

氏 名 さとう ひかり
佐藤 光

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 123 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **PDGFR- β plays a key role in the ectopic migration of neuroblasts in cerebral stroke**
(血小板由来増殖因子 β 受容体は脳梗塞後にみられる神経芽細胞の異所性遊走に重要な役割を担う)

論文審査委員

(主査)	教 授	田中 耕太郎
(副査)	教 授	二階堂 敏雄
(副査)	教 授	西条 寿夫
(副査)	教 授	戸邊 一之
(指導教員)	教 授	黒田 敏

論文内容の要旨

〔目的〕

成体脳に内在する神経幹細胞を介する神経新生は、損傷後の脳において促進されることが知られている。この神経新生を促進する事による損傷脳の機能を回復することは、現在の脳科学の重要な研究課題の一つである。血小板由来増殖因子 (PDGF) は間葉系細胞に対する増殖因子であり AA、AB、BB、CC、DD のリガンドおよび $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ からなる受容体 (PDGFR) より形成されるシステムである。梗塞脳では PDGFR- β は脳梗塞による刺激で誘導されることが知られているが、梗塞脳における役割は明らかではない。近年の培養細胞の実験では、 β 受容体が神経幹細胞の機能制御における役割が示されつつある。本研究では条件的に β 受容体を消失させたマウスモデルに脳梗塞を作成し、その後の神経幹細胞の動態を中心として経時的に病変部位の解析を行い、神経新生が誘導される機序を検証した。

〔方法〕

実験動物として、Cre-loxP システムに従って作成された PDGFR- β の conditional knockout mouse を用いた。10.5 日齢の胎児の神経上皮細胞で主として遺伝子改変が発生するモデル (Nestin-KO) と、生後 4 週齢で Tamoxifen をマウスに投与することにより全身で遺伝子改変を誘導するモデル (Esr-KO) を用いた。遺伝子改変をしない PDGFR- β 発現の保たれたマウスを対照群 (Control) として用いた。8-12 か月齢の遺伝子改変 C57BL/6 マウスの内頸動脈にフィラメントを 30 分挿入し脳梗塞を作成した。術後 2、5、7、14、21、35 日目の脳組織標本を免疫組織化学等により解析した。脳梗塞巣に発現する mRNA を micro array で定量し、それらに対応する抗体を用いた染色、qRT-PCR による解析、分離

培養した神経幹細胞を用いた Self-renewal assay、Radial migration assay 実験を組み合わせ、解析を行った。

〔結果〕

- 1、免疫組織化学により、Control では、梗塞脳の新生血管の周皮細胞と脳室下帯 (SVZ) の神経幹細胞に PDGFR- β が発現し、Nestin-KO では後者のみ、Esr-KO では両者の発現が消失していた。
- 2、Control 群では脳梗塞後 14 日目から急激に側脳室下帯と脳梗塞に囲まれた peri-infarction area へ多くの神経芽細胞が遊走していた。Nestin-KO 群では脳梗塞後 2 日目からすでに多くの神経芽細胞の遊走が始まっており、Control 群に比較して長期間にわたって当該領域への神経芽細胞の遊走がみられた。また、全身性に PDGF- β 受容体発現を抑制した Esr-KO では神経芽細胞の遊走の亢進は見られなかった。
- 3、Micro array 解析から、遊走に関わる因子として *Cxcl12*、*Integrin $\alpha 3$* の発現が Nestin-KO 群で有意に上昇しており、qRT-PCR でも類似の結果が得られた。免疫染色では、CXCL12/SDF-1 が反応性アストログリアに、*integrin $\alpha 3$* が遊走する神経芽細胞で、Nestin-KO の peri-infarction area に強く発現が見られた。
- 4、培養した神経幹細胞の Migration 能力を検討したところ、Nestin-KO 群では Control 群に比べて 細胞外基質に多く見られる fibronectin と血管周囲にみられる collagen type IV 上でより広範囲に遊走していた。
- 5、脳室下帯から分離培養した神経幹細胞の増殖を self-renewal assay で検討したが、Nestin-KO 群と Control には細胞増殖能力に有意な差は認めなかった。

[考察]

脳梗塞後 2-3 週間後に peri-infarction area に向かって神経芽細胞が遊走するとの報告が多いが、そのきっかけとなる分子についてはまだ十分知られていない。今回の我々の研究では、PDGFR- β が脳梗塞後の神経芽細胞遊走の時期に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

PDGFR- β が神経系特異的に発現抑制された場合は早期から、多数の神経芽細胞の遊走がみられる一方で、全身性に PDGFR- β が発現抑制されたマウスでは control 群と同様な結果だった。これは早期に神経芽細胞が遊走するには、脳梗塞に影響される神経系と神経系以外の PDGFR- β を発現する細胞が関与している事を示唆した。これを説明し得るものとして micro array, qRT-PCR の結果から integrin $\alpha 3$ と CXCL12/SDF-1 の存在が推測された。実際に蛍光免疫組織染色で PDGFR- β 発現抑制したマウスで peri-infarction area と脳室下帯-吻側移動経路での integrin $\alpha 3$ の発現が強く、神経系細胞特異的に PDGFR- β 発現を抑制したマウスで peri-infarction area での CXCL12/SDF-1 の発現が有意に強くみられた。

