

## 成体虚血脳における内因性神経幹細胞の制御を用いた新規脳梗塞治療の開発

瀬原吉英

自治医科大学分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部

### 【研究の背景】

ヒトの成体脳においても神経細胞の新生が持続しているということが発見され、この神経新生が起きている部位（側脳室下帯、海馬歯状回）について精力的な研究が行われてきているが、その制御機構については未知である。特に、虚血、外傷、変性疾患、てんかんの侵襲を契機に内因性神経新生が促進されるが、その数は脱落する神経細胞に比べると極めて少ないため、脳機能の回復には不十分である。しかしながら損傷脳組織に神経新生が見られるということは、人為的に神経新生を促進することができれば、脳虚血後の機能回復を促進できる可能性を示唆している。

一方、細胞の運命決定は、DNA メチル化やヒストン修飾と言ったエピジェネティックな遺伝子発現制御機構によって支配されていることが近年解明されつつある。そのひとつポリコーム群タンパク質（以下、ポリコーム）は、ヒストンメチル化を介して遺伝子の転写抑制を行い、胎生期の神経新生や神経回路網の形成、癌細胞の増殖等に重要な役割を果たすことが報告されている（Yadiri et al, Stem Cells, 2011）。

### 【目的】

成体脳においては、側脳室下帯と海馬歯状回においてのみ神経細胞新生（神経新生）が認められる。この神経新生は虚血などの脳損傷で促進されるが、新生する細胞数は極めて少なく、脳機能の回復には十分でない。そこで本研究では、虚血侵襲後の成体脳の神経幹細胞の制御機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、転写抑制を行うとされるポリコーム群蛋白複合体に注目し、これらが海馬歯状回の神経幹細胞へ与える運命転換について研究することにより、神経新生促進技術の開発を行う。

### 【方法】

本研究では、スナネズミ（オス、6 週齢）の一過性全脳虚血モデルを用い、[1] 海馬歯状回の新生神経細胞数とポリコームの定量を行い、虚血後脳における経時的变化を明らかにする。[2] 続いて、得られたポリコームの経時的变化の結果を基に、特異的阻害剤や低分子干渉 RNA の投与を行い、ポリコームの調節が全脳虚血後の海馬神経新生の状態変化（分裂細胞数や分化の状態の変化、グリア活性化）に与える影響を検討する。

### 【結果】

今回、我々は全脳虚血モデルとしてスナネズミ（オス、6 週齢）を用いた。ラットに比べ、スナネズミは側副血行路に乏しく、両側総頸動脈の一過性閉塞（2-vessel occlusion）のみで再現性の高い海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死が誘発されるためである。一方で、ラットは 4-vessel occlusion（両側内頸動脈と両側椎骨動脈閉塞）を行い、手術を 2 日間に分けて行う必要がある。

#### [1] 一過性全脳虚血後の海馬歯状回の新生神経細胞数とポリコームの定量

5 分間の一過性全脳虚血後に海馬歯状回レベルで冠状断を作成し、subgranular zone における Ki-67 陽性細胞数の経時的变化を定量した（図 1）。全脳虚血 4 日後から有意な増加を認め、以降はさらに増加を認めた。

また、ポリコーム群タンパク質のひとつ Ezh2 の発現が、神経新生に先立って 2 日目から上昇し、3 日目にピークに達した（図 2）。

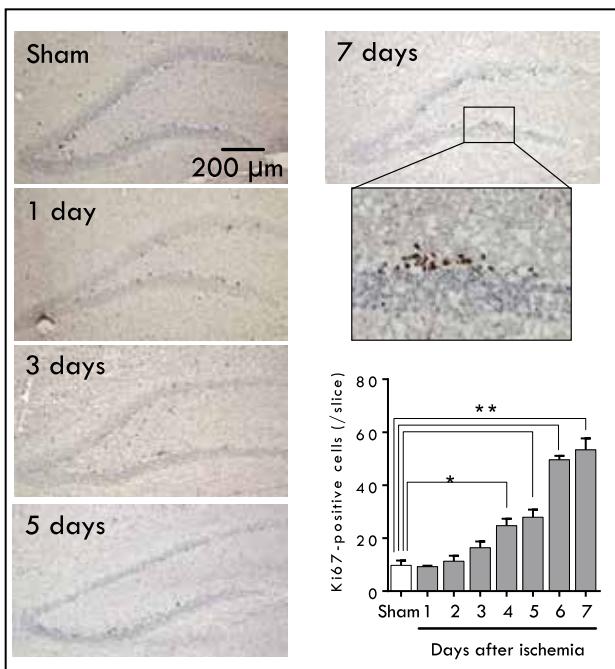


図 1. スナネズミ一過性全脳虚血後の海馬歯状回 subgranular zone における Ki-67 陽性細胞数の変化 ( $n = 3$ )。全脳虚血 4 日後から有意な増加を認め、以降はさらに増加を認めた。

