

## 目次

はじめに .....	1
緒言 .....	1
略語 .....	7
第 1 章    成体マウス DG 由来 NPCs の増殖における Protease activated receptor-1 の役割 .....	9
1.1    背景・目的 .....	9
1.2    方法 .....	11
1.2.1.    動物飼育 .....	11
1.2.2.    培養 dish の作成 .....	11
1.2.3.    成体マウス DG 由来 NPCs の培養 .....	11
1.2.4.    MTT 法 .....	13
1.2.5.    ELISA による BrdU の取り込み能の測定 .....	13
1.2.6.    分化誘導 .....	13
1.2.7.    LDH 活性測定 .....	14
1.2.8.    mRNA の調製 .....	14
1.2.9.    RT-PCR 法 .....	15
1.2.10.    免疫細胞化学法 .....	15
1.2.11.    脳室内投与 .....	17
1.2.12.    組織の固定と包埋 .....	17
1.2.13.    免疫組織化学法 .....	18
1.2.14.    成体マウス DG 由来 NPCs のホモジネートの調製 .....	19
1.2.15.    タンパク質レベル測定 .....	19
1.2.16.    データ解析 .....	20
1.3.    結果 .....	21
1.3.1.    成体マウス DG 由来 NPCs の培養 .....	21
1.3.2.    成体マウス DG 由来 NPCs の PAR の発現解析 .....	24
1.3.3.    NPCs の増殖能に対する thrombin の効果 .....	25

1.3.4.	Thrombin による NPCs の増殖能低下に対する thrombin 阻害剤の 効果 .....	27
1.3.5.	Thrombin による NPCs の増殖能低下に対する PAR-1 アンタゴニスト の効果 .....	28
1.3.6.	NPCs の増殖能に対する AP の効果 .....	30
1.3.7.	Thrombin および AP の培養 NPCs に対する細胞障害性 .....	32
1.3.8.	Thrombin および AP の培養 NPCs に対する分化誘導性 .....	32
1.3.9.	成体マウス DG における PAR-1 の発現 .....	34
1.3.10.	AEBSF または AP の成体マウス DG 顆粒細胞層下帯におけるニュー ロン新生に対する効果 .....	35
1.3.11.	PAR-1 活性化による RhoA タンパク質の発現量に対する影響 .....	37
1.3.12.	Thrombin および AP 曝露による培養 NPCs の増殖能低下に対する Rho キナーゼ阻害剤の効果 .....	38
1.4.	考察 .....	41
第 2 章	成体マウス DG ニューロン障害後のニューロン新生における PAR-1 の役割 .....	44
2.1.	背景・目的 .....	44
2.2.	方法 .....	45
2.2.1.	動物飼育 .....	45
2.2.2.	薬物投与 .....	45
2.2.3.	培養 dish の作成 .....	45
2.2.4.	TMT 処置後の成体マウス DG 由来 NPCs の培養 .....	45
2.2.5.	MTT 法 .....	45
2.2.6.	ELISA による BrdU の取り込み能の測定 .....	45
2.2.7.	分化誘導 .....	45
2.2.8.	LDH 活性測定 .....	45
2.2.9.	mRNA の調製 .....	45
2.2.10.	RT-PCR 法 .....	45
2.2.11.	免疫細胞化学法 .....	46

2.2.12.	組織の固定と包埋 .....	47
2.2.13.	免疫組織化学法 .....	47
2.2.14.	ホモジネートの調製 .....	47
2.2.15.	タンパク質レベル測定 .....	47
2.2.16.	データ解析 .....	47
2.3.	結果 .....	48
2.3.1.	TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の培養 .....	48
2.3.2.	TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の PAR の発現解析 .....	51
2.3.3.	TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖能に対する thrombin の効果 .....	53
2.3.4.	TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖能に対する AP の効果 .....	55
2.3.5.	Thrombin および AP 曝露による培養 NPCs に対する細胞障害性 .....	56
2.3.6.	TMT 処置成体マウス DG における PAR-1 の発現 .....	57
2.4.	考察 .....	60
第 3 章	成体マウス DG ニューロン障害後のニューロン新生に対する cilostazol の効果 .....	62
3.1.	背景・目的 .....	62
3.2.	方法 .....	63
3.2.1.	動物飼育 .....	63
3.2.2.	薬物投与 .....	63
3.2.3.	組織の固定と包埋 .....	64
3.2.4.	培養 dish の作成 .....	64
3.2.5.	成体マウス DG 由来 NPCs の培養 .....	64
3.2.6.	MTT 法 .....	64
3.2.7.	免疫組織化学法 .....	64
3.2.8.	免疫細胞化学法 .....	65
3.2.9.	成体マウス DG 由来 NPCs のホモジネートの調製 .....	65
3.2.10.	タンパク質レベル測定 .....	65
3.2.11.	強制水泳試験法 .....	66

3.2.12. データ解析 .....	66
3.3. 結果 .....	67
3.3.1. 成体マウス DG ニューロン障害後急性期における nestin/BrdU 両陽性細胞の新生に対する cilostazol の効果 .....	67
3.3.2. 成体マウス DG ニューロン障害後に新生された BrdU 陽性細胞の 生存に対する cilostazol の効果 .....	69
3.3.3. 成体マウス DG ニューロン障害後に新生された BrdU 陽性細胞の ニューロン分化に対する cilostazol の効果 .....	71
3.3.4. 成体マウス DG における pCREB の発現量に対する cilostazol の 効果 .....	73
3.3.5. 成体マウス DG ニューロン障害後のうつ病様行動に対する cilostazol の効果 .....	74
3.3.6. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖活性および pCREB の発現量 に対する cilostazol の効果 .....	75
3.4. 考察 .....	77
おわりに .....	80
結語 .....	80
謝辞 .....	81
引用文献 .....	82

# はじめに

## 緒言

近年、ヒトをはじめとする成体哺乳動物中枢神経系において、神経系幹・前駆細胞 (neural stem/progenitor cells : NPCs) が存在し、新たにニューロンが生み出されることが明らかとなった。その代表的な部位が側脳室下帯 (subventricular zone : SVZ) および海馬歯状回 (dentate gyrus : DG) である。海馬は、大脳辺縁系の一部であり、CA1、CA2、CA3 および DG 領域から構成される、また、DG は内側から歯状回門 (hilus)、顆粒細胞層下帯 (subgranular zone : SGZ) を含む顆粒細胞層 (granule cell layer : GCL) および分子層 (molecular layer : ML) から構成される (Fig. 1)。

