

Title	Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) Enhances Neurogenesis and Angiogenesis following Focal Cerebral Ischemia in Rats
Author(s)	杉浦, 史郎
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45408
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	すぎ 杉 浦 史 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 9 2 4 7 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) Enhances Neurogenesis and Angiogenesis following Focal Cerebral Ischemia in Rats (ラット局所脳虚血モデルにおける HB-EGF 遺伝子導入による神経細胞新生及び血管新生の亢進)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 畑澤 順

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

成熟脳においても側脳室下層 (subventricular zone ; SVZ) や海馬歯状回顆粒下層 (subgranular zone ; SGZ) に神経幹細胞が存在し、神経栄養因子によってそれらの増殖・分化が亢進するとの報告がなされて以来、脳梗塞などの中枢神経系疾患に対する神経栄養因子を用いた神経細胞新生促進治療が注目されている。しかし蛋白質の多くは血液脳関門を通過しにくく半減期が短いため、脳室内や脳実質内へ持続又は反復投与する必要があり、カテーテル留置による感染や脳損傷などのリスクを伴う。一方、遺伝子導入という手法を用いれば、単回投与により脳内での一定期間の蛋白質発現を得ることができる。従って、脳梗塞亜急性期に神経再生促進を目指した遺伝子治療を開発することは臨床的に有用と考えられる。

Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) は *in vitro* で神経幹細胞の分裂亢進作用を示し、脳虚血モデルにおいても神経幹細胞や神経前駆細胞の分裂を促進することが報告されている。また培養血管内皮細胞や角膜では血管新生 (angiogenesis) を促進させると報告されている。今回、我々はラット脳梗塞モデルを用いて HB-EGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (Adeno-HB-EGF) の単回の脳室内遺伝子導入により神経細胞新生 (neurogenesis)、angiogenesis 及び機能回復を促進することができるか否かについて検討した。

【方法】

成熟雄性ウィスターラット (体重 250~300 g) を用いて、塞栓系による一過性 (80 分間) 中大脳動脈閉塞モデルを作製し、虚血 3 日後に Adeno-HB-EGF 又はコントロールとして Adeno-lacZ (各 1.1×10^{10} pfu/ml) を $10 \mu\text{l}$ 脳室内へ投与した (各 $n=16$)。増殖細胞を標識するため、虚血 6、7 日後に bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) を 1 日 2 回腹腔内投与し、8 又は 28 日後に断頭後、SVZ 及び線条体において組織学的評価を行った。導入遺伝子発現の確認は抗 HB-EGF 抗体を用いた免疫組織化学染色及び X-gal 染色にて行った。梗塞サイズは Hematoxylin-eosin 染色切片を用いて評価した。neurogenesis については、抗 BrdU 抗体及び神経細胞系の各分化段階のマーカー (神経

幹/前駆細胞 : Nestin、神経前駆/幼若神経細胞 : Doublecortin (DCX)、幼若/成熟神経細胞 : β -tubulinIII (Tuj-1)、成熟神経細胞 : Microtubule-associated protein 2 (MAP2)、Neuronal nuclei (NeuN)) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色にて評価した。angiogenesis は抗 BrdU 抗体及び抗 laminin 抗体を用いて免疫組織化学染色にて評価した。また、運動機能についてはロタロッドテストにて経時的に評価した。

【成績】

導入遺伝子の発現は脳室投与後 1～14 日後にかけて主に脳室上衣細胞で認められた。梗塞サイズは 2 群間で有意差を認めなかった。Adeno-HB-EGF 投与群ではコントロール群と比べて、虚血 8 日後での虚血側 SVZ における BrdU 陽性細胞の有意な増加を認めた。BrdU/Nestin、BrdU/DCX 二重陽性細胞数についても同様の結果であり、Adeno-HB-EGF 脳室内投与により SVZ の神経幹細胞の増殖が促進されたと考えられた。また、BrdU/DCX 二重陽性細胞が SVZ から梗塞巣へ向かって移動する chain-like migration が観察された。虚血 28 日後には線条体において BrdU/Tuj-1、BrdU/MAP2 二重陽性細胞を認め、新たに増殖した神経幹細胞が成熟神経細胞へ分化したと考えられた。BrdU/NeuN 二重陽性細胞は Adeno-HB-EGF 投与群でコントロール群と比べて有意に多く認められた。また、Adeno-HB-EGF 投与群では、虚血 8 日後の虚血側線条体において angiogenesis の亢進を認めた。虚血後悪化した運動機能は Adeno-HB-EGF 投与により虚血 14 日後以降にコントロール群と比べ有意な改善を認めた。

【総括】

脳虚血発症 3 日後での HB-EGF 遺伝子の単回の脳室内投与により、虚血側線条体における neurogenesis 及び angiogenesis の亢進、さらに運動機能回復の促進が観察された。脳梗塞亜急性期における HB-EGF を用いた遺伝子治療により、内因性神経幹細胞からの neurogenesis の亢進とそれに伴って神経後遺症の回復が促進される可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、脳梗塞に対する神経栄養因子を用いた神経再生治療が注目されているが、神経栄養因子の多くは血液脳関門を通過しにくく半減期が短いため、数日間に亘る脳室内への持続的な投与の必要がある。一方、遺伝子導入という手法を用いれば単回投与により一定期間の蛋白質発現を得ることができるため、神経再生促進を目指した遺伝子治療を開発することは臨床的に有用と考えられる。本研究は、神経幹細胞増殖作用や血管新生促進作用を有する Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) の遺伝子治療による神経再生促進効果について検討することを目的とした。

ラット中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを用いて、虚血 3 日後に HB-EGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターまたはコントロール群として β -galactosidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを脳室内へ単回投与し、神経細胞新生及び血管新生について免疫組織化学染色にて評価した。また運動機能の変化をロタロッドテストにて経時的に評価した。

HB-EGF 遺伝子導入により、虚血 8 日後における虚血側側脳室下層の神経幹/前駆細胞の増殖が促進された。それらの細胞は梗塞巣に向かって移動し、虚血 28 日後には線条体において成熟神経細胞へ分化することが確認された。また、HB-EGF 遺伝子導入により、虚血側線条体における血管新生の亢進を認めた。虚血作成後悪化した運動機能は、HB-EGF 遺伝子導入により虚血 14 日後以降にコントロール遺伝子導入群と比べ有意な改善を認めた。

脳虚血作成 3 日後という脳梗塞亜急性期での単回の遺伝子治療により、神経再生及びそれに伴う神経後遺症回復が促進されることを初めて示した。脳梗塞亜急性期での神経再生を目指した遺伝子治療の有用性を示した点で意義深く、学位に値すると考える。