

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「遅発性神経細胞死後の
海馬神経細胞の再生」

研究期間：平成14年11月 1日～
平成19年 3月31日

桐野 高明
(国立国際医療センター研究所、所長)

1. 研究実施の概要

脳疾患のなかでも脳血管障害は先進諸国において医療上重要な疾患であり、わが国の統計でも死因の第2-3位を占める。特に虚血性脳障害は、近年脳卒中の大部分を占める傾向にあり、益々重要性を増してきている。虚血性脳障害に対しては、当然のことながら原因である閉塞血管の早期再開通が理想とされる治療法である。近年血栓溶解療法が導入されたが、現実的には時間的制約等のために重症の脳障害を来して、片麻痺、意識障害などの寝たきり、要介護者状態に陥る場合が後を絶たない。そのため、虚血性脳障害に対する脳保護療法が重要な課題となっており、種々の病態解析研究が精力的に行われてきた。

研究代表者は、これらの基礎病態研究のなかで、1982年に齧歯類の一過性全脳虚血モデルを確立して海馬CA1領域における遅発性神経細胞死を見いだした(Kirino T, Brain Res 239:57-69, 1982)。本虚血性障害は神経細胞が選択的に脱落するモデルであり、神経細胞死の病態機序解明にその後大きな貢献をしてきた。これらの中で、フリーラジカルの発生抑制療法、グルタミン酸の阻害剤、抗アポトーシス剤等、種々の治療法も試みられてきている。研究代表者らは分子機構をさらに解明するべくSORST projectの中で、これらの研究の発展を試みた。特に当時研究の進展していた遺伝子解析技術等も用いて様々な研究を試みたが、その病態は非常に複雑であり限られた分子や情報伝達経路の修飾等で単純に解決されるものでは無いことも判明した。海外も含めて様々な研究が広く行われているが、真に有効かつ臨床応用可能な治療法の開発には至っていないのが現状である。

一方で、別の方向からの新しい可能性が開けつつある。それは神経幹細胞、神経前駆細胞などの神経再生能力を有する細胞を利用して、虚血性脳障害を治療しようとする試みである。神経再生能力を有するこれらの細胞は、成体では嗅球と海馬歯状回の生理的神経新生に実際に寄与していることが分かっていた。しかし、それ以外の部位については、生理的神経新生は認められておらず、成体での治療に応用する可能性も無いと判断されて来た。そこで、治療方法の開発は、むしろ胎児から取り出したり、人工的にクローン化された細胞を移植する方向に強くシフトしている。本来成体にも存在する神経幹細胞・神経前駆細胞の再生能力を利用する方法も有力な選択肢であるが、実際にこの方法が障害を受けた脳の再生に役に立つという証拠は無かった。

そこで、我々は一過性全脳虚血後の海馬CA1遅発性神経細胞死モデルを用いて、内在性神経幹細胞による神経再生療法が可能か否かを検討した。非常に定量性の高いモデルを開発して観察したところ、虚血28日後には僅かな神経再生が生じていることが示唆された。そこで成長因子(EGF, FGF-2)を虚血後に脳室内に3日間投与する治療を併用

したところ、海馬において40%近い神経細胞の再生に成功した。海馬CA1領域では生理的神経新生は生じていないが、脳損傷に応じて内在性神経幹細胞からの神経再生誘導が可能であることを世界に先駆けて証明したことで大きな注目を集めた。特記すべきは、成体脳においても内因性の神経再生機構は保持されており、成長因子によって神経幹・前駆細胞の増殖能を高めるだけで、損傷部位への遊走・分化・成熟・既存回路網への組み込み・電気生理学的機能再建が自然になされたことである。哺乳類成体脳の驚くべき神経再生能力が本研究で示されたといえる。

この結果に注目し、この現象を実際の治療に応用するとすれば、どのような基礎的実験が必要であるかを考えて、SORSTでの継続研究を行った。この現象を成体脳のさまざまな領域で再現させる至適条件を探し、治療の基本原理の開発をおこなうことを一つの目標とした。一方、このような現象が成体脳で明瞭な形で起きること自体が興味深く、その分子メカニズムに迫ることが脳の再生を知る上で重要であることに着目し、この実験モデルを用いて神経再生の分子機構の研究をおこなうことをもう一つの目標とした。前者の領域を桐野グループ、後者の領域を中福グループにて行った。

治療原理の普遍性の確認に関しては、まず海馬以外の領域で虚血後神経再生がなされるか否かを検討した。線条体において定量的細胞死モデルを開発して、同様の検討を行ったところ同様の基本原理（成長因子EGF, FGF-2の虚血後投与）にて、約15%の神経再生を得ることができた。本領域は他の研究者からも報告があるが我々の再生神経細胞数はそれらを遙かに凌駕しており、組織学的検討でも側脳室壁近傍に存在する神経前駆細胞から損傷部位に遊走して神経細胞へと成熟して行く過程を示すことができた。一方、単一再生神経細胞の電気生理学的研究はほとんどなされていなかったが、我々はPatch-clamp法にて再生神経細胞の特性を検討し電気生理学的成熟過程も捉えることができた。海馬CA1領域で示された基本原理が線条体でも応用可能であることが証明されたことになる。

また脳虚血は臨床的に高齢者に多いため、再生能力の年齢依存性が大きな問題となる。我々は高齢ラットでの虚血モデルを開発して検討する予定であったが、個体差が大きくモデルの開発を断念せざるを得なかった。そこで、キノリン酸を線条体に直接注入して神経細胞を破壊するハンチントン病モデルを用いて検討した。その結果、効率は落ちるものの高齢ラットにても成長因子投与によって有意な神経再生を得ることができた。行動解析の結果でも、治療群で明らかな効果を認めたことから、高齢であっても本治療原理が応用可能であることが示されたといえる。

一方、これらの神経再生には各研究室で様々な成長因子の投与が行われているが、我々の用いた成長因子が虚血後再生において最適化否かの検討を行った。海馬、側脳室、第3脳室で虚血後の幹細胞増殖能を指標に行った結果では、やはりEGFとFGF-2の混合

治療が最も有効であることが示された。特記すべきは、いままで注目されていなかった第3脳室壁にも虚血後治療に反応する幹細胞が存在し、視床などでの神経再生への可能性が出てきたことである。また、Notch情報伝達系修飾剤を成長因子投与と組み合わせることで、さらに効率の良い神経再生が可能であることも示された。

第1の分子機構の研究では、まず局所的再生能の部位特異性に着目した。前脳虚血モデルで海馬CA1領域の神経再生が誘導可能であるにも拘わらず、大脳皮質では再生は生じていない。両者の神経幹細胞はin vitroでの挙動に差はないことから、両部位の遺伝子発現を解析したところIGF-1とBMPの発現に大きな差を認め、この両者を皮質に注入することで再生誘導が可能となった。また、脳実質内にも神経幹細胞は存在するが、これらは周囲環境によってその増殖分化が生理的には抑制されていることが分かった。これらの幹細胞は、脳虚血、成長因子投与、さらには神経分化促進因子Neurogenin 2の強制発現によって、損傷脳での神経再生に寄与し得ることも分かった。内在性神経幹細胞からの再生療法には、部位特異性があることは広く知られているが、これらの知見を組み合わせることで、その応用の可能性はさらに広がってゆくと思われる。

最後に、移植療法も広く試みられているおり、我々もその研究に着手した。用いた細胞は皮膚幹細胞で、in vitroでは神経塊をつくり神経細胞へと成熟分化することは既に知られている。この細胞から誘導した神経塊を虚血脳に移植したが、残念ながら神経細胞への分化は認められなかった。末梢神経損傷ではシュワン細胞へと分化したが、成体脳内において成熟神経細胞へと誘導することは、現状では困難と言わざるを得ない。

SORSTの研究期間で、内在性神経幹細胞を用いた虚血後脳における神経再生療法の開発を目指して研究を進めてきた。この間、成体脳が驚くべき再生機構を保持しており、我々の進めてきた成長因子投与による神経幹細胞の増殖刺激によって、年齢、部位に拘わらず成熟神経への誘導、機能再建へと繋がる再生療法の基本原則が確認できたと思っている。この根本原理を用いれば、虚血後の神経機能再建療法の臨床応用への道が見えてきたのではないかと思われる。胚性幹細胞やその他の幹細胞からの移植と比較しても、量的にも質的にも効率の高い再生が得られ、腫瘍形成や倫理的問題点もないことから、大きな利点を有していることも事実である。本研究に参加した各研究者たちが、近い将来に臨床応用へと繋げてくれることを期待したい。

2. 研究構想

本研究開始時は、遺伝子改変動物での解析など、広範囲な研究目標を掲げていた。特に、年齢依存性の解析は臨床応用への展開では必須のものである。しかしながら、虚血という病態モデルを用いる研究であることから、若年ないし高齢ラットでのモデル開発がきわめて困難であること、また再生の研究には長期観察が必要であることなどから、

虚血モデルに限定した解析は短期間では不可能であるという現実と直面した。脳虚血、内在性神経幹細胞、の二つのkey wordに、年齢、部位、分子機構などの第3のkey wordを付け加えて研究を展開する予定であったが、上記理由から一部の研究領域では、虚血に準じる病態、ないし虚血を離れた研究を余儀なくされた面も多かったのが事実である。

しかし、本研究全体を通じて、脳虚血後の内在性神経幹細胞からの再生誘導療法の今後の展開に必要な基本的方向性は示すことができたと考えている。特に、多角的観点からの解析、特に定量的な虚血モデルを用いることで、従来考えてられていたBrdUを標識とした再生能の評価とは桁の違う再生が生じていることを示すことができたことは、大きな収穫であった。神経再生療法が、現象論の時代から量的評価と機能再建への時代に入ったことで、臨床応用が現実的な目標となってきたと考えている。

3. 研究内容

3. 1 脳虚血後の線条体での神経再生の解析（東京大学脳神経外科グループ、帝京大学脳神経外科グループ）

（1）研究の背景

近年の研究の発展により哺乳類成体脳（齧歯類から霊長類まで）においても自己再生能と多分化能を保持した神経幹細胞が存在することが判明してきた（Magavi et al, Nature 405, 951-955, 2000;Gould et al, J Neurosci 22, 619-623, 2002）。これらの内在性神経幹細胞の増殖、分化誘導により、変性脱落した神経機能を代替させることが可能であれば、従来の脳保護療法とは全く異なる新規治療法の開発が可能である。過去数年の急速に発展した基礎研究により、本治療法が現実の課題となってきた。内在性神経幹細胞は、海馬歯状回と傍側脳室に集中して存在し、てんかん発作、外傷、特に脳虚血などの病態時にも増殖応答をする。虚血性脳損傷は、局所脳虚血によって引き起こされる組織の壊死を伴う脳梗塞と、一過性全脳虚血後に生じる選択的神経細胞死に分けることができる。壊死を伴う梗塞部位での神経再生には膠組織の欠損という困難な状況を克服しなければならず、神経幹細胞の挙動解析研究によれば、その多くは神経膠細胞に分化してしまう（Teramoto T, et al, J Clin Invest 111:1125-1132, 2003）。この点で、全脳虚血後の選択的神経細胞死は条件的に有利で、我々は齧歯類の海馬 CA1 領域において成長因子の投与によって神経再生が可能なることを世界に先駆けて証明した（Nakatomi H et al, Cell 110:429-441,2002）。注目されるのは、1）再生された神経細胞が電気生理学的に機能を回復し、個体レベルでの機能回復が認められた、2）従来判明していなかった部位にも神経幹細胞が存在していることを証明した。一方、線条体の神経細胞も前脳虚血後に障害を受けることが判明している(Pulsinelli WA, et al, Ann Neurol 11:491-498, 1982)。我々は、海馬で用いた成長因子投与による内在性神経幹細胞からの神経再生が、線条体