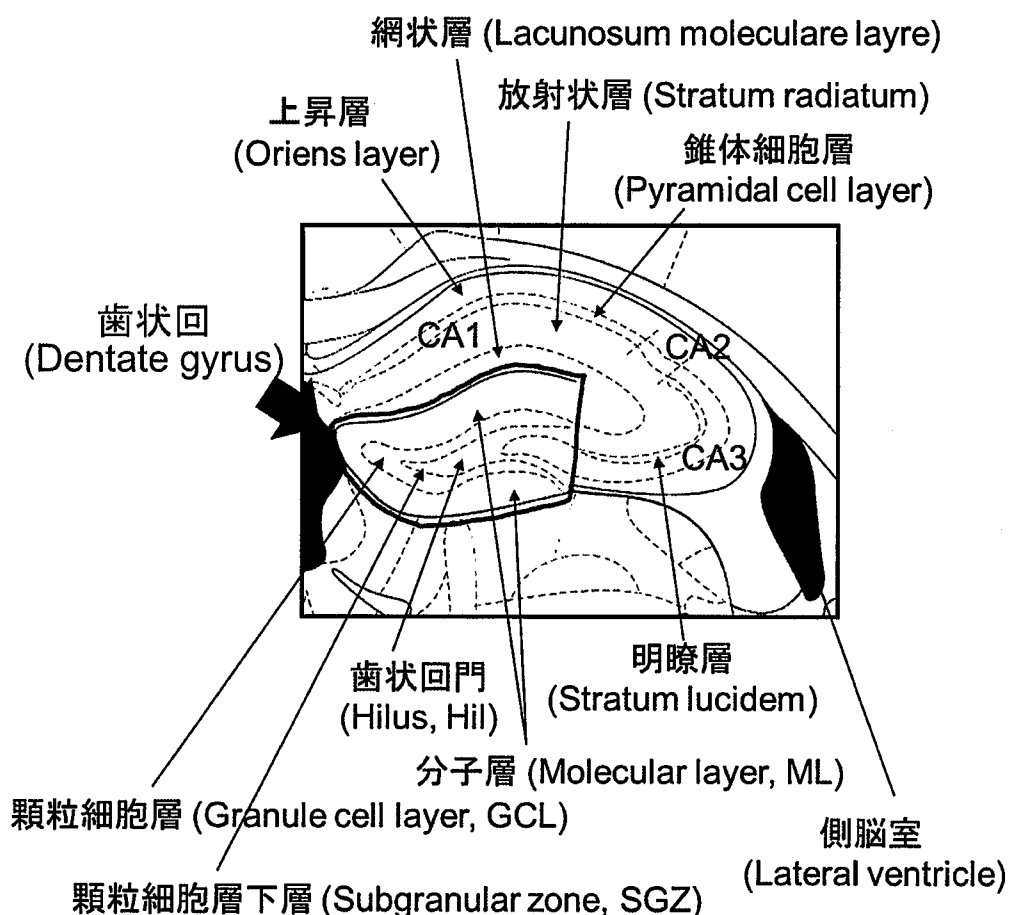


Figure 1. マウスの海馬歯状回  
マウス脳アトラスより引用

成体哺乳動物の NPCs は、SGZ と SVG に存在し、成熟度により 3～4 種類に分類されている (Fig. 2)。

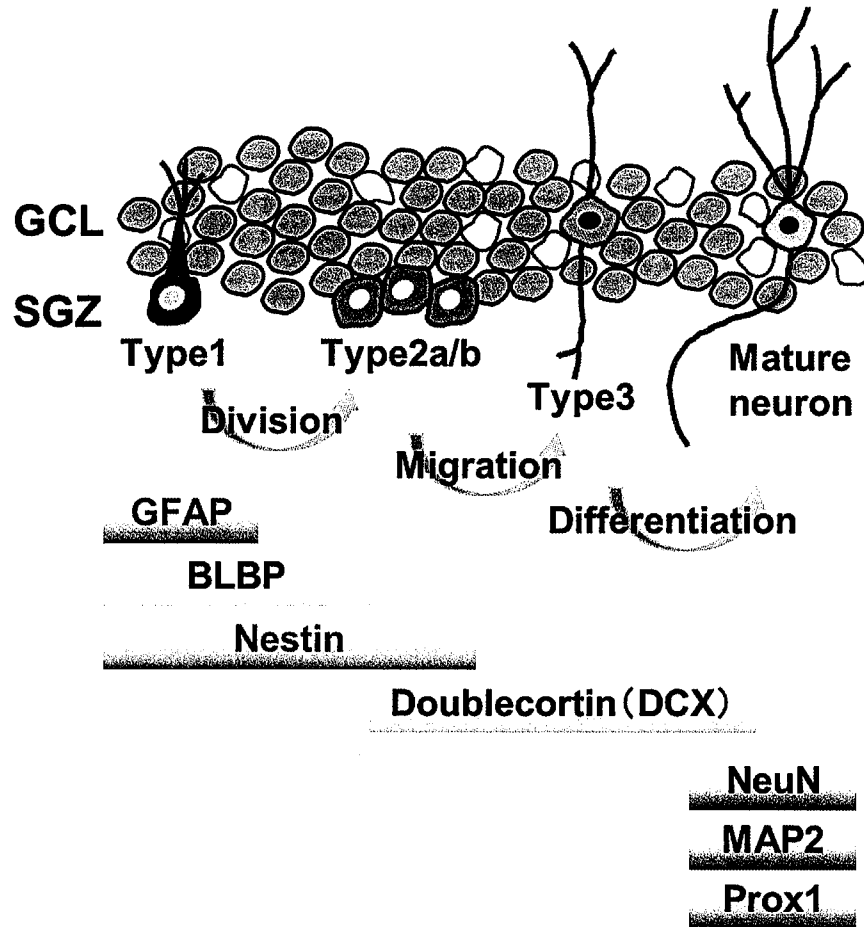


Figure 2. 成体マウス DG 顆粒細胞層および顆粒細胞層下帯における NPCs と発現する分子マーカー

すなわち、Type-1 (stem cell division)、Type-2a/2b (transit amplifying cell division) および Type-3 (progenitor cell division) の異なる 4 つの段階がある (1-3)。その NPCs は、最終的に顆粒細胞へと分化し GCL へと組み込まれる。成体海馬のニューロンはラジアルグリア様細胞である Type-1 細胞を起源とし、Type-2 細胞や Type-3 細胞など様々な中間細胞を経て、約 30 日かけて成熟ニューロンへと分化する (4-6)。Type-2 細胞はグリア様の表現型である Type-2a 細胞と早期ニューロン系の特徴を持つ Type-2b 細胞に分けられる。Type-3 細胞は細胞周期を終えて最終的に顆粒細胞へと分化する細胞を生み出す (3,7,8)。

NPCs は、自己増殖を繰り返し中枢神経系のニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの 3 種類の細胞に分化する多分化能をもつ未分化な前駆細胞と定義されている (Fig. 3)。

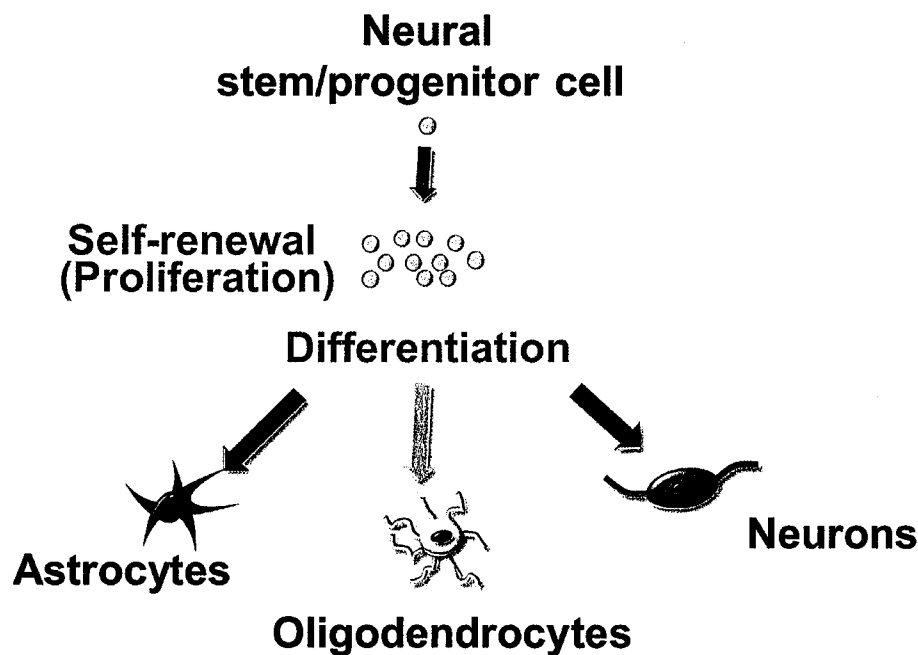


Figure 3. NPCs は増殖能および多分化能を有する

この多分化能をもつ NPCs が近年胎生期のみならず、成体からも分離培養、増殖することができるようになり、中枢神経系の再生、再構築への治療につながる可能性があるとして注目されるようになってきた。近年の再生医学の発展により胚性幹細胞や胎児脳から得られた細胞を用いた脳内移植療法が注目されているが、腫瘍発生、免疫拒絶、生着率などの問題点を抱えている。一方、成体哺乳類の中枢神経系に自己複製能と多分化能を有した NPCs が存在することが明らかとなってから (9,10)、これらの内在性 NPCs を賦活して損傷を受けた中枢神経組織を修復する試みがなされ始めた (11)。移植治療に比較して上記の欠点はないが、部位依存性や分化能などで不明な点が多く解決されなければならない課題を抱えている。そのため、以上の手法を用いて、種々の神経変性疾患に対応した移植医療の実現が期待される。

DG は脳の記憶中枢である海馬への信号入力における入口であり、この領域でニューロン新生が活発に起きているということは、ニューロン新生が記憶や学習などの高次脳機能に何らかの役割を果たしていることが予想される。その他、虚血に対して非

常に脆弱であることや、アルツハイマー病における最初の病変部位としても知られている。アルツハイマー病などの神経変性疾患は、特定部位のニューロンの減少やニューロンの内外に頻繁に発現する繊維状物質の蓄積を特徴としている。細胞内封入体の形成は、異常なタンパク質-タンパク質相互作用やタンパク質フォールディング、あるいは細胞の主要なタンパク質分解機構であるユビキチン-プロテアソームシステム (UPS) の機能不全、すなわち UPS の異常調節によりおこるタンパク質の凝集に起因するといわれている。このような症状は‘Proteinopathy’と呼ばれ、現在ではアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症など複数の神経変性疾患 (12,13) の特徴となっている神経死や機能不全の主要な要因と考えられており、根本的に完治する治療法は報告されていない。現時点では、進行を遅らせ、一過性に改善するものの、その薬の副作用および併発する病気と闘うことが現状である。さらに、これらの疾患は直接的に死に至らないという特徴を持っており、日本人口の 5% にも満たないこれらの疾患は、脳が正常に機能しないがゆえに、生活の質 (quality of life : QOL) が保てないことは言うまでもない。異常をきたした脳細胞や脱落した脳細胞を正常に戻す、あるいは移植後の細胞自身が機能を果たすことによって、QOL を向上できる可能性が考えられる。以上の可能性につなげられるように、現在様々な視点から研究が盛んに行われている。

ニューロン新生が一生継続するためには、NPCs の増殖・分化・維持が厳密にコントロールされている必要があるが、そのような分子メカニズムはまだ不明な点が多い。神経障害後のニューロン新生については、活性化ミクログリア、およびアストロサイトから放出される炎症誘発性因子、グルタミン酸、および reactive oxygen/nitrogen species のような多数の内因性因子によって調節されていることが報告されている (Table 1) (14)。



**Table 1. NPCs の増殖、分化および移動に及ぼす内因性因子および酵素の影響**  
(文献 14 より改変)

Endogenous factors/enzymes	Proliferation	Differentiation	Migration
IFN $\gamma$	↓	↑	↑
TNF $\alpha$	↑or↓	↑or↓	↑
IL-1 $\beta$	↑or↓	—	—
IL-6	↓	↓	—
Glutamate	↑or↓	↑	—
NOS1 (nNOS)	↓	↑	—
NOS2 (eNOS)	↑	↑	—

↑, enhancement; ↓, attenuation; —, no report.

