

## 論文の内容の要旨

論文題目      成長因子脳室内持続投与に対する成体脳内内在性神経幹細胞の反応に関する時空間的解析

氏名            越智 崇

### 序文

ヒトを含めた様々な哺乳動物種において、成体大脳特定の部位（脳室下帯、海馬歯状回）には、自己複製能と多分化能を保持した神経幹細胞が生涯にわたって存在し、新たな神経細胞を産生し続けることが確認されている。過去十数年にわたる研究により、様々な脳損傷に反応して脳室下層や海馬歯状回における神経細胞の新生が亢進すること、またその新生細胞の一部が損傷によって失われた神経細胞の置換（再生）に寄与することが明らかにされている。このことから、成体脳に内在する神経幹細胞を用いた損傷脳の再生という新しい治療の可能性が考えられるようになった。ただし、内在性神経幹細胞の持つ損傷脳の再生能は通常は極めて限られており、機能回復を含めた損傷脳の有意な修復をもたらすために、いかにその再性能を高めるかが課題となっている。その手段の一つとして、脳室内への成長因子の投与が考えられる。これまでの研究において、様々な生理活性物質が神経幹細胞の活動を制御、修飾することが報告されている。その中でも特に顕著な影響を及ぼす因子として、幹細胞の増殖を直接促進する2型繊維芽細胞成長因子、上皮細胞成長因子があげられる。当教室でも過去の研究において、一過性前脳虚血後のラットの脳室にこの2種類の成長因子を特定の条件で投与する事により海馬CA1領域と線条体における神経細胞の再生を顕著に促進する事に成功した。

しかしながら、成長因子が内在性神経幹細胞の増殖、神経分化に及ぼす影響は、これまでの個体レベルでの研究では十分に明らかにされておらず、この点に関する基礎的な知見のさらなる集積が将来の疾患治療への応用に向けての課題となっている。この点に鑑み、本研究では特に、成長因子（高濃度の2型繊維芽細胞増殖因子と上皮細胞増殖因子カクテル）の脳室内投与の持続期間の相違が神経新生にもたらす影響についてマウスを用いて解析した。

### 方法

成体C57/BL6マウスに上記成長因子カクテルを、浸透圧ポンプを用いて、右側脳室に様々な期間持続注入した。また、投与終了直後の脳だけでなく、投与終了後いくつかの生存期間をおいた脳組織を解析した。組織解析に関しては、凍結脳切片を用いておこなった。形態観察のためにはクレシルバイオレット染色、TTC染色を用いた。また神経幹細胞と神経分化に向かった系譜の細胞群（一過性前駆細胞、神経芽細胞）、生着する新生神経の変化を解析するため各種マーカー（Sox2、Pax6、Ki67、TuJ1、NeuN、GFAP）に対する抗体を用いた免疫染色にて解析を行った。成長因子に反応し分裂した神経幹細胞とその神経分化した細胞の追跡には個体へのBrdU投与と抗BrdU抗体を用いた免疫染色の手法を用い、死細胞の同定はTUNEL染色を行った。

実験は大きく二つのパートに分かれる。実験Ⅰでは、成長因子投与を正常の（脳損傷を加えていない）マウスに持続期間を違えて投与し、脳室下帯における神経幹細胞とその系譜細胞群の反応、そして嗅球における神経新生を解析した実験である。具体的には、成長因子を3日、7日、10日、14日間連続投与し直後の脳組織を解析した。その後、成長因子を7日、14日間連続投与後に、0-28日間の生存期間を設けて成長因子投与終了後の反応を解析した。そして、個体における神経新生に及ぼす影響を解析するためには、成長因子投与に加え BrdU 投与による増殖細胞標識を行い標識細胞の追跡の実験を行った。

引き続き実験Ⅱでは、脳損傷モデルの代表として脳マウス脳虚血モデルを用いて、成長因子投与に対する脳室下帯と海馬歯状回に存在する神経幹細胞とその系譜細胞群の反応を解析した。脳虚血モデルとしては、開頭と電気凝固によるマウス中大脳動脈永久閉塞モデルを使用した。そして、術7日より、前半の実験同様の成長因子を、短期（7日間）、長期（14日間）にわけ脳室内持続投与を行い、脳梗塞後35日（投与終了21日、14日）の時点で解析を行った。解析に際しては、脳室下帯（と嗅球）、海馬歯状回、そして脳梗塞周辺領域での神経幹細胞とその系譜細胞群の反応を解析した。

