



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1573号
学位記番号	第1128号
氏名	藤岡 哲平
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>$\beta 1$ integrin signaling promotes neuronal migration along vascular scaffolds in the post-stroke brain (脳梗塞後の脳内における血管を足場とした新生ニューロンの移動は $\beta 1$ integrin シグナルによって促進される)</p> <p>EBioMedicine. Vol.16 : 195-203, 2017</p>
論文審査担当者	主査： 澤本 和延 副査： 間瀬 光人, 松川 則之

論文内容の要旨

【背景と研究目的】

脳梗塞に対する再生医学的アプローチは、現在発展途上にある。げっ歯類を用いた基礎研究で、脳室下帯に存在する神経幹細胞がニューロンを持続的に産生し、脳梗塞後には新生ニューロンの一部が梗塞巣周囲に移動して成熟することが示された。ヒト脳でも梗塞巣周囲に新生ニューロンが出現することが示唆されている。この内在する神経再生機構を理解し、梗塞巣への新生ニューロンの移動を促進することができれば、神経機能を再生する新たな治療法の開発につながる可能性がある。

脳室下帯から梗塞巣へ移動する新生ニューロンには、鎖状に連なり互いを足場としながら移動する (chain migration) 独特の移動様式がみられる。また新生ニューロンはしばしば血管に沿って移動するが、これらの移動様式を制御する分子メカニズムは大部分が不明である。これまでに、非傷害脳内でみられる chain migration に、接着因子である $\beta 1$ integrin が関与していることが報告されている。一方、 $\beta 1$ integrin のリガンドとなる細胞外マトリックス蛋白の laminin は、血管基底膜の主要構成因子である。よって梗塞巣へ移動する新生ニューロンの chain migration や血管に沿った移動を、laminin- $\beta 1$ integrin シグナルが制御している可能性が考えられた。そこで、 $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウスを用いて脳梗塞モデルを作製し、この仮説を検証した。更に laminin- $\beta 1$ integrin シグナルの操作による新生ニューロンの梗塞巣への移動促進を試みた。

【方法】

- 1) 脳室下帯から梗塞巣への新生ニューロンの移動における $\beta 1$ integrin の役割を解析するため、新生ニューロン特異的に $\beta 1$ integrin 遺伝子をノックアウトした遺伝子改変マウスの中大脳動脈を 50-60 分間にわたって一過性に閉塞し、脳梗塞モデルを作製した。18 日後に固定した脳を薄切し、免疫組織化学染色法にて解析した。また、培養脳切片を共焦点顕微鏡で経時的に撮像し、梗塞巣へ移動する新生ニューロンの挙動を解析した。
- 2) 血管を模した laminin を含む足場様構造物が新生ニューロンの脳梗塞巣への移動を促進するか調べるため、生体内で自己重合するペプチド (PuraMatrix™) と laminin の混合物を脳梗塞惹起後の線条体内に注入し、8 日後に免疫組織化学染色法にて解析した。
- 3) 新生ニューロンの移動形態の制御における $\beta 1$ integrin、laminin の役割を詳細に調べるため、 $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウス新生仔の脳室下帯組織をコラーゲンゲル中で包埋培養し、laminin でコートされた培養皿表面と接触したときの挙動の変化を、微分干渉顕微鏡を用いたタイムラプス撮像法により解析した。

【結果】

- 1) $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウスでは、梗塞巣へ向かって移動する新生ニューロンに以下の表現型がみられた。
 - ・ chain の大きさ (各 chain を構成する新生ニューロン数) の減少
 - ・ 脳室下帯から梗塞巣への移動距離の短縮
 - ・ 血管に沿って移動する新生ニューロンの移動速度の減少

これらの結果は、 $\beta 1$ integrin が chain migration や、血管に沿った細胞移動に必要であることを示唆している。

- 2) 脳梗塞後の線条体に注入した laminin を含むペプチドに沿って、脳室下帯から梗塞巣へ向かって移動する新生ニューロンの数が増加した。また、このペプチドに沿った chain migration がみられた。この結果から、laminin を含む血管模倣構造物が、血管と同様に新生ニューロンの移動を促進することを示している。
- 3) コラーゲンゲル内を移動する新生ニューロンは、laminin でコートされた培養皿底面に接すると chain を形成した。laminin コートしていない培養皿と比較して、laminin コートされた培養皿底面により安定して接着し、高速度で移動した。 $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウス由来の新生ニューロンでは、これらの変化はみられなかった。よって、新生ニューロンの chain 形成および安定した接着による高速移動は、 $\beta 1$ integrin および laminin 依存的であることが示唆された。