脳障害時において、上記因子によるニューロン新生の調節メカニズムを解析することは、将来の神経変性疾患の治療薬開発に貢献する可能性がある。

神経変性疾患と同様に、中枢神経系に大きな損傷を与える疾患に、脳卒中が挙げられる。平成 27 年の日本人の脳血管疾患による死亡者数は、約 11 万人であり、悪性新生物、心疾患、肺炎に次ぐ死亡原因第 4 位である。しかし、脳卒中は寝たきりになる疾患の第 1 位であることが知られ、心筋梗塞の発症率と比べても脳卒中の発症率は 3 ～10 倍であることから (15,16)、我が国において、脳卒中の予防および治療が重要であることは疑いの余地がない。

脳卒中のうち、死亡の 60%以上は脳梗塞である。脳梗塞は原因や病変部位によって、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳梗塞、ラクナ梗塞およびその他に大別され、入院時の重症度や転帰は、脳梗塞のタイプにより大きな違いがある。また、脳梗塞は再発しやすく、日本人一般住民を対象とした前向きコホート研究において、10 年間の累積再発率は、アテローム血栓性脳梗塞 46.9%、心原性脳梗塞 75.2%、ラクナ梗塞 46.8%と報告されている (17)。脳梗塞発症後は、再発予防に向け、抗凝固薬や抗血小板薬などの脳梗塞再発予防薬を投与するとともに、早期の activities of daily living (ADL) 向上と社会復帰を図るため、積極的なリハビリテーションを行うことが推奨されてい

る。特に、発症早期のリハビリテーションの開始は、廃用症候群予防のみならず、その後の機能予後についても良い傾向があるとされる（18）。

一方、脳梗塞発症 48 時間以内に aspirin および cilostazol などの血液凝固阻止剤を開始すると、死亡率とともに要介護患者を有意に減少させることが認められており（19,20）、脳梗塞発症後の脳梗塞再発予防薬の早期開始は、機能予後の改善に有用である可能性がある。高次機能の改善が認められていることから、脳損傷部位付近でのニューロン新生が活発になり、脳梗塞再発予防薬がその増殖活性および生存の維持に関与している可能性が示唆された。

以上のことから、本研究では、脳内ニューロン新生に対する脳梗塞再発予防薬への影響を明らかにするため、抗凝固薬のターゲットである thrombin に着目し、NPCs に対する作用について解析した。また、脳梗塞再発予防薬として繁用される cilostazol について、NPCs に及ぼす影響とともに、ニューロン障害後の機能予後について検討した。

## 略語

本稿に使用した略語は以下の通りである。

**ADL:** activities of daily living  
**AEBSF:** 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride  
**AP:** PAR-1 agonist peptide  
**bFGF:** basic fibroblast growth factor  
**BLBP:** brain lipid binding protein  
**BrdU:** 5'-bromo-2'-deoxyuridine  
**cAMP:** cyclic adenosine monophosphate  
**Cdc42:** cell division cycle42  
**CREB:** cyclic AMP response element binding protein  
**DCX:** doublecortin  
**DEPC:** diethylpyrocarbonate  
**DG:** dentate gyrus  
**DIV:** day in vitro  
**EGF:** epidermal growth factor  
**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay  
**ERK:** p44/42 mitogen-activated protein kinase  
**GAP:** GTPase activating protein  
**GAPDH:** glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
**GCL:** granule cell layer  
**GFAP:** glial fibrillary acidic protein  
**GTP:** guanosine triphosphate  
**HRP:** horseradish peroxidase  
**LDH:** lactate dehydrogenase  
**MAP2:** microtubule-associated protein 2  
**MAPK:** mitogen-activated protein kinase  
**ML:** molecular layer  
**MTT:** (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide  
**NeuN:** neuronal nuclei  
**NPCs:** neural stem/progenitor cells  
**PAR:** protease activated receptor  
**PBS:** phosphate buffered saline  
**PFA:** paraformaldehyde

**Prox1:** prospero-related homeobox 1  
**PVDF:** polyvinylidene difluoride  
**Rho:** ras homologous  
**Rac:** ras-related C3 botulinum toxin substrate  
**RT-PCR:** reverse transcription polymerase chain reaction  
**SDS:** sodium dodecylsulfate  
**SGZ:** subgranular zone  
**SVZ:** subventricular zone  
**TB:** Tris buffer  
**TBST:** Tween 20 in Tris-buffered saline  
**TMT:** trimethyltin chloride

# 第1章 成体マウス DG 由来 NPCs の増殖における Protease activated receptor-1 の役割

## 1.1. 背景・目的

Thrombin は、prothrombin の切断によって産生されるセリンプロテアーゼであり、血液凝固カスケードにおける重要な因子である。Thrombin は、出血性脳血管疾患や虚血性脳血管疾患などの病態時においてニューロンのアポトーシスを誘導するなど、神経障害の原因因子であることが知られている。しかし一方で、thrombin は脳内でも合成されていることが知られており、正常脳において thrombin は thrombin 受容体である protease-activated receptors (PARs) を介し、ニューロンの分化や増殖の調整など生理的役割を演じている可能性が示唆されている。

PARs は、G 蛋白共役 7 回膜貫通型の受容体であり、現在までに PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4 の四つのファミリーメンバーがクローニングされている (21)。活性化の第一段階として、thrombin、plasmin、trypsin などのプロテアーゼにより細胞外のアミノ酸配列が切断されると、新たに露出した受容体活性化配列が、自身の第 2 ループに結合することで、シグナルが入力される。切断後に露出するアミノ酸と同じ配列を有する合成ペプチド (アゴニストペプチド) の曝露によってもシグナルを入力することが可能である (Fig. 4)。

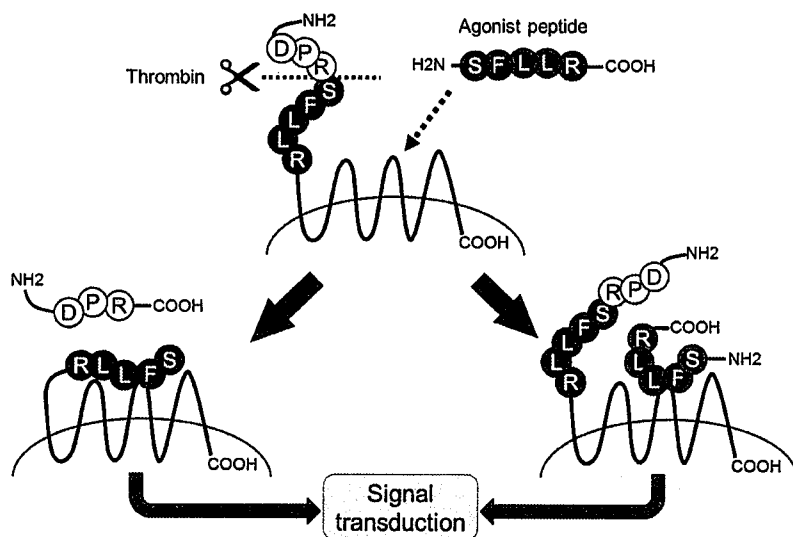


Figure 4. PAR-1 シグナル.

PAR のサブタイプのうち、PAR-1、PAR-3、PAR-4 は thrombin によって活性化され、PAR-2 は trypsin によって活性化されることが知られている。PARs と共役する G タンパク質は G12/13、Gq/11、Gi など複数存在し、それぞれのシグナル伝達カスケードと関連していることが報告されている (22)。また、thrombin はグリア細胞内で合成され、神経成長因子の分泌を高めること、PAR-1 の活性化を介してアストロサイトの増殖を刺激することが知られている (23)。しかし、現在までに DG 由来 NPCs の増殖における PARs の関与については全く報告が無い。

そこで本章では、成体哺乳動物中枢神経系における NPCs の増殖活性に対する PAR-1 の役割について評価することを目的とし、成体マウス DG 由来 NPCs の増殖に及ぼす thrombin、および PAR-1 関連ペプチドの影響について検討した (24) (Fig. 5)。

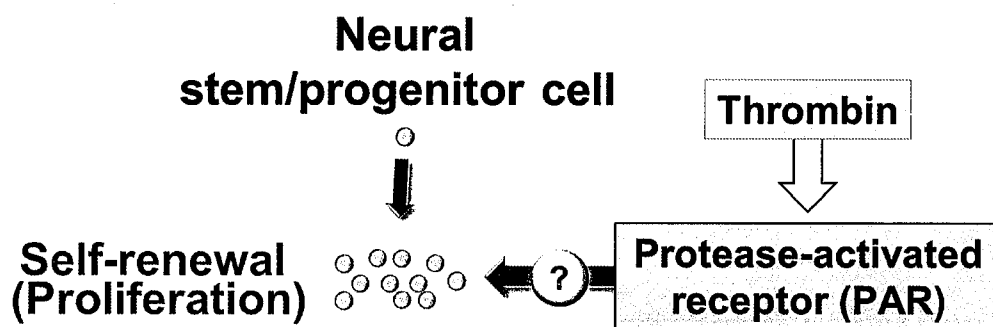


Figure 5. PAR シグナルは NPCs の増殖を制御するのか?

