



## Nagoya City University Academic Repository

|         |   |
|---------|---|
| 学位の種類   | 博士 (医学)   |
| 学位記番号   | 第 1000 号  |
| 氏名      | 中口 加奈子  |
| 授与年月日   | 平成 26 年 3 月 25 日  |
| 学位論文の題名 | Growth factors released from gelatin hydrogel microspheres<br>increase new neurons in the adult mouse brain<br>(マウス成体脳における細胞成長因子徐放化製剤のニューロン新生促進効果)<br><br>Stem Cells International Vol.2012 Article ID 915160 7 pages, 2012 |
| 論文審査担当者 | 主査： 飛田 秀樹<br>副査： 浅井 清文, 澤本 和延   |

## 論文内容の要旨

脳は再生が極めて低いことが知られているが、近年、成体哺乳類の側脳室の外側壁に存在する脳室下帯には神経幹細胞が存在し、ニューロンを産生していることが明らかになった。脳梗塞などでニューロンが脱落すると、脳室下帯で産生されたニューロンの一部は、傷害部に移動して成熟することから、内在性の再生機構として注目されている。しかしながら、傷害部に移動するニューロンは少数であり、さらに成熟・分化過程で多くが死滅するため、失われたニューロンの機能を補うことは困難である。そこで、この機構を賦活化することができれば、脳疾患傷害に対する再生医学的アプローチが確立できる可能性がある。

細胞成長因子は、ニューロン新生を強力に促進する。これらの因子を投与すれば、傷害後のニューロンの再生を促進することができると考えられる。しかし、細胞成長因子は、分子量が大きく血液脳関門を通過することが困難であるため、末梢投与では脳内での効果は期待できない。脳実質へこれらの細胞成長因子を直接投与するには、キャピラリーを用いて注入する方法や、浸透圧ポンプを用いて持続注入する方法があるが、前者は投与量に制限があり、また成長因子が早期に分解され効果が持続しないなどの問題がある。後者は感染症などの合併の危険性が高いことが問題となる。そこで、本研究では、これらの細胞成長因子を脳実質内に一定期間持続的に作用させることができ、侵襲性の低い投与方法として、徐放化に着目した。本研究で担体として用いたゼラチンハイドロゲルは、下肢の虚血性疾患に **basic fibroblast growth factor (bFGF)** を吸着させて徐放化製剤として投与すると、血管新生を促進し、病態を改善することが示されているが、脳疾患における細胞成長因子の徐放化投与の効果は検討されていない。そこで我々は、非傷害マウス・脳梗塞モデルマウスを用いて、細胞成長因子の徐放化製剤によるニューロン新生の促進効果について検討を行った。

まず、正常脳においてニューロン新生に対する細胞成長因子徐放化製剤投与の効果を検討した。**Insulin-like growth factor (IGF)-1** は、神経幹細胞や神経前駆細胞の増殖を促進することが知られている。脳室下帯に隣接した線条体に **IGF-1** 徐放化製剤または同量の **IGF-1** を含む溶液を投与し、局所注入 1 週間後の脳室下帯において、新生ニューロンのマーカーである **DCX** を発現する細胞の数を定量した。その結果、**IGF-1** 溶液を投与した群と比較して、**IGF-1** 徐放化製剤を投与した群で有意に新生ニューロン数が増加した。

細胞成長因子の徐放化製剤によるニューロン新生の促進効果が明らかとなったので、次に、脳梗塞後のニューロン再生における細胞成長因子の徐放化投与の効果を検討した。本研究では中大脳動脈閉塞術によって中大脳動脈の血流を一過性に遮断し、線条体や隣接した大脳皮質に梗塞巣が生じるモデルを用いた。**Hepatocyte growth factor (HGF)** は、脳室下帯において神経幹細胞や神経前駆細胞の増殖を促進することや、産生された新生ニューロンを誘引する作用があることが知られている。そこで、脳室下帯から線条体へ新生ニューロンの移動が最も盛んな中大脳動脈閉塞術 11 日目の線条体に、**HGF** 徐放化製剤または同量の **HGF** を含む溶液を局所注入して、一週間後に線条体の **DCX** 陽性新生ニューロン数を定量した。その結果、**HGF** 溶液を投与した群と比較して、**HGF** 徐放化製剤を投与した群では、有意に新生ニューロン数が増加した。

以上より、徐放化は、ニューロン新生を促進させる細胞成長因子を、脳内に局所的に一定期間持続して作用させることができる、有用な手法であることが示唆された。この投与方法の利点として、細胞成長因子を限局的な部位に投与することで、副作用の発現が抑えられ、効果が長期間維持されることにより、投与回数が少数に抑えられることが期待される。今後、

脳内における細胞成長因子の放出量や放出時間などの徐放の特性や、神経機能の回復に与える影響などの検討が必要ではあるが、細胞成長因子の徐放化製剤は、脳梗塞などの脳神経疾患においてニューロンの再生を促進するツールとして、再生医療への応用が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

