



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1510号
学位記番号	第1081号
氏名	神農 英雄
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge (大脳皮質傷害後におけるラミニンスポンジを用いた新生ニューロンの移動促進) Tissue Engineering Part A. Vol. 21 : P.193-201, 2015
論文審査担当者	主査： 澤本 和延 副査： 飛田 秀樹, 齋藤 伸治

論文内容の要旨

[研究目的]

現在、脳傷害によって損傷した脳組織を再生する根本的な治療は確立しておらず、治療法の開発が急務である。近年、幹細胞を用いた再生医療の研究が注目されているが、脳傷害に対する再生戦略の1つとして、脳に内在する神経幹細胞を誘導する方法が挙げられる。側脳室外側壁の脳室下帯には生後も神経幹細胞が存在し、ニューロンが産生され続けている。産生された新生ニューロンは嗅球へ移動した後に成熟、分化する。一方、脳傷害後ではこの新生ニューロンが血管を足場として傷害部方向へ移動することが知られている。そのため、傷害部へ人工的に足場血管を構築することがニューロンの再生を促進する戦略として考えられるが、その効果については不明である。

ラミニン (laminin, LN) は血管基底膜 (basement membrane, BM) の主要な構成成分であり、正常脳では新生ニューロンの移動に重要であることが知られている。血管は三次元の網目構造を呈するため、このような構造と BM 構成成分を有したバイオマテリアルを傷害部へ移植することによって、新生ニューロンを傷害部へ誘導できるのではないかと考えた。我々は人工的な足場血管として BM 構成成分を含有した多孔性スポンジを作製し、マウス外傷性大脳皮質傷害後における新生ニューロンの移動への効果を検証した。

[方法]

1. 2日齢（新生仔）と8週齢（成体）のICRマウスに凍結傷害による外傷性大脳皮質傷害モデルを作製した。イソフルレンによる麻酔下で頭皮切開し頭蓋骨を露出した後、ブレグマから前方へ0.5mm、右側方へ1.2mmの頭蓋骨上へ液体窒素で冷却した直径1.5mmの金属棒の先端を30秒（2日齢）または120秒（8週齢）置いた。その後頭皮を縫合し、保温後ケージへ戻した。
2. BMスポンジ、ゼラチン (gelatin, GE) スポンジ、LNスポンジの作製にはそれぞれ、Matrigel (BD Biosciences 社製)、3% GE (beMatrix Gelatin LS-H、新田ゼラチン社製)、3% GE に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LN (Sigma 社製) を加えたものを用いた。−20°C で凍結した後、25°C、400 rpm の遠心により凍結乾燥を行い、25 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide を用いて架橋結合させた。蒸留水で洗浄し Neurobasal 培地で3時間保温した後、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC (fluorescein-4-isothiocyanate) を加え更に16時間保温した。
3. スポンジの移植では、傷害3日後にイソフルレンによる麻酔下で頭皮切開し、ピンセットを用いて傷害部位の頭蓋骨に小さく穴を開けた後、1.2×1.2×1.2 mm³ 大のスポンジを中へ埋めた。BMゲルの移植では、ガラスマイクロピペットを用いて2 μL を傷害部へ注入した。
4. 免疫組織化学染色では、移植4日後に4% PFA 溶液で灌流固定した後、ビブラトームを用いて厚さ60 μm で冠状断に薄切を行った。切片を10% 正常ロバ血清入り0.2% Triton X-100 PBS 溶液を用いてブロッキングを行った後、染色を行った。一次抗体にはウサギ抗 DCX 抗体、マウス抗 GFAP 抗体、ウサギ抗 Iba1 抗体を用い、二次抗体には Alexa Fluor 標識抗体を用いた。核染色は DAPI を用いた。IX73 蛍光顕微鏡、LSM700 共焦点顕微鏡を用いて観察し、Stereo Investigator を用いて移植領域の DAPI、Iba1、GFAP、DCX 陽性細胞数を定量した。

[結果]

1. 新生仔大脳皮質傷害後、アストロサイトマーカーである GFAP 陽性細胞は傷害部周囲に集積しグリア瘢痕を形成していたが、傷害内には認められなかった。同様に新生ニューロンマーカーである DCX 陽性細胞も傷害内には認められなかった。一方、BM スポンジ移植群では傷害内に GFAP 陽性細胞、DCX 陽性細胞ともに認められた。更に新生ニューロンの突起は BM スポンジに沿っていた。
2. グリア瘢痕は傷害部から炎症の拡大を抑制するバリア機能を有すると考えられているため、BM スポンジ移植によるアストロサイトの傷害内への移動によって炎症の周囲への拡大が起こらないことを、ミクログリアマーカーである Iba1 染色を用いて評価した。グリア瘢痕外における Iba1 陽性細胞の割合は、傷害+非移植群、傷害+BM スポンジ移植群ともに、非傷害群と同程度であった。
3. 新生ニューロン、アストロサイトの移動を促進する BM スポンジの構成成分を同定するため、BM ゲル、GE スポンジ、LN スポンジを傷害部へ移植した。傷害内における GFAP 陽性細胞、DCX 陽性細胞の割合は、LN スポンジ群が BM スポンジ群と同程度で、BM ゲル群、GE スポンジ群より有意に増加した。BM スポンジと同様に、LN スポンジ群では新生ニューロンの突起は LN スポンジに沿っていた。
4. LN スポンジの移植が成体における大脳皮質傷害に対しても同様の効果をもたらすか検証した。傷害内における GFAP 陽性細胞、DCX 陽性細胞の割合は、GE スポンジ群と比較して LN スポンジ群で有意に増加した。更に新生ニューロンの突起は LN スポンジに沿っていた。