## 1.2. 方法

### 1.2.1. 動物飼育

実験動物の取り扱い、全て日本薬理学会動物実験指針にのっとり、摂南大学薬学部動物委員会規約に基づいて行った。5 週齢の ddY 系雄性マウス (Std-ddY) (24-35 g) を、自由摂食および摂水下、気温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  および湿度  $55 \pm 2\%$  で、7 時から 19 時までの明期および 19 時から翌朝 7 時までの暗期をもつ明暗サイクル下で飼育した。

### 1.2.2. 培養 dish の作成

培養 dish の各 well に coating 液 (5 g/mL laminine、15 g/mL ornithine) を加え、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーターに少なくとも 2 時間静置した。その後、Neurobasal A medium で置換し、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーターに 4 時間以上静置した。

### 1.2.3. 成体マウス DG 由来 NPCs の培養

#### 1.2.3.1. 初代培養

5 週齢の ddY 系雄性マウスから、DG を単離し、Neurobasal A medium 内で破碎し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、Neurobasal A medium を基本とした酵素処理液 (2 g/mL papain、500 g/mL DNase、180 g/mL neutral protease) 37°C、4 分間激しく振動させながらインキュベートし、細胞間の結合を緩和した。これらの組織小片について、1000  $\mu\text{L}$  のピペットマンにより 50 回ピペッティングし、酵素処理液と同量の Neurobasal A medium を加え、再度分散し 1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、percoll 密度勾配遠心法を行うため、Neurobasal A medium を基本とした percoll 溶液 (22% vol/vol percoll、2.2% vol/vol 10 $\times$  phosphate buffered saline (PBS)) を加え、400 G、15 分間遠心した。上清を吸引後 Neurobasal A medium を加え、再度分散し 200 G、3 分間遠心し、細胞を洗浄した。洗浄は 3 回繰り返した。上清を吸引後、Neurobasal A medium を基本とした growth medium (2 mM Glutamax、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、B-27 supplement、100 U/mL penicillin、100 g/mL streptomycin) を加え、懸濁した。これらの細胞について、培養 dish に播種し、growth medium 中で単層培養を行った。これらの細胞は、実験に用いるまで 5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置し、培養した。また、medium 交換は 24 時間静置後に全量を交換し、その後は 2 日置きに 75% を新しい growth medium と交換した。細胞は、growth medium 中で 14-20 日間 (80% confluent) 培養した (Fig. 6)。

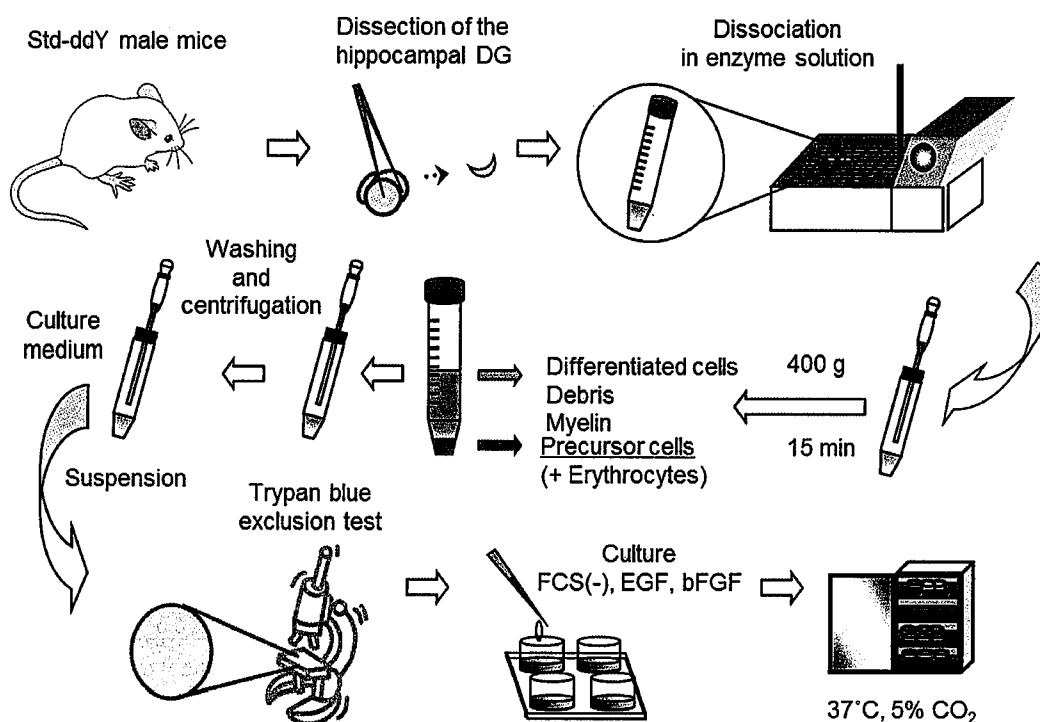


Figure 6. 成体マウス DG 由来 NPCs の培養

#### 1.2.3.2. 2 代目培養

1.2.3.1. に準じて 21-28 日間、初代培養を行った後、dish に接着している細胞を 1000  $\mu$ L のピペットマンでのピペッティングにより遊離させ回収し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、growth medium を加え、懸濁した。これらの細胞について、trypan blue 染色を用いて生細胞を計数し、培養 dish に 30,000 cells/mL の濃度で細胞を播種した。これらの細胞は、実験に用いるまで 5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置し、培養した。また、medium 交換は 24 時間静置後に全量を交換し、その後は 2 日置きに 75% を新しい growth medium と交換した。細胞は、growth medium 中で 6-8 日間 (80% confluent) 培養した。

#### 1.2.3.3. 3 代目培養

1.2.3.2. に準じて 5-7 日間培養を行った後、dish に接着している細胞を 1,000  $\mu$ L のピペットマンでのピペッティングにより遊離させ回収し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、growth medium を加え、懸濁した。これらの細胞について、trypan blue 染色を用いて生細胞を計数し、各実験系に用いるために培養 dish に細胞を播種し、実験に用いるまで 5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置し、培養した。



#### 1.2.4. (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 法

細胞増殖能の測定は、ミトコンドリア活性に伴う MTT 還元能を測定することにより行った。1.2.3.3.に準じて調製した培養細胞について、各培養日数経過後に上清を吸引後、0.5 mg/mL MTT を 200  $\mu$ L/well 添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 2 時間静置した。この間、生細胞による MTT の還元および MTT 還元によるホルマザンの生成を誘引した。その後、当容量の 0.04 N HCl/isopropyl alcohol 混合溶液を加えて、10 分間攪拌し、生細胞を溶解した。この細胞溶解液について、Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories) により、570 nm の吸収波長を測定した。

#### 1.2.5. ELISA による 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込み能の測定

細胞増殖の評価は、ELISA 法により BrdU の取り込みを測定することで判定した。1.2.3.2.に準じて調製した培養細胞を 30,000 cells/mL の細胞密度に希釈し、培養 dish に播種した。24 時間後に growth medium を全量交換し、薬物曝露直後に、BrdU 標識溶液を 0.1  $\mu$ M になるように添加し、5%CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。12 時間後、growth medium を吸引し、ヒーター式インキュベーター MIR-162 (三洋電機バイオメディカ株式会社) 内で 60°C、1 時間乾燥させた。乾燥させた細胞は、Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Diagnostics, Germany) の 200  $\mu$ L/well の Fix Denat で、室温、30 分間細胞を固定させた。Fix Denat を除去後、200  $\mu$ L/well の anti-BrdU-POD 反応液を添加し、室温で 1 時間反応させた。Anti-BrdU-POD 反応液を除去後、300  $\mu$ L/well の洗浄用緩衝液で室温、5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄液を除去後、200  $\mu$ L/well の基質液を加えて、室温で 10 分間反応させた後に、25  $\mu$ L の反応停止液 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を添加し、1 分間攪拌した。その後、5 分以内に 96-well プレートに 150  $\mu$ L 移し、enzyme-linked immunosorbent assay reader により、450 nm の吸収波長を測定した。

#### 1.2.6. 分化誘導

1.2.3.2.に準じて 6-8 日間培養を行った後、dish に接着している細胞を 1,000  $\mu$ L のピペットマンでのピペッティングにより遊離させ回収し、1,100 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、growth medium を加え、懸濁した。これらの細胞について、trypan blue 染色を用いて生細胞を計数し、200,000 cells/mL の細胞密度に希釈し、培養 dish に播種した。24 時間後に growth medium を吸引し、Neurobasal A medium を基本とした medium (2 mM Glutamax, B-27 supplement, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) で置換した。その後、3 日置きに medium の 75%量を同様の medium で交換し、15 日間分化誘導を行った。