発生期のみが存在すると考えられていた神経幹細胞は、成体哺乳類脳の側脳室外側壁の脳室下帯に存在し、新生ニューロンを産生している。脳梗塞などによるニューロン脱落時には、脳室下帯で産生された新生ニューロンの一部は傷害部へ移動して成熟する。しかし、移動するニューロンは少数であり、分化・成熟の過程で多くが死滅するため、失われたニューロンの機能を補うことは困難となっている。この機構を活性化することができれば、脳梗塞などの脳傷害に対する再生医学的アプローチが確立できる可能性がある。

ニューロン新生を促進する因子の一つとして、細胞成長因子が知られている。細胞成長因子の投与方法にはいくつか問題点が知られている。分子量が大きいため血液脳関門を通過することが困難であること、脳内へ直接注入する場合は、1回の投与量が制限されること、浸透圧ポンプを用いた脳内持続注入の場合は、感染症などの合併の危険性があること等があげられる。本論文は、侵襲性が低く脳実質内へ持続的に作用させる方法として徐放化製剤に着目し、徐放化製剤であるゼラチンハイドロゲルマイクロスフェアを用い、脳疾患における細胞成長因子徐放化投与のニューロン新生に対する効果を検討した。論文内容の要旨を以下に示す。

正常脳において、細胞成長因子徐放化製剤のニューロン新生に対する効果を検討した。インスリン様成長因子 (IGF-1) は、神経幹細胞の増殖や分化、生存を促進することが報告されている。脳室下帯に隣接した線条体に、徐放化していない IGF-1 溶液、または、IGF-1 徐放化製剤を投与し、一週間後の脳室下帯において、新生ニューロンのマーカーである DCX または、増殖細胞のマーカーである Ki67 を発現する細胞数をそれぞれ定量した。また、脳梗塞後のニューロン新生に対する細胞成長因子徐放化投与の効果について検討を行った。本研究では中大脳動脈閉塞術 (MCAO) によって中大脳動脈の血流を一過性に遮断し、線条体や隣接した大脳皮質に梗塞巣が生じるモデルを用いた。MCAO 後、脳室下帯で産生された新生ニューロンの一部は、傷害部である線条体に移動して成熟するが、その数はごく少数であるため、失われたニューロンの機能を補うことは困難である。そこで、傷害部へ移動する新生ニューロンを増加させる目的で、細胞成長因子徐放化製剤の投与を行った。肝細胞増殖因子 (HGF) は、神経幹細胞の増殖や分化、生存を促進することや、新生ニューロンを誘引することが報告されている。脳室下帯から線条体へ新生ニューロンの移動が最も盛んとなる MCAO 後 11 日目の線条体に、徐放化していない HGF 溶液、または、HGF 徐放化製剤を投与し、1 週間後の線条体において、DCX 陽性細胞数、または、脳室下帯の Ki67 陽性細胞数を定量した。

正常脳では、IGF-1 溶液を投与した群と比較して、IGF-1 徐放化製剤を投与した群において、有意に新生ニューロン数が増加した。細胞増殖には変化がなかったことから、例えば、細胞の分化や生存が促進された結果である可能性がある。次に、脳梗塞後の脳では、HGF 溶液を投与した群と比較して、HGF 徐放化製剤を投与した群において、有意に新生ニューロン数が増加した。脳室下帯の細胞増殖には変化がなかったことや線条体の新生ニューロンが傷害部へ向かって先端突起を伸ばしていることも合わ

せて考えると、細胞の分化や生存が促進され、新生ニューロンが誘引された結果である可能性がある。

本研究によって、徐放化が、脳内において細胞成長因子を局所的に一定期間持続して作用させることができる有用な手法であることが明らかになった。今後、脳内における細胞成長因子の放出量や放出時間など徐放の特性の解析や、新生したニューロンの神経機能の回復に与える影響などの検討が必要ではあるが、細胞成長因子徐放化製剤は、脳梗塞などの脳神経疾患においてニューロンの再生を促進するツールとして、再生医療への応用が期待できると考えられる。

審査委員会におけるスライド発表ののち、主査（飛田秀樹教授）から「正常脳と傷害脳における薬剤の注入部位を変えた理由は何か」など論文に関する 13 項目の質問を行った。次に、第 1 副査（浅井清文教授）から「脳梗塞後の脳に薬剤を注入した時期を選んだ理由は何か」など論文に関する 6 項目の質問を行った。その後、第 2 副査（澤本和延教授）から「再生医学の分野で現在議論されている倫理的な問題について説明せよ」など主科目を中心に 5 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても科学的理解にもとづく十分な回答が得られ、本論文の背景・目的・方法・結果・成果の社会貢献等について十分に理解するとともに、専攻分野（再生医学）に関する知識を習得しているものと判断された。本論文の著者は、博士（医学）の学位を授与するのに相応しいと委員会では判定した。

論文審査担当者 主査 飛田 秀樹

副査 浅井 清文、澤本 和延