でも可能であるとの仮説をたて、本研究を計画した。

(2) 実施の内容

実験モデルとして、線条体での高度かつ定量的神経細胞死が生じる9分間のラット前脳虚血モデルを開発した。線条体では2日以内に神経細胞死が生じるため、治療として成長因子 (EGF, FGF-2) を2日後より脳室内に7日間投与して、脳室下帯に存在する神経幹細胞を賦活化した。

まず、cresyl-violetによる染色で神経細胞数を線条体背外側部で計測すると、虚血後2日後に著名な神経細胞脱落 (正常コントロールの2%) が起こることを確認した。その42日後、自然経過群および人口髄液投与群ではわずかな細胞の回復 (6%) がみられたが、成長因子投与群では15%にまで達する神経細胞数の回復がみられた。続いて、神経細胞の回復が再生現象によるものかを検証するため増殖マーカーのBrdUを投与した。持続的神経細胞新生が起こっている脳室下帯(SVZ)において、虚血後7日目には成長因子投与群では虚血単独群に比較しておよそ3倍に増殖能が活性化されており、これらは神経前駆細胞のマーカーであるMash 1, Pax 6を同時に発現していた。14日後にはNeuroblastのマーカーであるDCXを同時に発現して損傷部位に遊走する細胞が認められた。42日後には、損傷部位にてBrdUとNeuN (成熟神経細胞のマーカー) で2重染色される細胞が同定され、そのphenotypeとしては線条体特異的なmedium spiny GABAergic neuronが40%を占めることがわかった。これらの変化は、84日後でも変化は認められず、長期的に安定していた。再生神経細胞が軸索を伸展し得るか否かを検証するため、逆行性に軸索輸送されるトレーサーであるFluoro-Gold (FG)を線状体の投射先である淡蒼球外側(GPe)に注入した。虚血後12週経過したラットに注入し、1週間後に評価すると、線状体においてBrdU/NeuN/FG陽性となる細胞がみられ、再生線状体神経細胞がGPeへ長い軸索を伸ばしていることがわかった。

しかし、成長因子投与群で虚血後42日目にみられたNeuN陽性となる神経細胞の中でBrdU陽性となる真の再生神経細胞は4%に過ぎなかった。このためSVZにおける増殖応答を抑制するAra-Cを成長因子と同時投与してみたところ、42日後にはNeuN陽性細胞は約50%に減少した。虚血後2日目には98%の線条体細胞が脱落することと考え合わせると、NeuN陽性となる線条体神経細胞の中で、BrdU陽性ではないものの中にも再生細胞が多数 (10倍以上) 含まれていることが示唆された。

次に機能解析として再生神経細胞の電気生理学的変化を追った。パッチクランプ法を用いて線状体神経細胞の膜特性を調べると、虚血後20週までは未熟であり、虚血後20週を越えると電気生理学的に膜特性が成熟してくることがわかった。これは、同一切片で虚血の影響を受けていない内側の線状体神経細胞がどの時点でも成

熟神経細胞のパターンを示していたことと比べると、再生神経細胞が次第に電気生理学的に成熟していく過程であると考えてよく、これは形態学的な成熟より遅れることが分かった。最後に行動機能の改善がみられるかどうか階段テストを行った。狭い箱のなかに入ったラットが階段状に段差をつけられた台の上のえさを決められた時間内に何個うまく掴んで食べられたか、を見るもので、ラットの前肢の運動機能を評価するものである。成長因子投与群と人工髄液投与群の2群において、虚血前、虚血後2週間後、および虚血後6週間後においてperformanceに差があるかどうか調べたところ、2群間において差がみられ、成長因子投与による行動機能の改善がみられた。

(3) 研究成果の状況および今後期待される効果

脳虚血後の線条体神経再生に関しては、既にいくつかの報告がある (Arvidsson A, et al, Nature Medicine 8:963-970, 2002; Teramoto T, et al, J Clin Invest 111: 1125-1132, 2003)。しかし、いずれもBrdUを唯一の指標としていることもあり、再生の程度としては0.1-0.7%以下であり、有効な再生とはいえない状況である。我々は、定量的選択的細胞死モデルを用いかつ成長因子を投与することで、BrdUを指標としても従来の結果の数倍、Ara-Cによる効果、および時系列による増加な

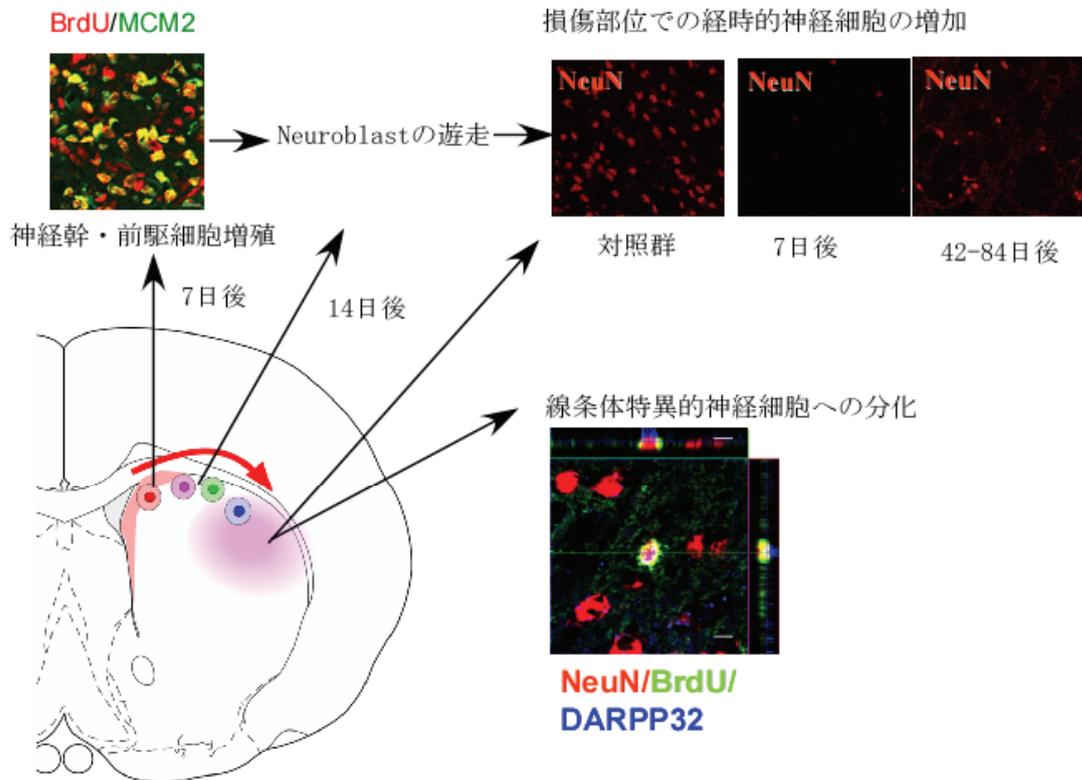


図1 脳虚血後の線条体背外側部での神経再生過程. 成長因子投与により、本来内因性に存在する再生機構を利用して、側脳室近傍から損傷部位へ分化遊走して、再生が行われる。7日目にはBrdUと増殖細胞の指標であるMCM2で2重染色される細胞が側脳室近傍で3倍に増加する。42日後には、損傷部位で成熟神経細胞の増加 (NeuN陽性) が得られ、線条体特異的なGABA作動性神経細胞 (DARPP32) に分化していた。

どを加味すると、10-20倍の神経再生に成功したといえる。これらの再生過程を、各種細胞のマーカーも含めて図1に要約して示した。特に、全体の15%までの再生が形態学的に得られたこと、単一神経細胞レベルでの電気生理的成熟過程を示せたことは、海馬と同様に線条体においても本治療原理に基づく神経再生・機能再建が可能であることを示している。

3. 2 年齢による再生能力の差異の解析（東京大学脳神経外科グループ、帝京大学脳神経外科グループ）

(1) 実施の内容

年齢による再生能の解析については、幼若ラット（2-3週齢）および高齢ラット（1.5-2歳齢）の虚血モデルを開発して行う予定であったが、いずれの群においても個体の脆弱性の為に定量的な海馬の損傷モデルを確立できなかった。その為、興奮性アミノ酸受容体刺激による線条体損傷モデルにて、高齢ラットと若年ラットの神経再生能の比較検討を行う方針に変更した。

線条体は、虚血損傷の他、変性疾患などに犯されやすい部位であり、臨床的には重要である。そこで我々は、キノリン酸を使用したハンチントン病モデルに注目した。このモデルでは線条体に直接神経毒を投与するので、投与部位では高度の損傷が生ずるが、投与量と濃度を調整すれば、周辺脳組織や全身的な影響を大幅に減らすことができる。本モデルにて、線条体神経細胞損傷後の内在性の再生、外因性成長因子の治療的効果、加齢成体への応用可能性を解析することにした。

若年および加齢成体として、それぞれ2ヶ月齢、18ヶ月齢以上のラットを用いた。線条体外側部にカニューレを挿入してキノリン酸（Quinolinic acid）を100 nMol注入すると、線条体において広範な神経細胞死を誘発することが可能である（図2,A）。虚血

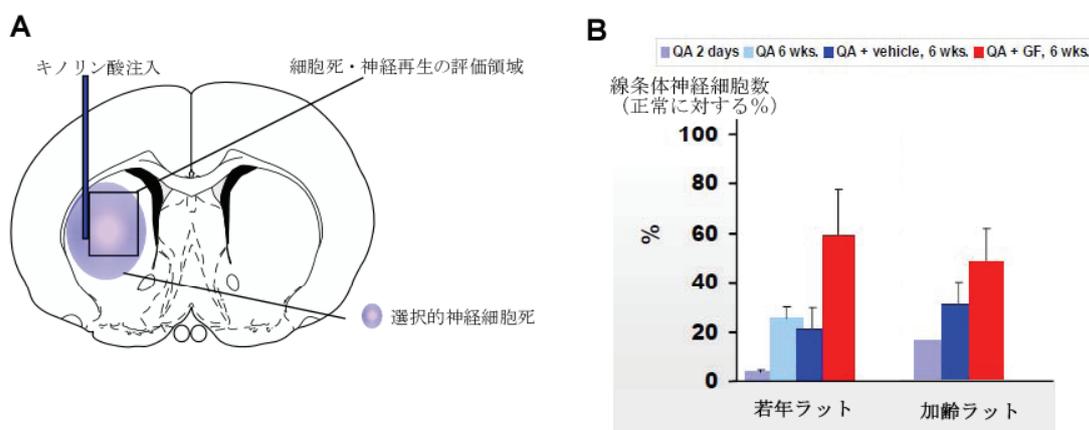
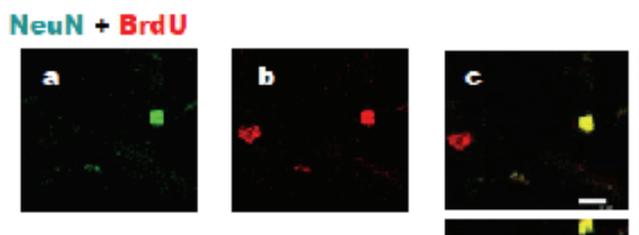