脳梗塞後にみられる神経芽細胞の peri-infarction area への遊走は血管に沿って chain-like formation として見られる事が報告されている。本研究でも神経芽細胞は血管周囲に沿って遊走が見られていた。PDGFR- β 発現を抑制された neurosphere は傷害組織にみられる fibronectin、血管に発現する collagen type IV で特に遊走能が高く、神経系特異的に PDGFR- β 発現を抑制されたマウス脳では脳梗塞刺激に対して、fibronectin や collagen type IV に親和性を持った integrin $\alpha 3$ の発現が神経幹細胞系に誘導され、CXCL12/SDF-1 の影響を受けて早期から peri-infarction area にむけて神経芽細胞の遊走が始まると考えられた。

[総括]

神経系細胞に発現する PDGFR- β は脳梗塞に対する神経芽細胞遊走に重要な役割を果たしている事が示された。PDGFR- β 発現のコントロールが、神経新生により脳梗塞を再生させる試みの標的になりうる事を示唆するものであった。

学位論文審査の要旨

〔目的〕

成体脳に内在する神経幹細胞を介する神経新生は、損傷後の脳において促進されることが知られている。この神経新生を促進する事による損傷脳の機能を回復することは、現在の脳科学の重要な研究課題の一つである。血小板由来増殖因子 (PDGF) は間葉系細胞に対する増殖因子であり AA、AB、BB、CC、DD のリガンドおよび $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ からなる受容体 (PDGFR) より形成されるシステムである。梗塞脳では PDGFR- β は脳梗塞による刺激で誘導されることが知られているが、梗塞脳における役割は明らかではない。近年の培養細胞の実験では、PDGFR- β が神経幹細胞の機能制御における役割が示されつつある。本研究では条件的に PDGFR- β を消失させたマウスモデルに脳梗塞を作成し、その後の神経幹細胞の動態を中心として経時的に病変部位の解析を行い、神経新生が誘導される機序を検証した。

〔方法〕

実験動物として、Cre-loxP システムに従って作成された PDGFR- β の conditional knockout mouse を用いた。10.5 日齢の胎児の神経上皮細胞で主として遺伝子改変が発生するモデル (Nestin-KO) と、生後 4 週齢で Tamoxifen をマウスに投与することにより全身で遺伝子改変を誘導するモデル (Esr-KO) を用いた。遺伝子改変をしない PDGFR- β 発現の保たれたマウスを対照群 (Control) として用いた。8-12 か月齢の遺伝子改変 C57BL/6 マウスの内頸動脈にフィラメントを 30 分挿入し脳梗塞を作成した。術後 2、5、7、14、21、35 日目の脳組織標本を免疫組織化学等により解析した。脳梗塞巣に発現する mRNA を micro array で定量し、それらに対応する抗体を用いた染色、qRT-PCR による解析、分離

培養した神経幹細胞を用いた Self-renewal assay、Radial migration assay 実験を組み合わせ、解析を行った。

〔結果〕

1. 免疫組織化学により、Control では、梗塞脳の新生血管の周皮細胞と脳室下帯 (SVZ) の神経幹細胞に PDGFR- β が発現し、Nestin-KO では後者のみ、Esr-KO では両者の発現が消失していた。
2. Control 群では脳梗塞後 14 日目から急激に側脳室下帯と脳梗塞に囲まれた peri-infarction area へ多くの神経芽細胞が遊走していた。Nestin-KO 群では脳梗塞後 2 日目からすでに多くの神経芽細胞の遊走が始まっており、Control 群に比較して長期間にわたって当該領域への神経芽細胞の遊走がみられた。また、全身性に PDGF- β 受容体発現を抑制した Esr-KO では神経芽細胞の遊走の亢進は見られなかった。
3. Micro array 解析から、遊走に関わる因子として *Cxcl12*、*Integrin $\alpha 3$* の発現が Nestin-KO 群で有意に上昇しており、qRT-PCR でも類似の結果が得られた。免疫染色では、CXCL12/SDF-1 が反応性アストログリアに、integrin $\alpha 3$ が遊走する神経芽細胞で、Nestin-KO の peri-infarction area に強く発現が見られた。
4. 培養した神経幹細胞の Migration 能力を検討したところ、Nestin-KO 群では Control 群に比べて 細胞外基質に多く見られる fibronectin と血管周囲にみられる collagen type IV 上でより広範囲に遊走していた。
5. 脳室下帯から分離培養した神経幹細胞の増殖を self-renewal assay で検討したが、Nestin-KO 群と Control には細胞増殖能力に有意な差は認めなかった。

〔総括〕

今回の研究では、PDGFR- β が脳梗塞後の神経芽細胞遊走の時期に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。早期に神経芽細胞が peri-infarction area にむけて遊走するには、脳梗塞に影響される神経系と神経系以外の PDGFR- β を発現する細胞が関与している事が示唆された。これを説明し得るものとして micro array, qRT-PCR の結果から integrin $\alpha 3$ と CXCL12/SDF-1 の存在が推測された。これらの結果から、PDGFR- β 発現のコントロールが、神経新生により脳梗塞を再生させる試みの標的になりうる事が示された。

以上のことから、PDGFR- β 発現のコントロールが、神経新生により脳梗塞を再生させる試みの標的になりうる事を初めて明らかにした点は新規性があり、脳梗塞再生医療に関する研究を進展させた理由により医学における学術的重要性も高く、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。