### 1.2.7. Lactate dehydrogenase (LDH) 活性測定

細胞毒性は、培養液中に放出された LDH の活性を 2 種類のキットを用いて測定し、評価した。

#### 1.2.7.1. LDH Cytotoxicity Detection Kit-WST による測定

1.2.3.2. に準じて継代した細胞を growth medium で 200,000 cells/mL の細胞密度に希釈し、培養 dish に播種した。24 時間後に growth medium を全量交換し、その後 thrombin を 1 U/mL、または AP を 100  $\mu$ M の濃度になるよう曝露し、5%CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。24 時間後、LDH Cytotoxicity Detection Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA) の Lysis buffer を 10  $\mu$ L 加え CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションした。30 分後、各 well から上清 100  $\mu$ L を測定用 96 穴プレートに移し取り、すべての well に Dye Mixture に適量の Assay Buffer を加えて溶解した Working Solution 100  $\mu$ L 加え、遮光・室温で 30 分間呈色反応を行った。その後、反応停止液を 50  $\mu$ L 加え、インフィニット F50R 吸光プレートリーダー (和光純薬工業株式会社) により、490 nm の吸収波長を測定した。

#### 1.2.7.2. LDH Cytotoxicity Detection Kit による測定

1.2.3.2. に準じて継代した細胞を growth medium で 30,000 cells/mL の細胞密度に希釈し、培養 dish に播種した。24 時間後に growth medium を全量交換し、その後 thrombin を 1 U/mL、または AP を 100  $\mu$ M の濃度になるよう曝露し、5%CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。曝露後 1、2、3、4 日目、各 well から上清 100  $\mu$ L を測定用 96 穴プレートに移し取り、すべての well に LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio Inc., Japan) の Solution A: Catalyst (青キャップ) と Solution B: Dye solution (赤キャップ) を 1 サンプルあたり 2.5  $\mu$ L:112.5  $\mu$ L で混合して作成した Solution C: 反応混合液を 100  $\mu$ L 加えて、遮光・室温で 30 分間呈色反応を行った。その後、インフィニット F50R 吸光プレートリーダー (和光純薬工業株式会社) により、490 nm-595 nm の吸収波長を測定した。

### 1.2.8. mRNA の調製

#### 1.2.8.1. NPCs の mRNA の調製

1.2.3. に準じて培養した継代直後の NPCs を回収し、1,100 rpm、5 分間遠心分離した。また、コントロールとして上清を除去後、Trizol 500  $\mu$ L を添加し、超音波破碎後、室温で 5 分間静置させた。次に、chloroform 200  $\mu$ L 加え、15 秒間攪拌し、室温で 3 分静置させた。その後、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清を isopropanol 中に回収した。転倒混和後、室温で 10 分間反応させた。続いて、4°C、15,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を除去後、70% ethanol で洗浄し、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。70% ethanol を完全に除去し、得られた沈査に

diethylpyrocarbonate (DEPC) 15  $\mu$ L を加え、これを total RNA とした。この total RNA は吸光度測定により濃度を決定した。

#### 1.2.8.2. マウス肺の mRNA の調製

1.2.8.1. に準じてマウスの肺の mRNA の調製を行った。

#### 1.2.9. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

1.2.8. に準じて得られた total RNA 1  $\mu$ g 相当量を 65 °C で 10 分間インキュベートし、氷中に放置した。Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads に total RNA 1  $\mu$ g 相当量および Oligo (dT) を加え、穏やかに攪拌した後、37 °C で 1 時間、逆転写反応を行うことにより、cDNA の合成を行った。続いて、得られた cDNA を PCR buffer、dNTP mix、各種 primer および Taq DNA polymerase と混合し、PCR cyclor により増幅させた。RT-PCR は、95 °C、4 分間の熱変性から開始し、最後に 72 °C、10 分間の伸長反応を行った。使用した各種 primer、および反応条件を Table 2 に示す。いずれの primer においても、変性および伸長反応はそれぞれ 95 °C で 30 秒、および 72 °C で 1 分を行った。得られた PCR 産物は GelRed を含む 1% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った。

**Table 2.** RT-PCR 分析に用いた primer および反応条件 (文献 24 より転載)

Genes	Upstream (5'–3') Downstream (5'–3')	Product (b.p.)	Annealing temperature Annealing time
PAR-1	AGCCAGCCAGAATCAGAGAG TCGGAGATGAAGGGAGGAG	206	60.1 °C 30 s
PAR-2	TGGGAGGTATCACCTTCTG CCAGGTTGGCCATGTAAATC	330	62.0 °C 30 s
PAR-3	AGACAACTCAGCAAAGCCAAC TAGCCCTCTGCCITTTCTTCT	243	57.0 °C 30 s
PAR-4	AGCCGAAGTCCTCAGACAAG GCAAGTGGTAAGCCAGTCGT	303	57.0 °C 30 s

#### 1.2.10. 免疫細胞化学法

##### 1.2.10.1. Nestin/brain lipid binding protein (BLBP)

1.2.3. に準じて培養した細胞を 1.2.2. に準じて作成した培養 dish に回収し、その 24 時間後の細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4 °C で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッッキングを行った。続いて、mouse anti-BLBP monoclonal antibody (1  $\mu$ g/mL)、または rabbit anti-nestin polyclonal

antibody (1 µg/mL) を antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody または Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

#### 1.2.10.2. Prospero-related homeobox 1 (Prox1)/microtubule-associated protein 2 (MAP2)

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、1.2.6.に準じて分化誘導を行った細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4℃で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-Prox1 polyclonal antibody (1:500)、および mouse anti-MAP2 monoclonal antibody (1:500) を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

#### 1.2.10.3. Protease-activated receptor-1 (PAR-1) /nestin

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、その 24 時間後の細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4℃で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-PAR-1 polyclonal antibody (1:100)、および mouse anti-nestin monoclonal antibody (1:200) を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

#### 1.2.10.4. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) /doublecortin (DCX)

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、その 24

時間後の細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4℃で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-GFAP polyclonal antibody (1:200)、および mouse anti-DCX monoclonal antibody (1:200) を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

#### 1.2.10.5. Prox1/nestin

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、1.2.6.に準じて分化誘導を行った細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4℃で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-Prox1 polyclonal antibody (1:500)、および mouse anti-nestin monoclonal antibody (1:500) を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

#### 1.2.11. 脳室内投与

マウスに抱水クロラル (500 mg /kg) を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。脳定位固定装置を用いてマウスの頭部を固定し、頭部の剃毛を行った。消毒用エタノールで清拭し、頭皮を切開、Bregma を水平とした。Bregma から後方 0.2 mm、側方 1.0 mm の位置に電動ドリルを用いて頭蓋骨に穴を空け、深さ 2.5 mm の位置にハミルトンシリリングと接続した 40 ゲージ針を留置した。マイクロシリリングポンプ (CX07200, ISIS Co., Ltd., Osaka) を用いて各薬物を 0.4 µL/min の速度で 5 分間投与した。投与後、縫合糸を用いて縫合を行った。

#### 1.2.12. 組織の固定と包埋

薬物投与を行ったマウスに抱水クロラル (500 mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。動物を開胸し、右心耳を切開後に心尖やや左から左心室に挿入した中心

針から、ペリスタポンプを用いて生理食塩水を流速約 8 mL/min で灌流させた。脱血後、灌流液を 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.4) で溶解した 4% paraformaldehyde (PFA) に交換し、灌流した。動物から全脳を摘出し、摘出脳を再度 4% PFA に浸し 4℃で一晩浸し、脱脂処理を行った。組織標本を細切し、流水洗浄を 1 時間後行った後、アセトンに室温で一晩浸し、脱脂処理を行った。細切した組織標本は、次いでエタノール脱水系列 (70-100%) を通し、キシレンで透徹後、パラフィンを浸透させ包埋処理を行った。パラフィン包埋組織は大型滑走式ミクロトームを用い、3-5  $\mu$ m の厚さで薄切した。切片は、伸展後に親水性シランコーティングスライドガラス (松浪硝子工業株式会社、大阪) に貼り付け、40℃で一晩乾燥させた。

### 1.2.13. 免疫組織化学法

#### 1.2.13.1. BrdU/PAR-1

1.2.12. に準じて作成した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列 (100-50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered Saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rat anti-BrdU monoclonal antibody および rabbit anti-PAR-1 polyclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 594-conjugated anti-rat IgG (H+L) antibody および Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium を用いて封入を行った。

#### 1.2.13.2. Nestin/PAR-1

1.2.12. に準じて作成した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列 (100-50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered Saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-PAR-1 polyclonal antibody および mouse anti-nestin monoclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium を用いて封入を行った。

#### 1.2.13.3. GFAP/PAR-1

1.2.12.に準じて作成した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7.0）中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered Saline（TBST）で洗浄し、TBSTで希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-PAR-1 polyclonal antibody および mouse anti-GFAP monoclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4℃で一晩反応させた。TBSTで洗浄後、TBSTで希釈した Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG（H+L） antibody、および Alexa-Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG（H+L） antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。その後、TBSTで 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium を用いて封入を行った。

#### 1.2.13.4. Fluoro Jade B 染色

1.2.12.に準じて作成した標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理した後、エタノール系列（100-50%）に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、0.06% KMnO<sub>4</sub> で 10 分間ブロッキングを行った。続いて、イオン交換水で洗浄後（2 分間×1 回）、Fluoro Jade B を 20 分間反応させた。その後、イオン交換水で洗浄を行い（1 分間×3 回）、60℃の乾燥機に 5 分間入れて水分を除去した。その後、キシレンに 1 分間浸し脱水した後、エンテランニューを用いて封入を行った。