図2 A:線条体へのキノリン酸注入によるハンチントン病モデルの作成と評価領域。 B: 設定した評価領域内での神経細胞数の変化。若年ラットで治療効果が大きい、加齢ラットにおいても治療効果は明かである（6週後評価）。QA:quinolinic acid, GF:成長因子投与群

と同様にこれらの細胞死は2日以内には完成しており、残存細胞数は若年ラットで正常に比較して5%以下、加齢ラットでは20%以下に低下する。これらの個体に2日目より成長因子(EGF, FGF-2)を脳室内に7日間投与すると、若年ラットでは約60%の神経細胞の増加が得られた。この治療効果は加齢ラットでも認められ、約50%まで神経細胞が回復していた(図2,B)。

BrdUを用いてさらに検討した結果、損傷部位内で、BrdU陽性かつ成熟神経細胞マーカーNeuN 2重陽性細胞が多く検出され(図3)、これらの細胞数の増加は、内在性神経幹細胞に由来する神経再生によるものと考えられた。また、線条体特異的神経細胞マーカーで検索すると、正常ではDARPP32陽性の投射神経が80%以上を占めるのに比較して、42日の再生後ではコリン作動性神経細胞のマーカーであるChAT陽性細胞が約40%を占めており、再生過程の一部で様々な変化が生じていることが分かった。また、損傷によって線条体が萎縮変性して、上記の細胞数に見せかけの影響を及ぼしている

可能性もあるため、線条体の体積を計測して比較したが、主たる要因でないことを確認した。



さらに、これらの神経

図3：損傷部位内における再生成熟神経細胞

A

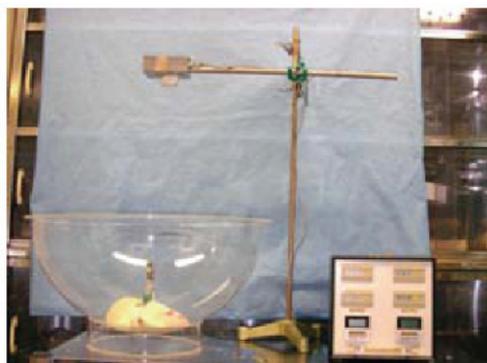
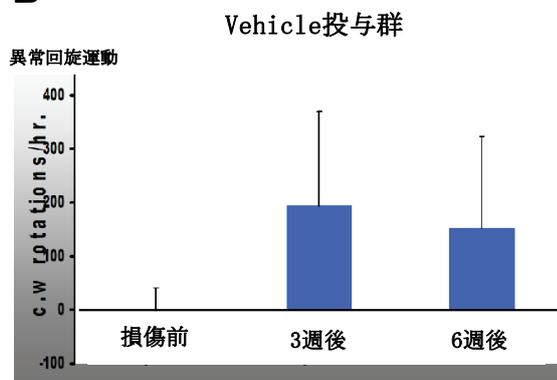
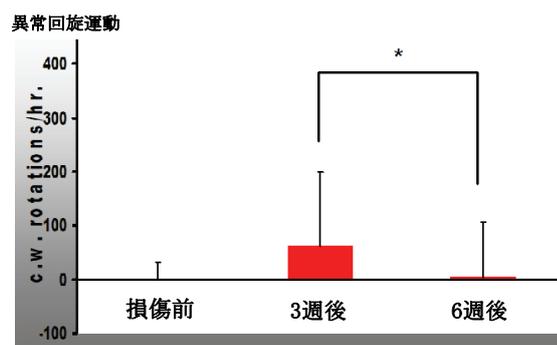


図4 A: apomorphin投与による rotometer test実施。異常回旋運動を定量的に解析する装置。B: 加齢ラットにおける rotometer testの結果。vehicle群においては、損傷後に異常回旋運動が出現し、6週後においても改善していない。一方、成長因子投与によって治療を行うと、6週後にはほぼ正常域まで改善した。

B



成長因子投与群



再生が行動解析上も有効な機能回復に寄与するか否かを検討することとした。用いた系は、本モデルで用いられているapomorphinによるRotometer testで、一側性障害によりapomorphin投与後に異常回転運動が出現することを指標とした行動解析である。若年ラットでは、損傷後に生じた回旋運動は治療群で有意な改善を示した。また、驚いたことに、加齢ラットにおいて若年ラット以上の効果が得られ、6週後には正常群と同等レベルまで回復し、機能としては損傷前の状態まで改善した（図4）。

（2）研究成果の状況および今後期待される効果

本研究の経過中に、ハンチントン病モデルを使用して線条体の再生現象を証明した報告が2報出た（Tattersfield AS, et al, Neuroscience 127:319-332, 2004; Collins T, et al, Exp Neurol 195:71-80, 2005）。ひとつは線条体における内在性の再生がハンチントン病モデルにおいて初めて証明された報告である。他のひとつは、その内在性の再生が、損傷の程度に比例することを証明し、再生現象が損傷の周辺部で最も高いことを証明したものである。しかし、これらの報告はあくまで未治療の自然経過を観察したものであり、治療は行っていない。我々は、同様のモデルにて成長因子による治療を試み、機能再建まで可能な効果を得ることに成功した。特筆すべきは、成長因子投与による治療原理が、加齢ラットにも応用可能であることを示せた点であり、臨床的対象疾患が高齢者に多いことを鑑みると、また一つ臨床応用にむけたステップを進めることができたと考えている。

3. 3 前脳虚血後の海馬神経再生の至適条件の解明（東京大学脳神経外科グループ）

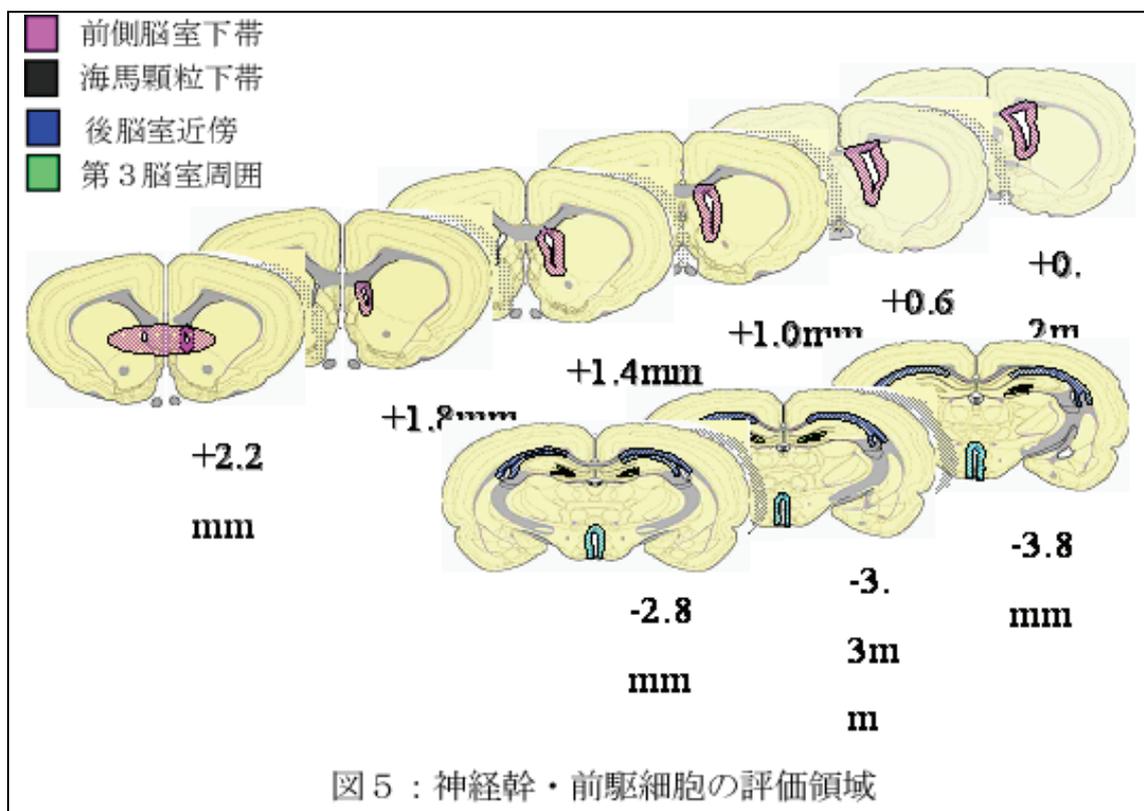
（1）実施の内容

いままでの研究で、海馬CA1、線条体背外側部等の生理的に神経新生が生じていない部位においても、成長因子投与による治療を行うことで虚血等の障害後にかなりの神経再生を誘導可能なことが分かってきた。しかしながら、本治療原理の応用範囲を拡大するためには、さらなる治療効果の促進が必要であると考えた。

まず第一に、神経新生現象が認められることが確立している上記前側脳室下帯（aSVZ）海馬顆粒下帯（SGZ）に加え、後側脳室近傍（posterior periventricle: pPV）、第三脳室周囲の視床下部（HT）、の4部位に注目し、脳室内投与治療による神経前駆細胞の増殖応答を検討した（図5）。6分の一過性前脳虚血後2-5日に脳室内に各種成長因子を、またBrdUも同時に腹腔内に投与して、各領域における新生細胞の増殖応答を検討した。脳室内に投与した因子は、Vehicle、EGF、FGF2、EGF/FGF2、

IGF、EPO、BDNF、Jag1、EGF/FGF2/Jag1、Dli4、EGF/FGF2/Dli4、のそれぞれ単独・混合投与、計11群である。その結果、aSVZ、SGL、pPV、HTの各部位において、BrdU/Nestin/MCM2で三重染色され、免疫組織学的に神経前駆細胞の表現型を示す細胞が多く確認され、これらの部位における内在性神経幹細胞の存在を確認した（MCM2は増殖細胞のマーカー）。増殖能の比較検討では、EGF/FGF2の混合投与が最も高い神経前駆細胞増加効果を示した。また、第三脳室周囲の視床下部には、成長因子投与に高い反応性を示す細胞が存在し、その30-40%で神経前駆細胞のマーカーが発現していることもわかった。また、aSVZやHTでは、DLL4をさらに加えることにより、さらに有意な増加が認められた一方、SGLでは脳室内投与による増殖促進効果が比較的低いことも明らかとなった。我々が従来より用いているEGF、FGF-2の高い効果を確認できたと同時に、他部位においては様々な修飾を加えたさらに効率の良い再生療法が行える可能性も示唆された。