[考察]

大脳皮質傷害後に BM、LN スポンジを移植することにより、炎症を拡大させることなく、グリア瘢痕を越えて皮質傷害部へ新生ニューロンを誘導することに成功した。LN を豊富に含む三次元網目構造が足場血管として機能し、新生ニューロンの傷害内への移動を促進したと考えられた。人工足場血管を脳傷害部へ供給する方法が、脳に内在するニューロン再生能を用いた再生戦略の 1 つとなる可能性が示唆された。

(注) 和文で 2, 0 0 0 字以内でまとめる

論文審査の結果の要旨

【背景】脳傷害によって損傷した脳組織を再生する治療は確立しておらず治療法の開発が急務である。再生戦略の1つとして脳に内在する神経幹細胞を誘導する方法が挙げられる。側脳室外側壁の脳室下帯には生後も神経幹細胞が存在し、産生された新生ニューロンは嗅球へ移動した後に成熟する。脳傷害後ではこの新生ニューロンが血管を足場として傷害部方向へ移動することから、傷害部へ人工的に足場血管を構築して多数の新生ニューロンを傷害領域内へ誘導する再生戦略を考えた。本研究では人工的な足場血管として血管基底膜 (basement membrane, BM) の構成成分を有した多孔性スポンジ (BM スポンジ) を作製し、マウス外傷性大脳皮質傷害後における新生ニューロンの移動への効果を検証した。【方法】2日齢 (新生仔) と8週齢 (成体) のICRマウスにイソフルレンによる麻酔下で凍結傷害による大脳皮質傷害を作製した。BMスポンジ、ゼラチン (gelatin, GE) スポンジ、ラミニン (laminin, LN) スポンジはそれぞれ、Matrigel (BD Biosciences 社製)、GE (新田ゼラチン社製)、GE + LN (Sigma 社製) を凍結乾燥後、架橋結合して作製した。傷害3日後に、スポンジの移植では $1.2 \times 1.2 \times 1.2 \text{ mm}^3$ 大のスポンジを傷害部へ埋め、BMゲルの移植ではガラスマイクロピペットを用いて傷害部へ $2 \mu\text{L}$ 注入した。移植4日後に4%PFA溶液で灌流固定した後、冠状断に薄切し、切片をブロッキングした後に染色を行った。標本を蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡で観察し、Stereo Investigatorを用いて移植領域のDAPI、Iba1、GFAP、DCX陽性細胞数を定量した。【結果】新生仔大脳皮質傷害後、GFAP (アストロサイトマーカー) 陽性細胞、DCX (新生ニューロンマーカー) 陽性細胞は傷害領域内に認められなかったが、BMスポンジ移植群ではともに傷害領域内に認められた。アストロサイトはスポンジに沿っており脳血管と同様の構造を呈していた。更に新生ニューロンの突起もスポンジに沿っており、スポンジが移動の足場として機能したことが示唆された。傷害領域外におけるIba1 (ミクログリアマーカー) 陽性細胞の割合は、傷害+非移植群、傷害+BMスポンジ移植群ともに非傷害群と同程度であった。新生ニューロンの移動を促進するBMスポンジの構成成分を同定するため、BMゲル、GEスポンジ、LN (血管基底膜の主成分) スポンジを傷害部へ移植したところ、傷害領域内におけるGFAP陽性細胞、DCX陽性細胞の割合は、BMゲル群、GEスポンジ群と比較してLNスポンジ群で有意に増加した。更に成体の大脳皮質傷害後においても傷害領域内におけるGFAP陽性細胞、DCX陽性細胞の割合は、GEスポンジ群と比較してLNスポンジ群で有意に増加した。【考察】人工足場血管であるLNスポンジの移植によって、炎症を拡大させることなく傷害領域内へ新生ニューロンを誘導することに成功した。本方法が脳に内在するニューロン再生能を用いた再生戦略の1つとなる可能性が示唆された。

【審査の内容】約20分間のプレゼンテーションの後に、主査の澤本、第二副査の齋藤教授は本論文の著者であるため、はじめに第一副査の飛田教授から質問を行った。使用したモデルや試薬に関連した知識の確認、LNの濃度依存性に効果に変化する可能性、スポンジが足場以外の効果をもたらした可能性、細胞移植を用いた再生戦略との比較など、研究の方法や結果の解釈を中心に14項目の質問がされた。澤本からは定量解析法の原理と解析に用いた根拠、スポンジが移動の足場として機能したことを詳細に証明する方法についてなど、研究の方法論や今後の発展性を中心に5項目の質問がなされた。齋藤教授からは新生児脳傷害の臨床に関連して、臨床における新生児脳傷害と今回の脳傷害モデルとの関連性、低酸素性虚血性脳症の分類、治療の現状と展望に関して3項目の質問がなされた。いずれの質問も概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、人工足場血管が大脳皮質傷害後におけるニューロン新生を促進することを示したはじめての研究であり、意義の高い研究である。以上をもって本論文の著者には博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 澤本 和延 副査 飛田 秀樹 齋藤 伸治