虚血急性期のさらなる神経幹細胞の増殖は認められなかった。

【まとめ】

現段階では、内在性神経幹細胞を利用した再生療法は再生する細胞の規模が絶対的に少ないという問題を抱えている。内在性神経幹細胞を利用して虚血後の機能回復までに至ったとする過去の多数の報告があるものの、これらの効果が全て組織学的な再生現象に帰しているものか、はよくわかっていない。本研究にて、

① 虚血急性期には EGF/FGF2 の混合投与がもっとも増殖刺激効果が高く、かつ広汎な部位に影響を及ぼす。

② 虚血の亜急性期に Notch 情報伝達系を抑制することにより、神経幹細胞の分化が促され、組織学的な回復が促進される可能性がある。

ことが示された。今後の研究により、Notch 情報伝達系が新たな脳梗塞治療のターゲットとなる可能性が期待される。