次に、EGF と FGF-2 に加えて、Notch signaling の修飾がどのような影響を及ぼすかを検討した。Notch signaling は、培養細胞系において神経細胞の維持に関わり、神経分化を抑制する因子として知られている。海馬 CA1 近傍での pPV においてその発現を検討した結果、BrdU 陽性細胞の中に、神経幹細胞のマーカーである nestin と Notch1 を共発現している細胞が認められ、その数は成長因子投与によって明らかに増加していた。さらに成長因子投与終了後に、Notch signaling の遮断薬として知られる γ -secretase inhibitor を投与すると、成長因子単独群に比較して海馬 CA1 領域の再生神経細胞数は、



有意に増加していた。成長因子投与により幹細胞の増殖能が促進されるが、これらの細胞における Notch signaling を早期に遮断することで、神経細胞への分化誘導が促進された結果であると考えられた。

(2) 研究成果の状況および今後期待される効果

従来より、内在性神経幹細胞を賦活化する成長因子として様々のものが報告されているが、単一モデルにて同一研究室からこれらを比較検討した報告は無い。我々は、脳虚血後の神経幹・前駆細胞への効果に限定して研究を行い、これまで用いてきたEGF、FGF-2の効果を再確認することができた。また、第3脳室近傍にもこれらに応答する神経幹細胞が存在することが示され、さらに治療応用の可能性が広まったと考えている。また、Notch signalingは様々な組織の幹細胞の維持生存に関わる因子として研究が進んでおり、神経幹細胞でも同様の現象がin vitroで示されてきている。我々は、これらの因子による神経分化過程を修飾することで、さらに効率の良い再生療法が可能であることを証明した。再生神経細胞の生存に関与する因子などの修飾も、今後の研究の発展が期待される分野と考えている。

3. 4 皮膚由来幹細胞の神経細胞分化と移植 (国立国際医療センター研究所グループ)

(1) 研究の背景

内在性神経幹細胞による神経再生と平行して、様々な幹細胞の移植療法も様々な研究室で行われている。我々も、比較検討のために移植療法の研究も最終年次より着手した。

現在までに、神経由来の多能性幹細胞(Reynolds BA, et al, Science 255:1707-1710, 1992; Clarke D, et al, Science 288:1660-1663,2000)、胚性幹細胞 (McDonald JW, et al, Nature Med.5:1410-1412,1999; Brustle O, et al, Science 285:754-756,1999)、骨髄由来の多能性幹細胞 (Pittenger M, et al, Science 284:143-147,1999; Prockop DJ, et al, Science 276:71-74,1997) が報告され、これらの細胞は、中枢神経への移植実験において神経系細胞への分化を認めている。しかし、これらの細胞は、細胞採取の困難さや免疫抑制剤の使用など、倫理的・臨床的に大きな問題をかかえている。一方、最近皮膚由来幹細胞(Toma JG et al, Nat Cell Biol.3:778-784,2001)、脂肪由来間葉系幹細胞(Soo KK, et al, Exp Neurol 183: 355-366, 2003)が報告され、ヒト皮膚から CD133 陽性細胞を単離して SCID マウスの側脳室に移植すると、astrocyte と内皮細胞に分化したとの報告がなされた(Belicchi M, et al, J Neurosci Res 77:475-486,2004)。これらの皮膚・脂肪由来の細胞は、組織採取の容易さと、自家移植が可能のため免疫抑制剤が不要という、大きな利点を持つ。中でも、皮膚は体

表全体に存在しているため、移植治療のソースとして、他の組織と比較し組織採取が極めて容易であり、移植治療の倫理的・臨床的問題を解決できる突破口となりう

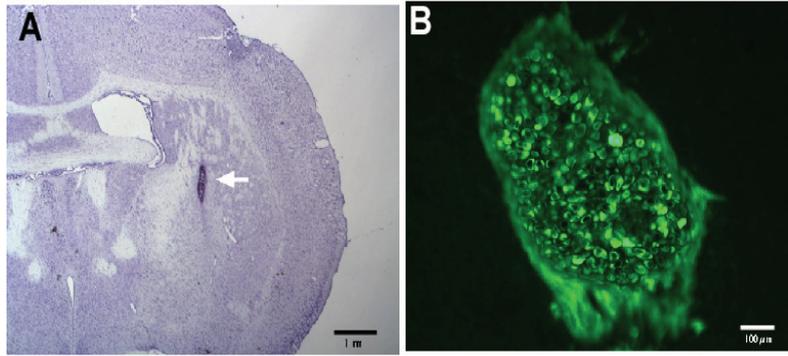


図6 A:虚血後の脳に移植した皮膚由来幹細胞(Cresyo violet染色)。B:移植細胞の拡大図。移植細胞はGFPマウス由来であることから、自家蛍光による確認が可能である。移植後4週での生着は確認されたものの、神経細胞、星細胞への分化は認められなかった。

る。皮膚由来の幹細胞が、損傷した中枢神経・末梢神経に生着し、神経系細胞に分化し、さらに機能回復に結びつく事が証明されれば、新規移植治療へ向けた開発研究として、臨床的に極めて意義の深いものとなる。そこで、この皮膚由来の幹細胞 (Skin derived precursors) を、損傷した中枢神経・末梢神経の移植治療として使用できるかどうかを、これらの培養細胞と、脳虚血モデル・脳神経損傷モデルを用いて検証するという研究に着手することとした。

(2) 実施の内容

最初に行った実験は、GFPマウス耳介皮膚から分離培養した多能性幹細胞を、

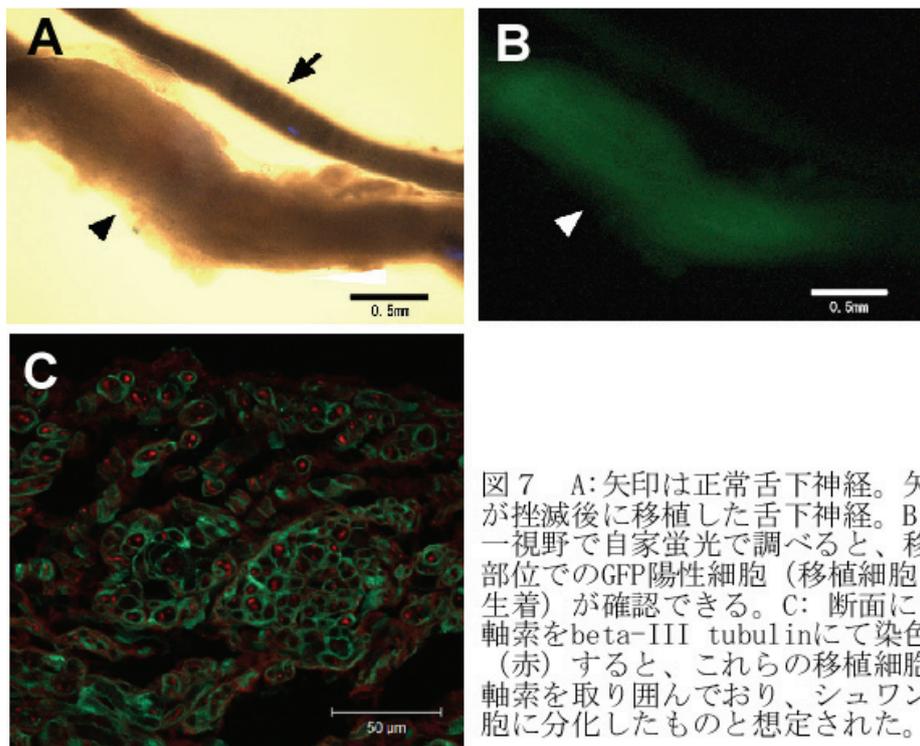


図7 A:矢印は正常舌下神経。矢頭が挫滅後に移植した舌下神経。B:同一視野で自家蛍光で調べると、移植部位でのGFP陽性細胞(移植細胞の生着)が確認できる。C:断面にて軸索をbeta-III tubulinにて染色(赤)すると、これらの移植細胞は軸索を取り囲んでおり、シュワン細胞に分化したものと想定された。

中大脳動脈閉塞再灌流した野生型C57BL/6マウス脳に移植することである。虚血手術1週間後に、梗塞脳の線条体に、定位的に上述の皮膚由来多能性幹細胞を移植し、4週間後にマウスを灌流固定して検討した。その結果、移植細胞の生着は確認されたが(図6)、残念ながら神経細胞マーカーNeuNや星細胞マーカーGFAPでは共染色されず、神経系の細胞への分化は証明できなかった。

そこで、より単純な系として、舌下神経挫滅モデルによる末梢神経再生能を検討することとした。移植5週後には細胞の生着が確認され、GFPの蛍光を発していた(図7)。これらの細胞は、断面図ではほぼ全域に分布しており、また形態学的には軸索を取り囲みシュワン細胞へ分化したものと考えられた。これらの細胞が舌下神経核での神経細胞生存に与える影響を調べるために、神経細胞数と計測したところ、移植群にて細胞数が多い傾向を示した。

(3) 研究成果の状況および今後期待される効果

本研究は、最終年度に着手したものであり、未だ研究途上の段階である。今までの研究で判明した事実は、少なくとも皮膚由来幹細胞においては、*in vitro*にていくら神経細胞への分化能を有していても単純に虚血後脳に移植しても神経再生は得られないことである。一方、末梢神経においてはシュワン細胞への分化が示唆され、神経系細胞への分化能は有る程度もっていることもまた事実である。倫理的問題、量的な確保の問題から大きな利点を有する皮膚由来幹細胞であり、今後は様々な修飾を加えて虚血後脳の修復への応用可能性を探ってゆきたいと考えている。

3. 5 マウス脳虚血モデルの確立と応用(東京大学脳神経外科グループ、埼玉医科大学総合医療センター脳神経外科グループ)

(1) 実施の内容

生物の実験において、マウスの病態モデルは各種遺伝子改変動物の開発入手が容易であるという大きな利点を有する。しかし、ラットと比較して10分の1程度の体重のマウスにおいて種々の虚血モデルが報告されているが、定量性や長期生存の率などに問題が多いのが現状である。そこで、我々は神経細胞死および再生研究への応用が可能なマウスの脳虚血モデルの開発を試みた。

1) マウス脳局所モデルの確立

脳虚血モデルを用いて神経再生現象を研究していくには、再現性が良く長期生存可能な安定した動物モデルの開発が必須の前提となる。これまで、げっ歯類を用いた局所脳虚血モデルの作成には、頸動脈内に糸を留置し、これを頭蓋内に誘導して血管を閉塞させるモデル(いわゆる糸上げモデル)が手技上の易しさから広く用