#### 1.2.14. 成体マウス DG 由来 NPCs のホモジネートの調製

1.2.3.に準じて継代した細胞を growth medium で 200,000 cells/mL の細胞密度に希釈し、培養 dish に播種した。24 時間後に growth medium を全量交換し、その後、thrombin を 1 U/mL または AP を 100 μM の濃度になるように曝露し、5%CO<sub>2</sub>/95% air、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した。曝露 1 時間後に、growth medium を吸引後、すべての well に homogenizing buffer 100 μL を加え回収し、4℃、15,000 rpm、5 分間遠心した。上清を吸引後、homogenizing buffer 100 μL を加え超音波破碎を行った。

#### 1.2.15. タンパク質レベル測定

##### 1.2.15.1. タンパク質定量法

ホモジネートは、Protein Assay Rapid Kit Wako（和光純薬工業株式会社）を用い、96 穴マイクロプレート中で Watanabe 法にて行った。吸光度測定はインフィニット F50R 吸光プレートリーダー（和光純薬工業株式会社）を用いて 570 nm の波長で行った。この結果よりホモジネートのタンパク質濃度を算出した。

#### 1.2.15.2. SDS 電気泳動

1.2.14.に準じて回収した細胞質画分タンパク質サンプルに、タンパク変性用試薬 {sodium dodecylsulfate (SDS) 処理用緩衝: 10% glycerol、2% SDS、0.01% bromophenol blue および 2% 2-mercaptoethanol を含む 50 mM Tris-HCL buffer (pH 6.8)} を用量比 4:1 で添加して 100°C、10 分間煮沸した。このように、SDS 処理を行った標品を、電気泳動槽中でポリアクリルアミドゲル (濃縮用ゲル 4.5%、分離用ゲル 15%) を用いて、室温で電気泳動 (15 mA/plate) を行った。

#### 1.2.15.3. Western blotting

SDS 電気泳動後のゲルを、あらかじめ 100% methanol で活性化しておいた polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に、90-100 mA、100 V で 45 分間ブロッティングした。ブロッティング終了後、同膜を、0.05% Tween 20 を含む 0.05% TBST で洗浄した後、0.05% TBST で溶解した 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った。この PVDF 膜を 1% スキムミルクで各濃度に希釈した ras homologous (Rho) A、RhoB、RhoC、ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac)、cell division cycle42 (Cdc42) および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する各抗体溶液を用いて、室温で 2 時間反応させた。0.05% TBST で洗浄 (5 分間×3 回) した後、Polyclonal Swine Anti-Rabbit immunoglobulins/ horseradish peroxidase (HRP) を 1% スキムミルクで希釈した溶液を室温で 1 時間反応させた。その後 0.05% TBST で洗浄 (10 分間×3 回) し、Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus による発光反応を X 線フィルムで検出した。

#### 1.2.16. データ解析

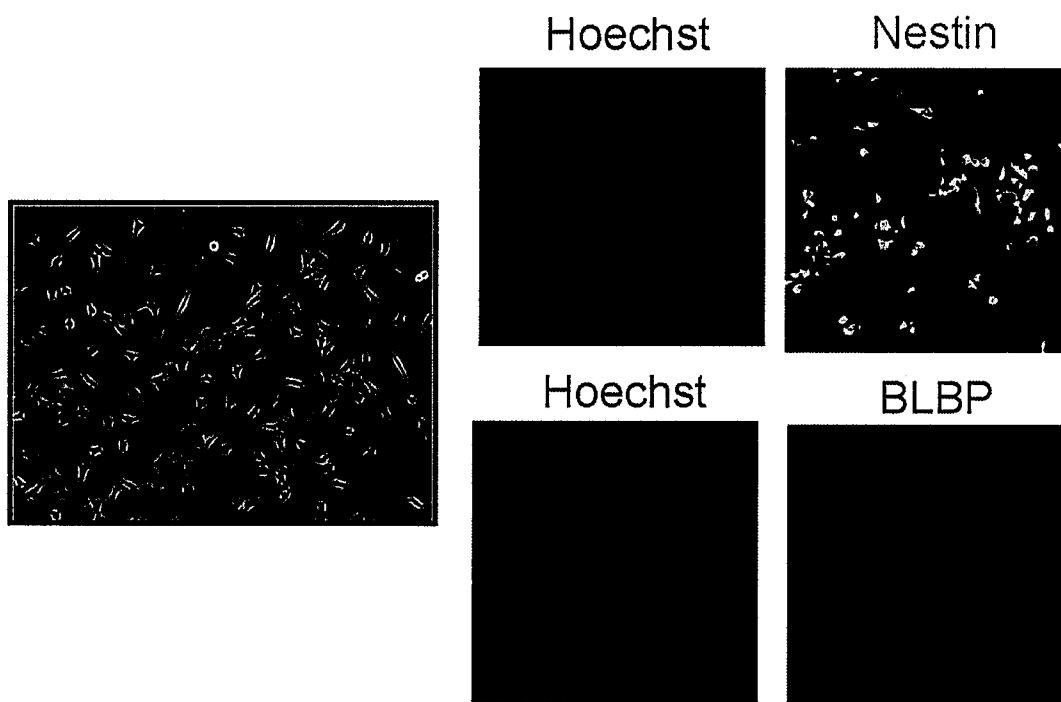
結果は、全て平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差は両側 Student's t-test、および Bonferroni/Dunnett post hoc test を用いた一元配置分散分析 (one-way ANOVA)、または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) で判定した。



### 1.3. 結果

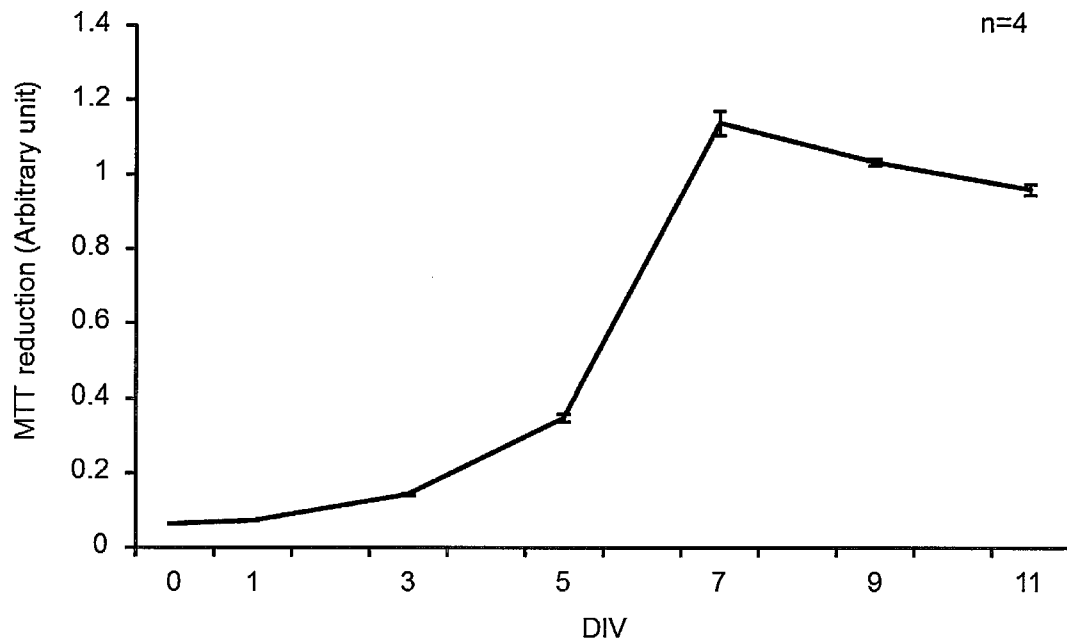
#### 1.3.1. 成体マウス DG 由来 NPCs の培養

NPCs とは、自己複製能および多分化能を持つ未分化細胞として定義される (25)。本章で用いた成体マウス DG 由来 NPCs について、中間径フィラメントで神経系幹・前駆細胞のマーカーである nestin、または脂肪酸結合タンパク質で同じく神経系幹・前駆細胞のマーカーである brain lipid binding protein (BLBP) の抗体による蛍光免疫染色を行ったところ、両蛋白質ともに 95%以上が陽性であることを確認した (Fig. 7)。