## 結果

非脳損傷成体マウスを用いた実験Ⅰで以下の知見を得た。まず、成長因子投与が脳内で神経新生を増幅する機構が明らかとなった。成長因子持続投与を短期間（7日間以下）継続した場合、神経幹細胞（と一過性前駆細胞）が継続期間に比例して著明に増幅する一方で、未熟な神経細胞（神経芽細胞）の産生（神経新生）は逆に抑制されてしまった。しかし、成長因子投与を終了すると、それが引き金となり、増幅された幹細胞/一過性前駆細胞が分化に向かう一定期間の後に、有意な神経芽細胞の増殖が脳室下帯にみられた。これに伴って、投与終了後に産生され嗅球へと供給される神経細胞の数も、著明に増加していた。すなわち、成長因子投与により個体内で神経新生を増幅する機構が明らかとなった。

また、別の重要な知見として、7日を超える長期間の成長因子持続投与の弊害をも明らかとした。7日より長期に成長因子の投与を継続すると、神経新生の抑制は同様にみられたが、神経幹細胞/一過性前駆細胞の増殖応答、投与終了後の神経細胞の産生が徐々に減弱していく事が判明した。さらに、長期投与（14日間）群で投与後の経過を観察すると、7日投与群と同様の経過をたどったが、14日間投与群では7日間投与群よりも、投与終了後の一過性の神経細胞の産生促進効果は弱く、それに伴う嗅球へと供給される神経細胞も有意に少なかった。

実験Ⅰの知見をもとにして計画した実験Ⅱでは、虚血脳においても実験Ⅰの知見が同様に観察されるか検討した。すると、虚血脳においても脳梗塞35日目の時点において、短期投与群、長期投与群とも成長因子投与による脳室下帯での神経幹細胞の増幅と神経芽細胞の産生増幅がみられた。加えて、脳梗塞35日目の時点における個体内に生着した新生神経の数を比較すると、実験Ⅰと同様の投与期間長期化による神経新生の減弱化が虚血脳においても観察された。すなわち、嗅球に生着した神経細胞の数は、7日投与群は著明に増幅していた一方で14日投与群は対照群より有意に少なく、海馬歯状回においても同様に、生着した新生神経は7日投与群では著増したが、14日投与群は対照群と同程度しか見られなかった。また脳梗塞周辺領域においては、成長因子投与群における対照群と比較した新生神経増幅効果は見られずむしろ減弱している印象であったが、成長因子14日投与群は対照群に比較して生着した新生神経はやはり有意に少なく長期投与による減弱効果が一貫して観察された。

## 考察とまとめ

本研究では成長因子脳室内投与の持続期間の相違が幹細胞／前駆細胞の増殖と神経新生にもたらす影響とその経時変化について、非脳損傷成体マウスと脳虚血マウスを用いて解析した。その結果、本治療法の臨床応用に向けて基盤となる重要な知見が得られた。

まず重要なことに、成長因子の持続的な脳室内投与により神経幹細胞の著明な増殖促進が起こることが明らかになった。続いて、増幅した神経幹細胞を、実際の神経新生亢進に結びつけるためには、成長因子投与だけでなくその投与終了もまた必須であることを明らかとした。すなわち、成長因子投与は主として神経幹細胞を強力に増幅させるが、投与期間中は神経新生を犠牲にってしまう。しかし、投与終了一定期間の間に、増幅した神経幹細胞が分化に向かうことで、一過性の未熟な神経新生の著明な産生亢進を引き起こした結果、投与中の神経新生抑制を代償するのみならず、個体内の神経新生亢進を引き起こすのである。

また、今回の一連の実験で特に重要な知見は、成長因子投与期間の違いが、正常経路の神経新生に大いに影響を与えるということである。すなわち、投与期間を延長すると、それに比例した神経新生効果の亢進が得られるわけではなく、一定期間（われわれの実験では 7 日間）の後は、神経幹細胞の刺激効果は減弱し、投与終了に引き続く神経幹細胞の分化による神経（芽）細胞産生効率も減弱してしまい、嗅球や海馬歯状回に新たに生着する神経数も少なくなってしまう。一方興味深いことに、正常の状況では神経新生が起こらない皮質や線条体などの脳梗塞周辺部位の神経新生に対しては、今回の実験では成長因子投与の促進効果がみられず（対照群と有意差なし）、むしろ対照群に比較して生着した新生神経数は少ない印象であった。この点に関しては、成長因子投与開始時期の検討や、神経細胞以外の細胞における成長因子投与の影響の解析が今後の大きな課題として残った。ただし、成長因子投与による神経新生促進効果がみられなかった脳梗塞周辺領域においても、成長因子投与長期化群では、対照群よりも有意に生着する神経新生が減少していた。すなわち、成長因子投与期間の違いが、神経新生に大いに影響を与え、長期化すると新生神経効率は減弱してしまう現象が、恒常的神経産生部位においても、通常神経新生がみられない脳梗塞周辺部位においても共通して観察された。

以上より、内在性神経幹細胞を成長因子投与により刺激するためには、最適な投与期間を選択することが極めて重要であると考えられた。本治療法で、損傷脳の再生を実現するには、この知見をもとにしたさらなる検討が望まれる。