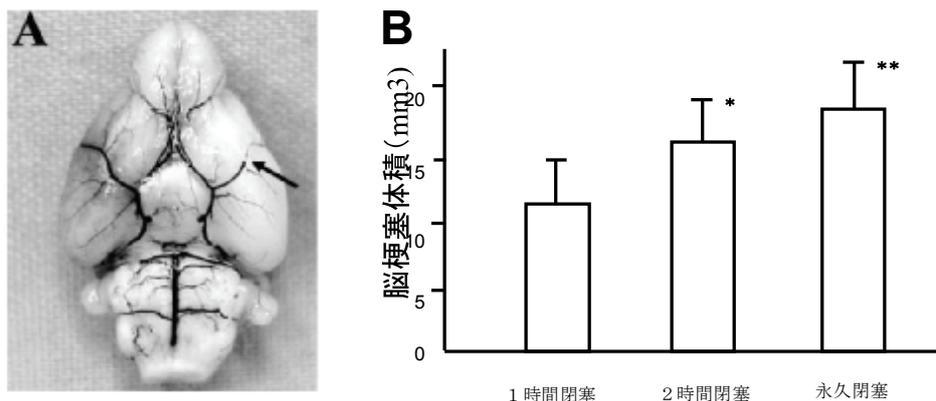


図8 マウス局所脳虚血モデルの開発 A: マウスの中大脳動脈を、開頭した後にクリップにて一時閉塞する。矢印の部位で閉塞。B:閉塞時間による脳梗塞体積の推移。1時間閉塞にて安定した梗塞巣が得られ、2時間閉塞では永久閉塞とほぼ同等の梗塞体積が生じた。本モデルは、他の糸上げモデルに比較して、個体差が少ないことが特徴である（標準偏差が小さい）。

いられてきたが、視床下部障害による高体温、血管を突き破ってしまうクモ膜下出血、不完全な閉塞による再灌流などの問題点が近年になり指摘されはじめています。また後交通動脈の開存状態も脳梗塞の進展や大きさに影響を与えるが糸上げモデルではこの血管を閉塞してしまう。さらに1週間での生存率は極めて悪い。我々はこれらの欠点を補うべく、マウスC57Black6を用いて、直達手術により中大脳動脈近位部を閉塞するテクニックを用いて脳梗塞を作成し、今後の神経再生現象のモデルとなり得るかを検証し、その特性を検討した。具体的には、再灌流モデルとして中大脳動脈（図8, A）を1時間および2時間閉塞後再開通させた群と、永久閉塞させた群を作成し7日後の脳梗塞体積を比較検討した。また後交通動脈の開存状態と脳梗塞体積との関連も検討した。

この方法では、体積が標準偏差30%以内に収まる安定した脳梗塞の作成が可能であり、後交通動脈の開存状態にも影響を受けなかった。また、その梗塞体積は、2時間閉塞にて永久閉塞とほぼ同等であり、2時間閉塞にて非常に強い梗塞が得られることが判明した（図8,B）。1週間後の個体生存率は、1時間閉塞から永久閉塞まで含めてほぼ80%以上と良好であった。

マウスの脳梗塞モデルとしては、塞栓系による閉塞モデルが一般的であるが、永久閉塞モデルでは梗塞巣が大きく、長期生存率は極めて低い。その為に再灌流モデルが用いられているが、長期生存し得る閉塞時間では個体差が大きく定量的な解析が困難であった。今回開発した中大脳動脈閉塞モデルは、これらの欠点を補った長期生存可能なモデルと考えられる。特に、神経再生を誘導するには長期生存が得られることが前提条件であり、神経再生研究に最適なモデルである。

2) マウス前脳虚血モデルの確立

マウスの前脳虚血モデルに関しては、様々な手法を試みたが、最終的にはC57BL/6とSV129において、脳底動脈を独自のクリップで血流遮断しさらに両側の総頸動脈を8-14分間（C57BL/6）または14-18分間（SV129）閉塞させるモデルを評価した。特殊開発した脳底動脈用クリップと閉塞中の写真を図9に示す。

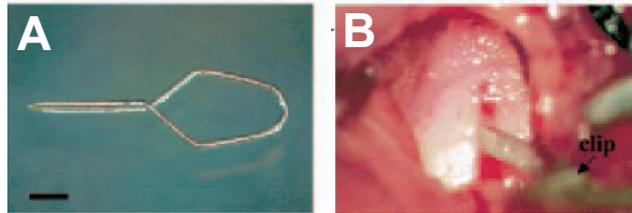


図9 A:マウス前脳虚血モデル用に開発した特殊クリップ。B: マウスの脳底動脈をクリップを用いて実際に閉塞している。

C57BL/6、SV129両群において平均脳血流は虚血前に比べ10%以下で虚血後の海馬CA1領域での脱分極は1分以内

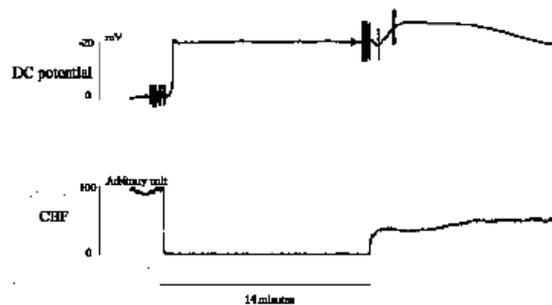


図10 上段は血管閉塞後の海馬CA1領域での脱分極を示す直流電位記録である。下段の脳血流（CBF）に示されている如く、閉塞中は高度の虚血が誘導され、1分以内に脱分極が生じることが確認された。

に生じ、ほぼ完全な虚血が得られた(図10)。手術成功率は94.0%（C57BL/6およびSV129）であり、C57BL/6の4日間の生存率は85.9%であった。SV129の生存率は14分虚血では100%だが18分虚血は51.9%であった。C57BL/6では虚血後4日目に海馬CA1領域の神経細胞の変性を認め、神経損傷は虚血時間に依存した(図11)。特に14分間の虚血での残存神経細胞数は $8.4 \pm 12.7\%$ まで減少し、非常に定量性の高い損傷が得られた(図12)。一方、SV129では、脳血流と虚血から脱分極までの時間はC57BL/6と差がないにも

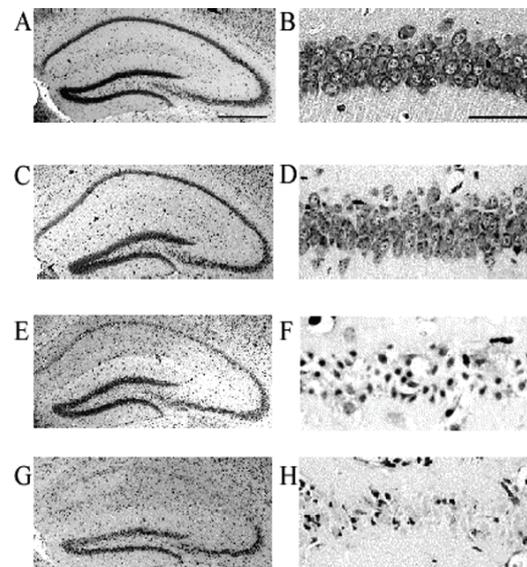


図11 虚血後海馬CA1での神経細胞死。A,B:正常海馬。C,D: 8分虚血では殆ど神経細胞死は生じていない。E,F: 14分虚血後には、非常に強い細胞死が生じている。G, H: 14分虚血後の28日目の海馬にても同様の細胞死が認められる。

かかわらず、14分間の虚血で同様の変化を認めなかった。また、海馬以外の大脳皮質、線条体、視床などに置いても、一定の神経細胞死を得ることができた。

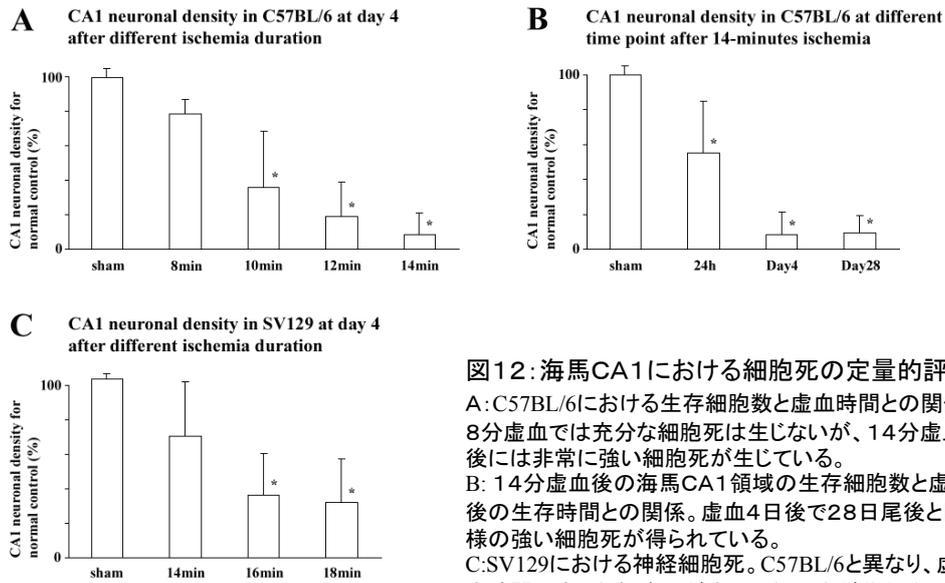


図12:海馬CA1における細胞死の定量的評価
A:C57BL/6における生存細胞数と虚血時間との関係。8分虚血では十分な細胞死は生じないが、14分虚血後には非常に強い細胞死が生じている。
B:14分虚血後の海馬CA1領域の生存細胞数と虚血後の生存時間との関係。虚血4日後で28日尾後と同様の強い細胞死が得られている。
C:SV129における神経細胞死。C57BL/6と異なり、虚血時間に応じた細胞死が生じにくいことが分かる。

3) 海馬遅発性神経細胞死におけるp53の役割

前項で開発したマウス前脳虚血モデルを用いて、まず遺伝子改変動物への応用を試みた。今回は虚血の分子機構を解明する上で、アポトーシスの鍵分子p53に着目し、p53ノックアウトマウスに前脳虚血をかけてCA1領域における神経損傷を評価した。

野生型とホモ型では血流遮断後ほぼ1分で脱分極を認め、脳血流も同等に低下し、海馬CA1領域への虚血の程度は同等であった。しかし4日後の生存細胞数は野生型で17.1 ± 5.7 cells/mm、ホモ型で111.2 ± 62.2 cells/mmと有意な差を認めた(図13, 14)。