【考察】

本研究により、脳梗塞後の脳内における新生ニューロンの chain migration、および血管に沿った移動は、 $\beta 1$ integrin を介する血管基底膜の laminin シグナルによって制御されていることが示唆された。この知見は、細胞移動における血管の役割を明らかにするとともに、laminin- $\beta 1$ integrin シグナルを制御することにより、神経再生を促進する、新しい脳梗塞再生治療の可能性を示すものである。

論文審査の結果の要旨

【背景と研究目的】脳梗塞に対する再生医学的アプローチは、発展途上にある。げっ歯類を用いた研究で、脳室下帯に存在する神経幹細胞から持続的に新生ニューロンが産生されており、脳梗塞後にはその一部が梗塞巣周囲に移動し成熟する。この内在性神経再生機構における梗塞巣への新生ニューロンの移動を促進することは、脳梗塞患者の神経再生を促す新たな治療法の開発につながる可能性がある。脳室下帯から梗塞巣へ移動する新生ニューロンには、鎖状に連なり互いを足場としながら移動し (chain migration)、一部は血管に沿って移動する。この特異な移動様式は新生ニューロンの移動効率に関わると考えられるが、移動様式を制御する分子機序は大部分が不明である。これまでに、非傷害脳内でみられる chain migration に、接着分子受容体である $\beta 1$ integrin が関与するとの報告があり、そのリガンドとなる細胞外基質の laminin は、血管基底膜の主要構成因子である。これらの知見から、梗塞巣へ移動する新生ニューロンの chain migration や血管に沿った移動を、laminin- $\beta 1$ integrin が制御している可能性を考え、検証した。【実験方法と結果】 1) 新生ニューロン特異的 $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウスの中大脳動脈を、50~60 分間にわたって閉塞し脳梗塞モデルを作製し、免疫組織化学染色法および、Time-lapse imaging 法による解析を行った。ノックアウトマウスでは、新生ニューロンの chain 形成が障害され、血管に沿って移動する細胞の移動速度が低下した。これは $\beta 1$ integrin が chain migration や、血管に沿った細胞移動に必要であることを示唆している。 2) 生体内で自己重合するペプチドと laminin の混合物を脳梗塞惹起後の線条体内に注入し、8 日後に免疫組織化学染色法にて解析した。脳室下帯から梗塞巣へ向かって移動する新生ニューロンは、laminin を含むペプチドに沿って chain を形成し、移動する新生ニューロンの数が増加した。これは laminin を含む血管模倣構造物が、新生ニューロンの移動を促進することを示している。 3) $\beta 1$ integrin 遺伝子ノックアウトマウス新生仔の脳室下帯組織をコラーゲンゲル中で包埋培養し、laminin でコートされた培養皿表面と接触したときの挙動の変化を観察した。新生ニューロンは $\beta 1$ integrin、および laminin 依存的に培養皿底面へ安定して接着し、chain 様の構造を形成し、移動速度は増大した。これは新生ニューロンが laminin- $\beta 1$ integrin シグナルにより足場に接着し効率よく移動することを示している。【考察】本研究により、脳梗塞後の脳内における新生ニューロンの chain migration、および血管に沿った移動は、 $\beta 1$ integrin を介する血管基底膜の laminin によって制御されていることが示された。この知見は、細胞移動における血管の役割を明らかにするとともに、laminin- $\beta 1$ integrin の制御により神経再生を促進するという、新しい脳梗塞再生治療の可能性を示すものである。【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後、主査の澤本、第二副査の松川教授は本論文の著者であるため、はじめに第一副査の間瀬教授から質問を行った。使用した遺伝子ノックアウトの仕組み、脳梗塞モデルの作製手技、他の脳傷害モデルとの差異、虚血巣への新生ニューロンの誘導手法、細胞移動と接着の関係など、実験手技、および関連する知識や結果の解釈を中心に、7 項目の質問がされた。澤本からは、新生ニューロンの成熟を促す方法、再生が必要なニューロンのサブタイプ、細胞移植による神経再生への試みとして現在行われている研究など、神経再生医学全般および今後の研究の発展について 4 項目の質問がなされた。松川教授からは、脳梗塞の病態と現在行われている治療の理解、今後の新規治療法の候補となりうる分子など、脳梗塞の臨床に関して 3 項目の質問がなされた。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、脳梗塞後の内在性神経再生において重要な新生ニューロンの傷害部への移動に関して、血管を足場とした移動の分子機序を、接着分子という視点から明らかに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 間瀬 光人 松川 則之