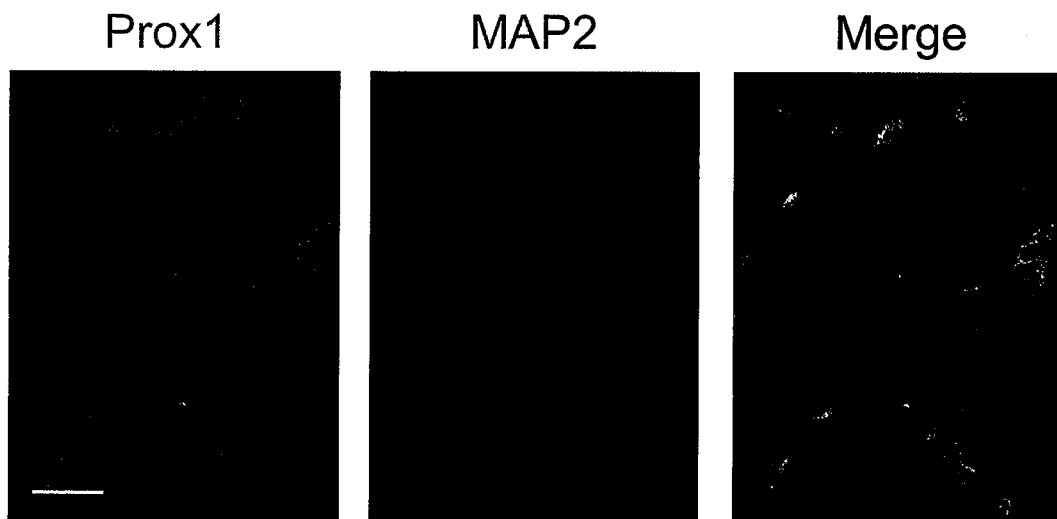
**Figure 7.** 成体マウス DG 由来 NPCs の nestin および BLBP の蛍光免疫染色  
Scale bar = 50 μm. (文献 24 より転載)

続いて増殖能について解析するため、1.2.3.に準じて培養した細胞を、30,000 cells/mL で播種し 24 時間静置後の NPCs を 0 日目とし、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、9 日後、11 日後の MTT 還元能を測定した。その結果、培養 7 日目で confluent となり、その後 MTT 還元能は低下した (Fig. 8)。

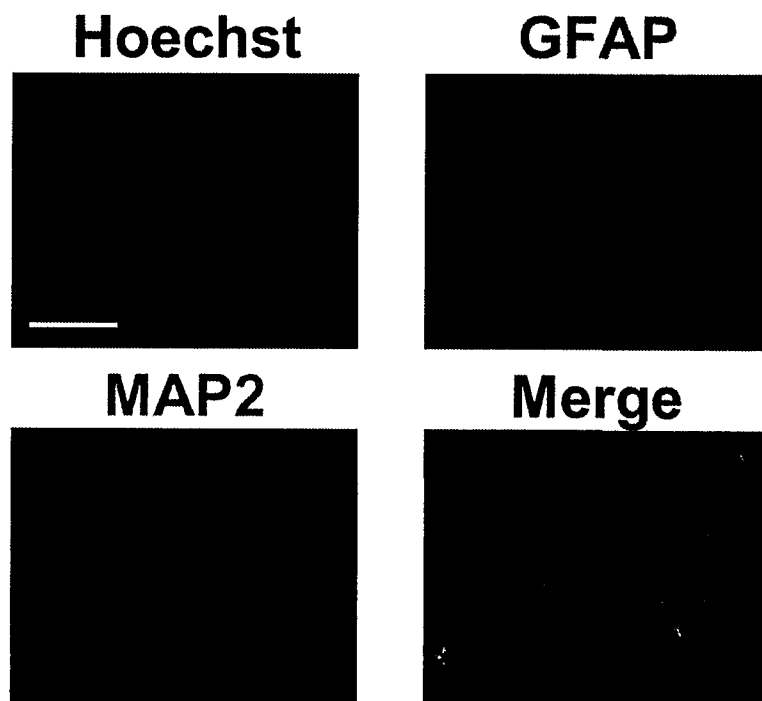


**Figure 8.** 成体マウス DG 由来 NPCs の増殖曲線  
値は平均  $\pm$ S.E.

さらに、増殖後に分化誘導条件化で成熟細胞の特性を確認するために、成熟ニューロンのマーカーである MAP2 および成熟顆粒細胞マーカーの Prox1 の発現を解析したところ、MAP2/Prox1 両陽性細胞が多数確認できた (Fig. 9)。また、分化誘導後の細胞において、アストロサイトのマーカータンパク質である GFAP 抗体に陽性を示す細胞についても確認できた。(Fig. 10)。したがって、本章で調製した細胞は、増殖能およびニューロン（顆粒細胞）やグリア細胞への多分化能をもつ神経系幹・前駆細胞であることが判明した。



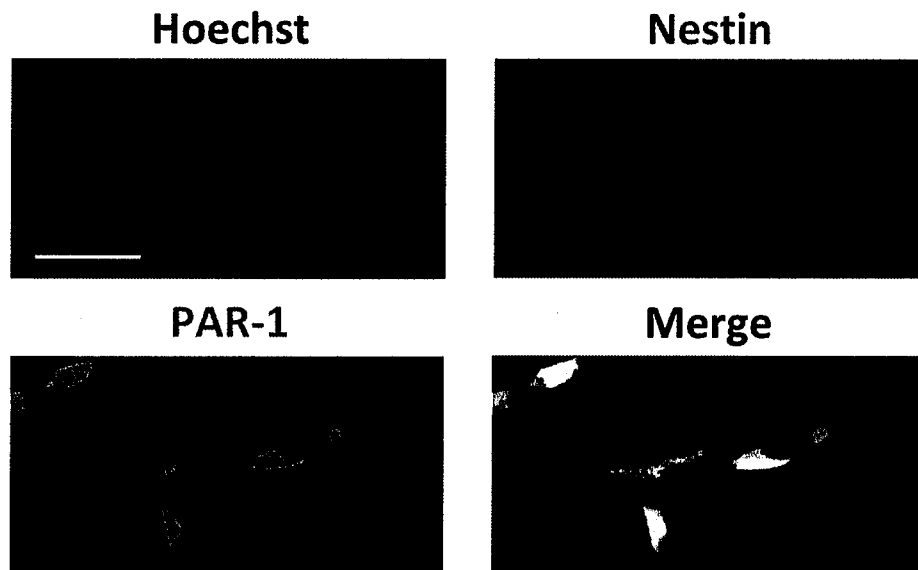
**Figure 9.** NPCs 分化誘導後の Prox1 および MAP2 の蛍光免疫染色  
Scale bar = 50  $\mu$ m. (文献 24 より転載)



**Figure 10.** NPCs 分化誘導後の GFAP および MAP2 の蛍光免疫染色  
Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 1.3.2. 成体マウス DG 由来 NPCs の PAR の発現解析

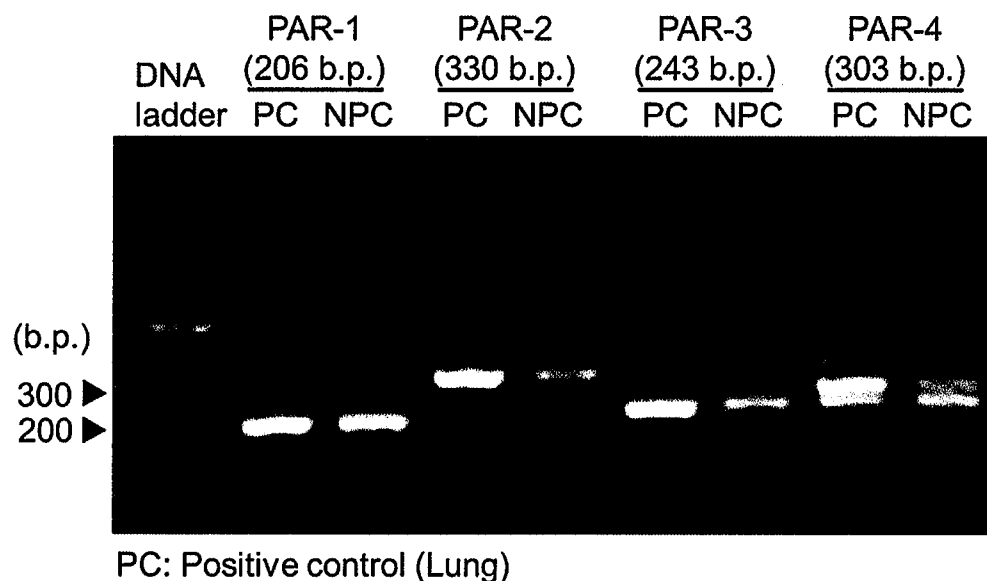
本章で用いた培養細胞における PAR サブユニットの発現を確認するため、nestin および PAR-1 の蛍光免疫二重染色を行ったところ、nestin 陽性細胞の 90%以上に PAR-1 の発現が確認された (Fig. 11)。



**Figure 11.** 培養 NPCs における PAR-1 の発現

Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (文献 24 より転載)

また、RT-PCR において 4 つのサブタイプすべての PAR の mRNA を有することが明らかになった (Fig. 12)。以上より、本章で調製した NPCs には、すべてのサブタイプの PAR が発現していることを示唆する。



**Figure 12.** 培養 NPCs における PARs の遺伝子発現  
(文献 24 より改変)

### 1.3.3. NPCs の増殖能に対する thrombin の効果

NPCs の増殖に対する PAR-1 の役割を評価するため、1.2.3.に準じて培養した細胞に thrombin (1 U/mL) を曝露し、その後 4 日間培養を行った。また、対照として thrombin 非存在下 (vehicle) に 4 日間培養を行い、増殖能を MTT 還元能で解析した。その結果、顕微鏡画像において、thrombin 曝露によって vehicle と比べ、細胞数の明らかな減少が認められた。また、MTT 還元能において vehicle は、培養開始時と比べて約 4-5 倍の上昇であったのに対し、thrombin を曝露すると約 2 倍程度の上昇にとどまっており、有意な抑制が認められた (Fig. 13)。