P53の発現を、mRNAおよびタ

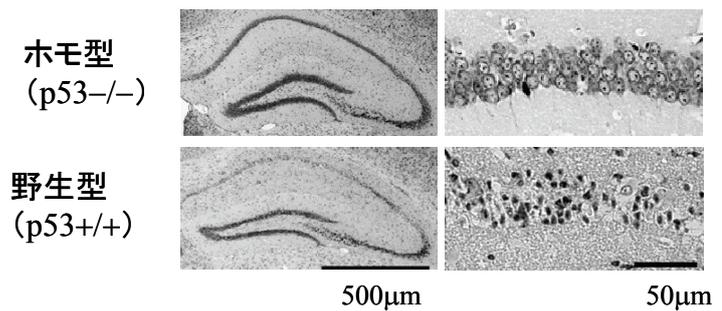


図13:海馬における神経細胞死

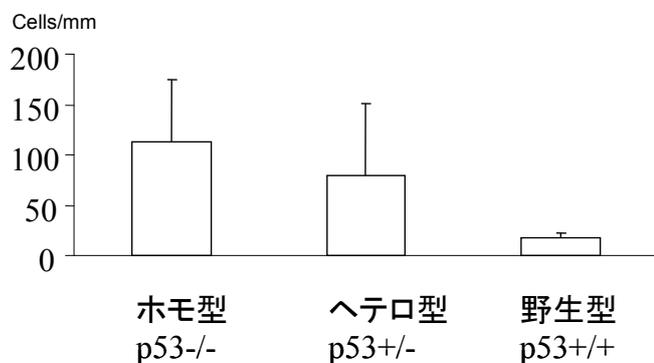


図14:CA1 生存細胞数

ンパクのレベルで解析した結果、野生型マウスでは海馬CA1領域で両者ともに発現が虚血後に亢進しており、これらの変化はノックアウトホモ型では全く認めなかったことは、p53が海馬遅発性神経細胞死に大きな役割を果たしていることを支持する結果であった。

(2) 研究成果の状況および今後期待される効果

これらの結果から、B6 strainを用いれば局所脳虚血および海馬遅発性神経細胞死を定量的に解析可能なモデルが確立されたといえよう。従来このようなモデルは存在しなかったことより、今後は広範な領域への応用が期待される。第1には、p53の研究で示された如く、遅発性神経細胞死の分子機構を支配する遺伝子の同定である。第2は、海馬、視床、線条体、皮質などでの神経再生機構の解明への応用である。胎生期の神経細胞の増殖分化機構に関して、現在精力的な研究が行われ、種々の重要な分子が同定されてきている。一方、成体脳での神経再生において同様の機序で神経幹・前駆細胞から増殖分化が生じているかは未だ不明であり、本モデルを用いてその過程に迫ることが可能である。我々は、神経細胞分化に重要な役割を果たすNeurogenin2に着目し、Neurogenin2 GFPノックインマウスを入手して神経の再生分化の段階を本モデルで可視化することを種々試みた。しかし、胎生期には強い発現が確認されたものの、成体レベルでの発現が極めて低く、成功していないのが現状である。本モデルの神経再生研究への応用も、今少し長期的視点で研究を進める必要があると考えている。

3. 6 内在性神経幹細胞による神経再生の分子機構の解明（シンシナチ小児病院財団グループ）

(1) 実施の内容

本研究の目標は、成体中枢神経組織に存在する神経幹細胞・前駆細胞（以下、神経前駆細胞と表記）を制御する分子機構を明らかにし、それを元に、損傷により失われたニューロンを再生する手法を開発することである。本研究期間においては、全脳虚血モデルおよび局所脳虚血モデルを用いて、海馬、大脳皮質、線条体に存在する神経前駆細胞の損傷応答を解析するとともに、脳内前駆細胞との比較の観点から脊髄損傷を用いた解析を並行して行った。

1) 全脳虚血モデルを用いた解析

全脳虚血損傷後の脳内では、脳室周囲に存在する神経前駆細胞が、特定の時期（虚血後7-14日）に損傷部位へ移動し、ニューロンへと分化することを明らかにした。さらに、この移動・分化に関して、海馬と隣接する大脳皮質との間には著しい

違いが見られることが判明した。すなわち、増殖因子の投与によってニューロン再生を著明に誘導し得る海馬においては、前駆細胞の移動が特定の時期に起こるのに対し、大脳皮質においては前駆細胞が脳室周囲に留まり、損傷灰白質にまで移動しないことが明らかになった。その結果、大脳皮質では、虚血損傷後にニューロン再生がほとんど誘導されない。試験管培養系を用いた解析から、海馬、大脳皮質を裏打ちする脳室周囲組織には神経前駆細胞がほぼ同程度の頻度で存在すること、またそれらの移動能、ニューロンへの分化能には有意な差が認められないことが判明した。従って、海馬と大脳皮質の再生能の違いは、神経前駆細胞の移動と分化を制御する外的環境の違いによる事が強く示唆された。そこで、虚血脳における2つの領域の遺伝子発現プロファイルの違いをAffymetrixの遺伝子チップを用いて解析した。その結果、IGF-IおよびBMPシグナル伝達に関わる特定の制御分子の発現が、両者で著しく異なる事が判明した。そこで、IGF-IおよびBMP4を虚血後の特定の時期に大脳皮質に局所投与したところ、通常ではニューロン再生がほとんど起こらない大脳皮質において、新生ニューロンを誘導し得ることが明らかになった。現在、両因子の作用機構の詳細を明らかにするべく、解析を進めている。

2) 局所脳虚血モデルを用いた解析

我々は以前の研究において、成体脊髄においては、神経前駆細胞が中心管周囲のみならず、広く脊髄実質に分布していることを見いだしている。このことから、成体脳においても同様に、脳室周囲以外の実質部に神経前駆細胞が存在し、それらが損傷後のニューロン再生に寄与し得る可能性が考えられた。そこで、大脳皮質を局所的に損傷する遠位中大脳動脈閉塞モデルを用いて、この仮説を検証した。まず、試験管培養系を用いた解析から、成体脳の大脳皮質および線条体の実質には、脳室周囲組織に比べて頻度は低いながら神経前駆細胞が存在することを明らかにした。異なる領域より単離した神経前駆細胞の遺伝子発現プロファイルはそれぞれ異なっていることから、それらは成体脳に存在する異なる神経前駆細胞集団であると考えられた。脳全体に占める組織の割合を考え合わせると、実質部に存在する神経前駆細胞は、これまでの多くの研究の中心であった脳室周囲の神経前駆細胞に比べて、より豊富に存在すると推定された。次に、局所大脳皮質虚血損傷モデルを用いて、これら実質部の神経前駆細胞の再生能を解析した。その結果、正常脳内では、実質部神経前駆細胞の増殖・分化が周囲環境によって阻害されていると考えられた。しかし、局所の外傷性傷害、増殖因子の局所投与、さらに神経分化誘導因子であるNeurogenin2の強制発現等の操作によって、その増殖と分化を誘導し得ることが明らかになった。さらに、虚血損傷後には実質部の神経前駆細胞による局所的ニューロン再生が強く促進されることが明らかになった。重要なことに、これらの前駆細胞

から再生されるニューロンは、大脳皮質においてはグルタミン作動性錐体細胞、線条体においてはGABA作動性ニューロンの遺伝子発現プロファイルを示し、それぞれ領域特異的なニューロンへと分化していることが強く示唆された。以上の結果は、従来知られていなかった脳実質部に内在している神経前駆細胞の活性化によって、損傷脳におけるニューロン再生を誘導し、組織修復を成し得る可能性を示唆している。

3) 脊髄損傷モデルを用いた解析

成体神経組織において、神経前駆細胞が存在するにもかかわらずその組織再生が著しく阻害されている。その要因は何かを解明することは、将来の神経再生治療の開発の為に必要不可欠である。上記の結果から明らかなように、神経前駆細胞の制御機構は、その存在部位あるいは損傷の性質により大きく異なることが、明らかになってきている。我々は、脳内の神経前駆細胞との比較の対照として、成体脊髄の前駆細胞の解析を外傷性損傷モデルを用いて進めている。全脳虚血後の海馬ニューロンの再生とは異なり、損傷脊髄においては、ニューロン、オリゴデンドロサイトの再生が強く阻害されている。そこでまず、増殖因子の局所投与を試みたところ、ニューロン、オリゴデンドロサイトの新生が

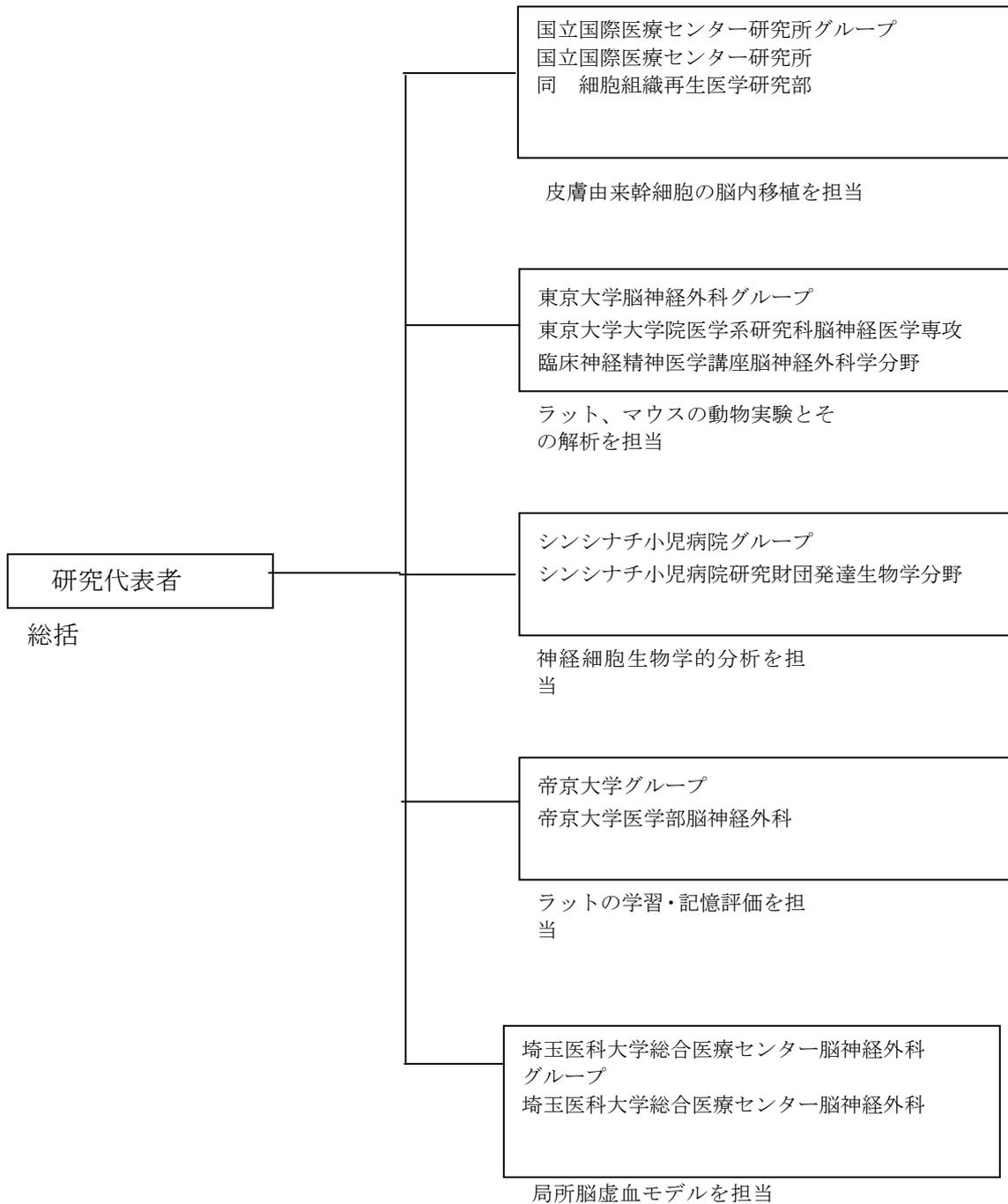
誘導されることが判明した。しかし、それら新生細胞の生存、成熟は損傷組織中で強く阻害されていた。一方、我々は最近、脊髄発生過程の解析から、HLH型転写因子であるNeurogenin2およびMash1が、ニューロンとオリゴデンドロサイトの分化にそれぞれ必須の役割を果たしていることを明らかにしている。そこで、局所の増殖因子投与とNeurogenin2およびMash1の強制発現を組み合わせた操作を試みた。その結果、ニューロン、オリゴデンドロサイトの新生とともに生存、成熟が強く促進された。