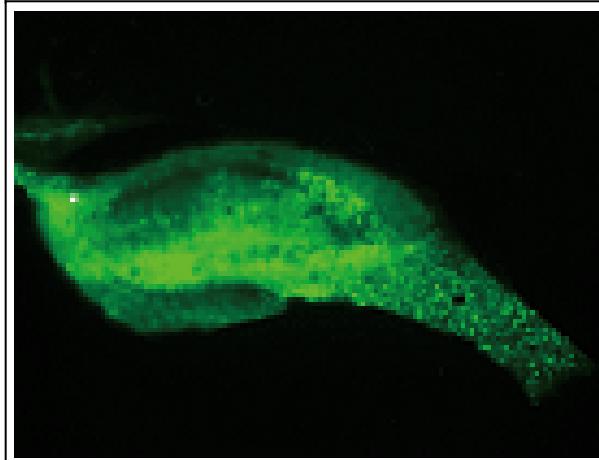


図 3. GFP 搭載のアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を海馬に直接投与し、3 週間後の発現を調べた。海馬全体に GFP の強い発現を確認した。

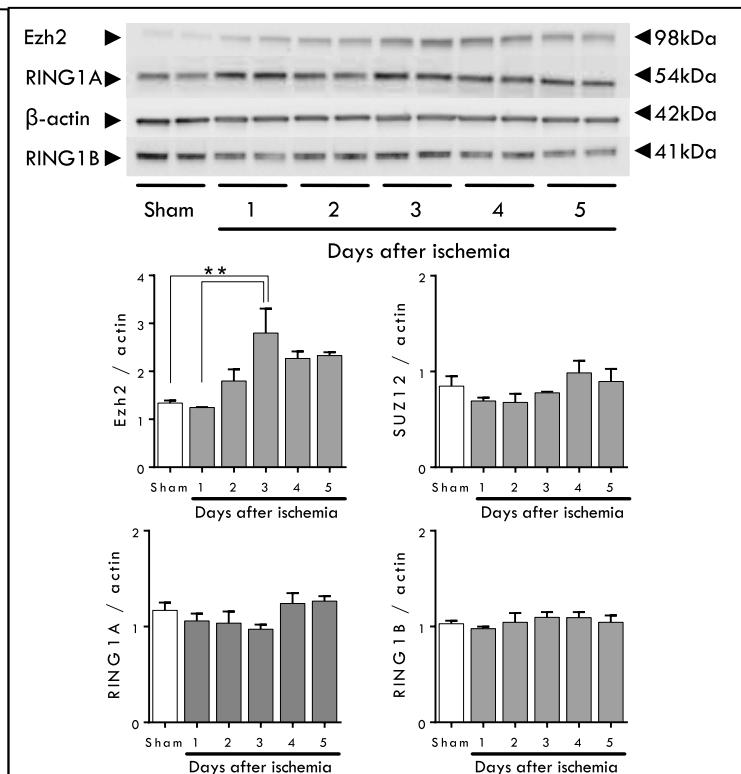


図 2. スナネズミ一過性全脳虚血後の海馬歯状回のポリコーム群タンパク質の経時的变化 ( $n = 4$ )。海馬歯状回における Ezh2 は、虚血 3 日後にピークを認め、その後は再び減少した。この減少の後、図 1において Ki-67 陽性細胞の増加を認めた。

## 【考 察】

これらのデータは、Ezh2 による転写抑制が神経新生の誘導にかかわっている可能性を示唆している。今後は、上記のデータに基づき、ポリコームのひとつ Ezh2 の機能を阻害することで細胞の運命決定を人為的に操作し、成体虚血脳の神経新生を促進することを目的として、下記の研究を行う。

[1] 成体ラット一過性全脳虚血モデルを用い、選択的 Ezh2 阻害剤の投与による海馬神経新生並びに脳機能回復効果の検討。

[2]Ezh2 低分子干渉 RNA (siRNA) の投与による海馬神経新生並びに脳機能回復効果の検討。

[2]についてはアデノ随伴ウイルス (AAV) の強い発現を海馬で確認できており(図 3)、AAV を利用した siRNA 発現も問題ないと予測している。

いずれの項目においても、組織学解析、生化学解析、行動学解析を補完的に組み合わせることにより、Ezh2 機能阻害による神経新生効果を詳細に検討する。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで、虚血脳の治療法の開発は神経細胞死の阻害を標的に行われてきたが、その成果は十分と言えない。申請者の提唱する「Ezh2 機能阻害による神経新生促進」は、虚血脳の治療法に新しい視点をもたらすものである。内因性神経新生を制御することができるようになれば、急性期のみならず慢性期においても有効な治療法になる可能性があり、その適応は脳虚血後のみならず変性疾患や外傷にも広がると予測される。

#### 【参考・引用文献】

Conditional activation of Bmi1 expression regulates self-renewal, apoptosis, and differentiation of neural stem/progenitor cells in vitro and in vivo.

Yadirgi G, Leinster V, Acquati S, Bhagat H, Shakhova O, Marino S. Stem Cells. 2011;29(4):700-12.