(2) 研究成果の状況および今後期待される効果

以上の研究結果から、1)成体中枢神経系においては神経前駆細胞が様々な部位に広く分布すること、2)しかし、それらの損傷組織における増殖・分化は、外部環境によって強く制限されていること、3)その環境による制限を解除し、有意な再生を誘導するためには、部位あるいは損傷特異的な操作が必要なこと、が明らかになった。本研究を通じて開発してきた、局所の増殖因子およびサイトカイン投与、神経前駆細胞へのニューロンとオリゴデンドロサイト分化誘導遺伝子の導入、等の操作手法は、外部環境による神経前駆細胞の抑制機構を解明する研究、さらには将来の神経再生療法の開発に向けた研究に、重要な足掛かりを提供することが期待される。

4. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

①国立国際医療センター研究所グループ（皮膚幹細胞移植を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
桐野高明	国立国際医療センター研究所	研究所長	研究総括	平成14年11月～ 平成19年3月
大河内仁志	同細胞組織再生医学研究部	部長	細胞培養実験	平成18年4月～ 平成19年3月
武田富志枝	SORST	研究補助員	細胞培養実験補助	平成18年3月～ 平成19年4月
竹間宣子	SORST	研究補助員	チーム事務員	平成18年4月～ 平成19年3月

②東京大学脳神経外科グループ（ラット、マウスの虚血モデルと解析を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
川原信隆	東京大学脳神経外科	助教授	動物実験指導、および統括	平成14年11月～ 平成19年3月
古屋一英	同上	助手	動物作成実験	平成14年11月～ 平成18年3月
田中実	同上	助手	組織形態解析	平成14年11月～ 平成17年3月
田中純一	同上	助手	動物モデル作成実験	平成14年11月～ 平成19年3月
高井啓介	同上	助手	動物モデル作成実験	平成16年6月～ 平成19年3月
飯島明	同上	助手	動物モデル作成実験	平成17年3月～ 平成19年3月
米倉一郎	同上	大学院生	動物モデル作成実験	平成14年11月～ 平成16年12月
吉河学史	同上	大学院生	動物モデル作成実験	平成16年4月～ 平成19年3月
大宅宗一	同上	大学院生	動物モデル作成実験	平成16年10月～ 平成19年3月
伊藤明博	同上	大学院生	動物モデル作成実験	平成18年4月～ 平成19年3月

松浦令子	SORST	研究技術員	組織形態解析	平成14年11月～平成19年3月
上村直子	SORST	研究補助員	研究全般の補助	平成14年11月～平成15年5月
権藤理香	SORST	研究補助員	研究全般の補助	平成14年11月～平成15年12月
小暮明実	SORST	研究事務員	チーム事務員	平成14年11月～平成18年3月
内田雅子	SORST	研究補助員	研究全般の補助	平成15年6月～平成18年3月
山本美佳	SORST	研究補助員	研究全般の補助	平成16年1月～平成18年3月
冠木源太郎	SORST	研究補助員	動物飼育室管理	平成16年5月～平成17年3月
判治由弘	SORST	研究補助員	動物飼育室管理	平成17年4月～平成19年3月

③シンシナチ小児病院財団グループ（内在性神経幹細胞・前駆細胞による成体中枢神経組織の再生を制御する分子機構の解明を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中福雅人	シンシナチ小児病院財団発生生物学部門	教授	神経生物学実験指導、統括	平成14年11月～平成19年3月
長尾元史	同上発生生物学部門	ポストドクトラルフェロー	動物における再生実験	平成14年11月～平成19年3月
染川 堅	同上、東京大学脳神経外科	大学院生	動物における再生実験	平成14年11月～平成18年10月
杉森道也	同上、東京大学神経病理学	大学院生	動物における再生実験	平成18年4月～平成19年3月
住吉京子	同上、神経病理学	大学院生	動物における再生実験	平成14年11月～平成19年3月

④帝京大学脳神経外科グループ（行動解析実験を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
田村 晃	帝京大学脳神経外科	教授	迷路実験（記憶学習機能実験）	平成14年11月～平成18年3月

④埼玉医科大学脳神経外科グループ（局所脳虚血モデルの作成実験を担当）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
浅井昭雄	埼玉医科大学総合 医療センター	助教授	分子生物学実験	平成14年11月～ 平成18年3月
森川栄治	同上	講師	動物実験	平成14年11月～ 平成17年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

該当なし

(2) 招聘した研究者等

該当なし

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (和文10件、欧文24件)

- 1) Kurita H, Kawahara N, Asai A, Ueki K, Shin M, Kirino T: Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. *Neurol Res* 23:869-874, 2001
- 2) Kawahara N, Kawai K, Toyoda T, Nakatomi H, Furuya K, Kirino T: Cardiac arrest cerebral ischemia model in mice failed to cause delayed neuronal death in the hippocampus. *Neurosci Lett* 322:91-94, 2002
- 3) Asai A, Tanahashi N, Qiu JH, Saito N, Chi S, Kawahara N, Tanaka K, Kirino T: Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:705-710, 2002
- 4) Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors *Cell* 110:429-441, 2002
- 5) Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC: Cell. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115: 163-175, 2003;
- 6) Hashimoto-Torii K, Motoyama J, Hui CC, Kuroiwa A, Nakafuku M, Shimamura K. Differential activities of Sonic hedgehog mediated by Gli transcription factors define

- distinct neuronal subtypes in the dorsal thalamus. *Mech. Dev* 120: 1097-1111, 2003
- 7) 川原信隆: 神経細胞新生による治療への展望 ー内在性神経幹細胞賦活療法の観点からー医学の歩み 205(No11): 837-841, 2003
 - 8) 川原信隆: 内在性神経幹細胞の活性化による脳卒中再生治療 分子脳血管病 2(No4): 412-417, 2003
 - 9) Hack MA, Sugimori M, Lundberg C, Nakafuku M, Götz M: Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol. Cell. Neurosci.* 4: 664-678, 2004
 - 10) Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y.: Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat. Cell Biol.* 6: 547-554, 2004
 - 11) Oishi K, Kamakura S, Isazawa Y, Yoshimatsu T, Kuida K, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y: Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. *Dev Biol.* 276: 172-184, 2004
 - 12) Parras CM, Galli R, Britz O, Soares S, Galichet C, Battiste J, Johnson JE, Nakafuku M, Vescovi A, Guillemot F: Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.* 23:4495-4505, 2004
 - 13) Furuya K, Kawahara N, Kawai K, Toyoda T, Maeda I, Kirino T: Proximal occlusion of the middle cerebral artery in C57Black6 mice: relationship of patency of the posterior communicating artery, infarct evolution, and animal survival. *J Neurosurg* 100:97-105, 2004
 - 14) Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, Furuya K, Kirino T: A model of global cerebral ischemia in C57 BL/6 mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:151-158, 2004
 - 15) Kawahara N, Wang Y, Mukawa A, Furuya K, Shimizu T, Hamakubo T, Abutrani H, Kodama T, Kirino T: Genome-wide gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:212-223, 2004
 - 16) 川原信隆:内在性自己神経幹（前駆）細胞を用いた脳虚血損傷後の神経再生誘導療法の可能性. 脈管学 44(6):237-240, 2004
 - 17) 川原信隆:内在性幹細胞を用いた再生療法. 脳神経外科の最新医療 菊池晴彦 監修 初版 先端医療技術研究所 2004, pp87-92
 - 18) Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M. The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural

- retinal structure. *Hum. Mol. Genet.* 14:735-745, 2005
- 19) Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kida Y, Ogura T, Torii M, Shimamura K, Nakafuku M: Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor. *Hum. Mol. Genet.* 14:1059-1068, 2005
 - 20) 川原信隆: 内在性神経幹細胞活性化による神経機能回復. *分子脳血管病* 4: 20-25, 2005
 - 21) 川原信隆、中富浩文、岡部繁男、栗生俊彦、田村晃、桐野高明、中福雅人: 内在性自己神経幹(前駆)細胞を用いた虚血性脳損傷後の神経再生療法. *脳血管シンポジウム I*、板倉徹 編、ブレーン出版 2005、pp57-66
 - 22) Shimizu T, Imai H, Seki K, Tomizawa S, Nakamura M, Honda F, Kawahara N, Saito N: Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:325-337, 2005
 - 23) Kano M, Tsutsumi S, Kawahara N, Wang Y, Mukasa A, Kirino T, Aburatani H: A meta-clustering analysis indicates distinct pattern alteration between two series of gene expression profiles for induced ischemic tolerance in rats. *Physiol Genomics* 21:274-283, 2005
 - 24) Furuya K, Zhu L, Kawahara N, Abe O, Kirino T: Differences in infarct evolution between lipopolysaccharide-induced tolerant and nontolerant conditions to focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 103:715-723, 2005
 - 25) 川原信隆: 内在性神経幹細胞の誘導と成長因子・サイトカイン. *分子脳血管病* 4:395-401, 2005
 - 26) Patten BA, Sardi SP, Koirala S, Nakafuku M, Corfas G.: Notch1 signaling regulates radial glia differentiation through multiple transcriptional mechanisms. *J. Neurosci* 26:3102-3108, 2006;
 - 27) Ohori Y, Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Yamamoto N, Nakamura K, Nakafuku M: Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 26:11948-11960, 2006
 - 28) Chen L, Liao G, Campbell K, Nakafuku M, Kuan C-Y, Zheng Y: Cdc42 Deficiency Causes Sonic hedgehog-independent Holoprosencephaly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:16520-16525, 2006
 - 29) Yonekura I, Takai K, Asai A, Kawahara N, Kirino T: p53 potentiates hippocampal

- neuronal death caused by global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1332-1340, 2006
- 30) 川原信隆: 脳梗塞への再生医療の将来展望 –内因性神経細胞新生と細胞移植–. *血管医学* 7(No2): 61-68, 2006
 - 31) 川原信隆: 神経細胞新生による治療 –内在性神経幹細胞賦活化療法–. *日本臨床* 64(7):655-659, 2006
 - 32) 川原信隆: 内在性神経幹細胞を用いた脳虚血損傷後の再生医療–哺乳類成体脳における神経細胞新生の制御と治療的応用への期待–. *脳循環代謝* 18:98-103, 2006
 - 33) Kim H-J, Sugimori M, Nakafuku M, Svendsen CN: Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through expression of bHLH proteins and Nurr1. *Exp. Neuro.* 203:394-405, 2007
 - 34) Sugimori M, Nagao M, Bertrand N, Parras CM, Guillemot F, Nakafuku M: Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in spatio-temporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development*, 2007 (in press)

(2) 口頭発表 (内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。)

① 招待、口頭講演 (国内 5件、海外 19件)

- 1) Kawahara N, Wang Y, Mukasa NT, Furuya K, Hamakubo T, Aburatanai H, Kodama T, Kirino T: DNA microarray-based gene expression analysis for induced ischemic tolerance and delayed neuronal death following transient global ischemia in rats. 12th International Symposium on Brain Edema and Tissue Injury, Hakone, Nov 2002
- 2) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The 3rd International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair. Keynote speaker, Magdeburg, Germany, May, 2003
- 3) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The International Stem Cell Conference. Symposium speaker, Singapore, October, 2003
- 4) Nakafuku M: Transcriptional Control of Neural Stem Cells. The International Symposium on Gene regulation Network. Symposium speaker, Tokyo, Japan, October, 2003
- 5) Nakafuku M. Neural Stem Cells and Brain Repair. The 4th International Congress on Genetics and regeneration in neuroscience. Symposium speaker, Terni, Italy, June, 2004
- 6) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The 12th Convention of The Academia Euarasiana Neurochirurgica 2004. Keynote lecturer, Nara, Japan, October, 2004
- 7) Kawahara N: Towards Regeneration of the Adult Brain: Neuronal Replacement by Recruitment of Endogenous Neural Stem Cells /Progenitors after Stroke. Annual Meeting of the Korean Society of Cerebrovascular Surgery, Special lecture, Seoul, 19th Feb, 2005

- 8) Kawahara N: Global Ischemia Models in Rat and Mouse. 22nd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function, Educational Lecture, Amsterdam, 7th June, 2005
- 9) Kawahara N, Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Tamura A, Nakafuku M, Kirino T: Cell replacement therapy after stroke by recruitment of endogenous neural progenitors. 22nd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function, Symposium Speaker, Amsterdam, 7th June, 2005
- 10) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. Molecular & Cellular Physiology Graduate Program Lecture Series, University of Cincinnati College of Medicine. Cincinnati, U.S.A., February, 2005
- 11) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. Neuroscience Lecture Course, Zoology Graduate Program, Miami University. Oxford, U.S.A., March, 2005
- 12) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The XXXVth International Congress of Physiological Sciences 2005. Symposium speaker, San Diego, U.S.A., April, 2005
- 13) Nakafuku M: Transcriptional Control of Neural Stem Cells. Stem Cell Seminar Series at The National Institute of Medical Research. Mill Hill, U.K., April, 2005
- 14) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The 150 Anniversary of Dr. Ludwig Edinger. Keynote speaker, Frankfurt, Germany, April, 2005
- 15) Nakafuku M: Seminar Series at Institute for Stem Cell Research, GSF-National Research Center for Environment and Health. Munich, Germany, April, 2005
- 16) Nakafuku M. Neural Stem Cells and Brain Repair. The EMBO Conference on Mouse Molecular Genetics. Symposium speaker, Heidelberg, Germany, September, 2005
- 17) Nakafuku M: Neural Stem Cells and Brain Repair. The IVth International Conference on Neuroprotection and Neurorepair. Symposium speaker, Magdeburg, Germany, May, 2006
- 18) Nakafuku M. Neural Stem Cells in the Mammalian Central Nervous System. Cold Spring Harbor Laboratory Course: Stem Cells. Lecturer, Cold Spring Harbor, NY, August, 2006
- 19) Nakafuku M. Neural Stem Cells and Brain Repair. The 16th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN). Symposium speaker, Banff, Canada, August, 2006
- 20) 中富浩文、山本真一、杉森道也、川原信隆、中福雅人、桐野高明：成体脳に内在する神経幹細胞、前駆細胞の動態解析—中枢神経組織の再生を目指して—。第60回日本脳神経外科学会総会，岡山，10，2001
- 21) 川原信隆：虚血性神経細胞死と虚血耐性現象について・・・遺伝子発現情報解析を中心に。第4回浜松脳神経障害とフリーラジカル研究会，浜松，11月18日，2002

- 22) 清水立矢、今井英明、富沢真一郎、中村光伸、本田文昭、関 耕二、川原信隆、齊藤延人:ラット局所脳虚血モデルにおける Cyclophilin C-associated protein mRNA の発現. 第 15 回日本脳循環代謝学会総会, 大阪, 10 月, 2003
- 23) 吉河学史 大宅宗一 高井敬介 田中純一 齊藤延人 桐野高明、川原信隆: 一過性前脳虚血モデルを用いたラット線条体における神経再生について. 第 7 回日本分子脳神経外科学会, 東京, 9 月 2-3 日, 2006
- 24) 川原信隆: 脳卒中後の内因性神経再生の再評価. 第 32 回日本脳卒中学会総会, 福岡, 3 月 24 日, 2007

②ポスター発表 (国内 3件、海外 7件)

- 1) Furuya K, Kawahara N, Toyoda T, Kawai K, Kirino T: Direct Approach to the proximal occlusion of the middle cerebral artery of the mice. 20th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and function, Taipei, June, 2001
- 2) Yonekura I, Kawahara N, Nakatomi H, Furuya K, Kirino T: Global cerebral ischemia model by means of three vessel occlusion in C57BL/6 mice. 21st International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, Calgary, June 29-July 3, 2003
- 3) Furuya K, Zhu L, Abe O, Kawahara N and Kirino T: Infarct evolution in LPS-induced resistance to focal cerebral ischemia: a longitudinal magnetic resonance imaging study. 21st International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, Calgary, June 29-July 3, 2003
- 4) Jun-ichi Tanaka, Nobutaka Kawahara, Takaaki Kirino: Age-dependency of endogenous neuronal regeneration following ischemic injury in rat hippocampal CA1 region. Brain 2004, Hong Kong, 10-11th, December, 2004.
- 5) Yonekura I, Kawahara N, Asai A, Kirino T: Null mutation of p53 attenuates hippocampal neuronal death in vivo following global ischemia in mice. 22nd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function, Amsterdam, June 7-11th, 2005
- 6) Cancelliere A, Somekawa K, Nakafuku M. Differential Regenerative Responses of Neural Stem/Progenitor cells in the adult Neocortex and Hippocampus after transient Forebrain Ischemia. Annual Meeting of The Society of Neuroscience 2006, Atlanta, GA, October, 2006
- 7) Sugimori M, Nagao M, Nakafuku M. Role of Mash1 in specification of Oligodendrocytes in the Developing Spinal Cord. Annual Meeting of The Society of Neurosci

ence 2006, Atlanta, GA, October, 2006

- 9) 古屋一英、朱立東、川原信隆、阿部修、桐野高明：局所脳虚血耐性現象：MRIを用いた観察結果. 第61回日本脳神経外科学会, 長野, 10月2—4日、2002
- 10) 大宅宗一、飯島明、斉藤延人、桐野高明、川原信隆: 血管内バルーン閉塞による霊長類一過性全脳虚血モデルの開発, 第65回日本脳神経外科学会総会, 京都, 10月, 2006
- 11) 田中 純一、吉河 学史、桐野高明、川原信隆: 若年および加齢ラットハンチントン病モデルにおける、内在性神経再生を介した外因性成長因子の治療効果. 第65回日本脳神経外科学会総会, 京都, 10月, 2006

(3)特許出願 (国内 件、海外 件)

該当なし

(4)新聞報道等

該当なし

(5)その他特記事項

該当なし

7. 結び

脳を障害する要因にはさまざまなものがあるが、もっともありふれていて、頻度の高いのは脳の血流の障害、すなわち脳虚血による神経細胞死である。その原因が血流の障害である以上、血管の閉塞などの血流の途絶を起こさないような予防的治療や、発生した虚血状態を急速に解除して血流を再開する治療が重要であることは論をまたない。しかし、脳の神経細胞はきわめて虚血に対して脆弱であり、短時間の虚血によって不可逆的な損傷を受ける。なぜこのように脆弱であるかを分子レベルで解明し、その対抗措置をとれば新しい治療法の開発に繋がるはずである。この考え方に立って、先行するCREST研究「遅発性神経細胞死の分子機構」のテーマで研究をおこなった。細胞死の分子機構の一部については有益な研究成果が得られたが、残念ながら有効な脳保護法の開発には至らなかった。そこで、考え方を転じ、脳の再生能力によって神経機能の回復が可能になるのではないかとという仮説のもとに本実験をおこなってきた。このきっかけになったのは、内在性神経前駆細胞による海馬CA1領域の再生・修復を発見したことである。もしこのような治療法が現実的に応用可能であれば、海馬などの障害を起こす短時間の脳虚血（心停止など）において治療の道が開かれることになる。研究を開始するにあたり、再生現象を確実に起こさせる至適条件を海馬および線条体において探る実験をおこなった。また再生の年齢依存性を確認するために若年および老年ラットに虚血負荷を加

えて実験をおこなったが、安定したモデルの作成ができなかった。そこで方向を転じ、毒物による線条体障害のモデルにおいて、再生の年齢依存性を調べた。付随的な実験として皮膚由来幹細胞の移植実験をおこなっている。研究の過程において、遺伝子変異動物における神経細胞の虚血感受性を見ることのできるモデル系としてマウス虚血モデルの確立をおこなった。内在性神経幹細胞による神経再生の分子機構を解明することを目的にしてシンシナチ小児病院の中福グループにおいて、前脳虚血および局所脳虚血モデルを用いた実験をおこなった。

以上の実験により、われわれによりはじめて記載された虚血後の内在性神経幹細胞による再生現象は事実であり、これを強化することによって将来の治療への道が開かれることがはっきりした。しかし、再生の実験は非常に時間と労力を必要とし、結果を出すのが大変であるというのが偽らざる実感である。脳は成体になっても、潜在的再生能力を有しており、常に持続的な再生をおこなっている可能性が高い。その基本的な能力を強化することによって、神経細胞死を原因とする疾患の治療法が開発されて行く可能性を示し、今後の研究の発展の基礎となる事実を示し得たものと考えている。

最後に研究を支援していただいた発展研究事務所のみなさまにあつく御礼申し上げます。



平成19年4月 国立国際医療センター研究所 所長室にてチームメンバーと