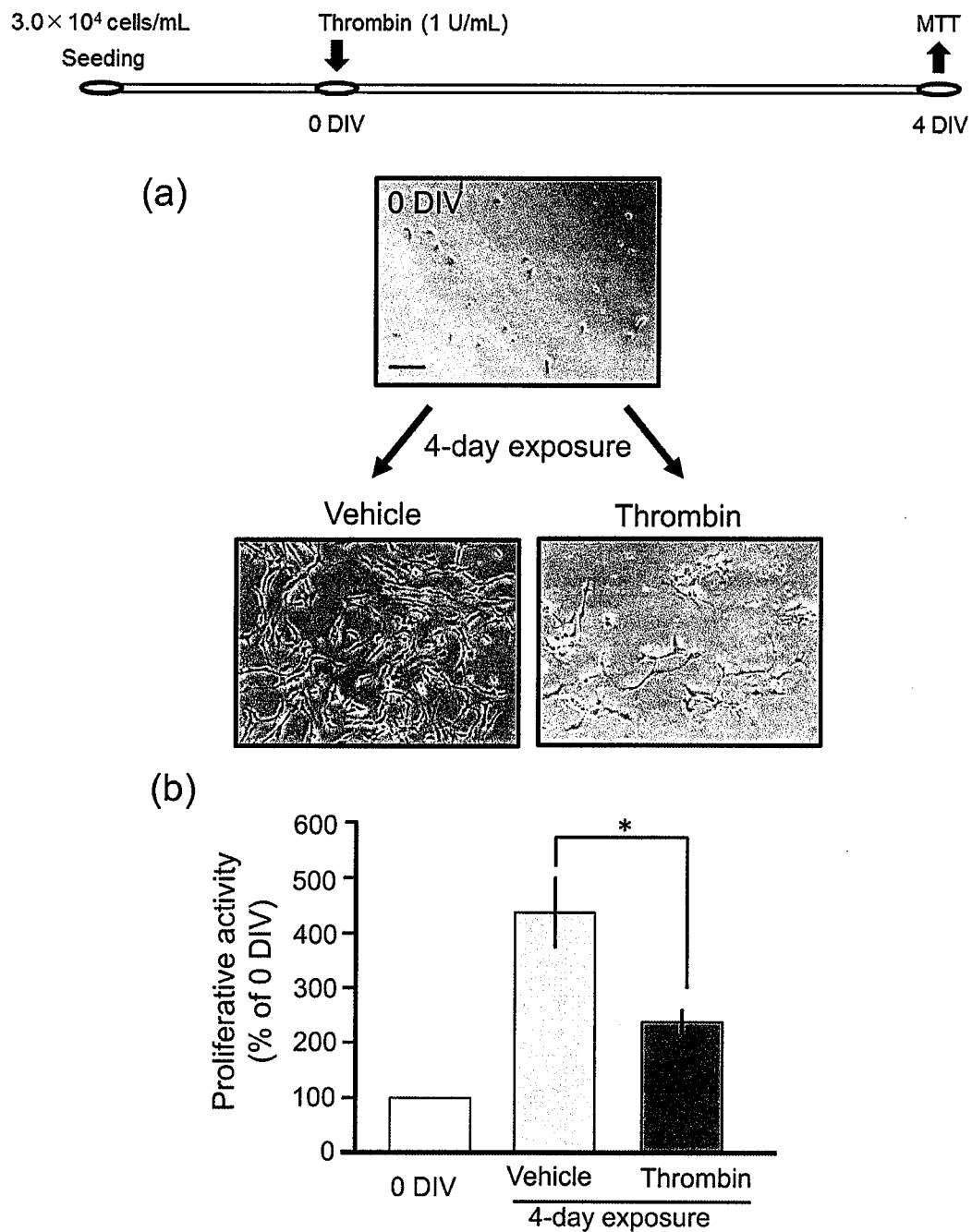


Figure 13. 培養 NPCs の増殖能に対する thrombin の効果

(a) 培養開始時 (0 DIV) , および vehicle または thrombin を曝露し 4 日間培養後の顕微鏡画像. Scale bar = 50  $\mu$ m.

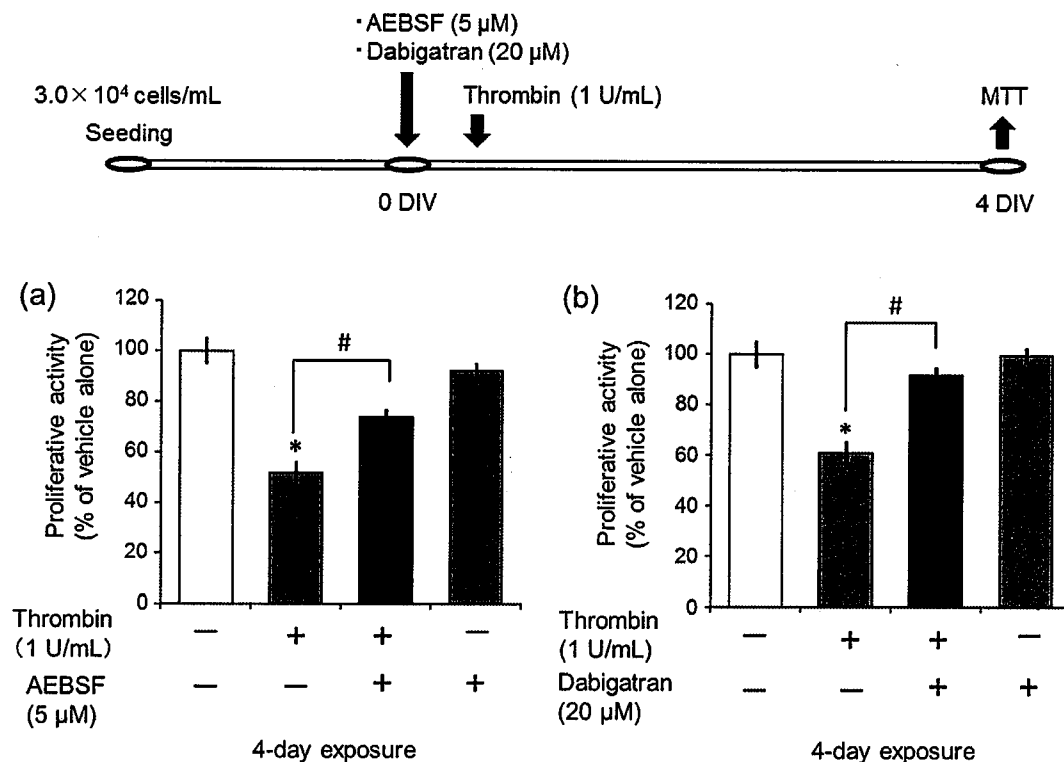
(b) 培養開始時 (0 DIV) , および vehicle または thrombin を曝露し 4 日間培養後の MTT 還元能. 値は平均  $\pm$ S.E. \*P < 0.05 vs vehicle alone. (文献 24 から改変)

#### 1.3.4. Thrombin による NPCs の増殖能低下に対する thrombin 阻害剤の効果

前述の結果、thrombin は NPCs の増殖能を低下させる可能性が明らかとなった。そこで、本現象が thrombin の影響であることを裏付けるために、thrombin とともにセリンプロテアーゼ阻害剤である 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)、および dabigatran を曝露し、4 日間培養後に MTT assay を行い、その増殖能を評価した。使用したプロテアーゼ阻害剤と、その特徴を Table 3 に示す。その結果、thrombin と AEBSF、または thrombin と dabigatran の共曝露下において、thrombin による NPCs の増殖能低下は、有意に抑制された (Fig. 14)。この結果より、少なくとも今回使用したセリンプロテアーゼ阻害剤の濃度下においては、thrombin による NPCs の増殖能低下を抑制できることが明らかとなった。

Table 3. 曝露したプロテアーゼ阻害剤の阻害対象・特徴

プロテアーゼ 阻害剤	阻害対象	特徴
AEBSF	セリンプロテアーゼ	PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) に類似した阻害特性を持つ。PMSF よりも可溶性が高く毒性が低い。非選択的 thrombin 阻害剤。
Dabigatran	Thrombin	臨床において非弁膜症性心房細動患者における虚血性脳卒中及び全身性塞栓症の発症抑制に用いられる、選択的 thrombin 阻害剤。



**Figure 14. Thrombin による培養 NPCs の増殖能低下に対する thrombin 阻害剤の効果**

NPCs に vehicle, AEBSF (a) または dabigatran (b) を 10 分間インキュベートし、その後 thrombin (1 U/mL) を曝露し、4 日間培養後の MTT 還元能。値は平均  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$  vs vehicle alone. # $P < 0.05$  vs thrombin alone. (文献 24 から改変)

### 1.3.5. Thrombin による NPCs の増殖能低下に対する PAR-1 アンタゴニストの効果

前述の結果より、thrombin による NPCs の増殖能低下は、thrombin を阻害することで抑制されることが明らかとなった。しかし、この現象が PAR を介した影響であるかどうかは明らかではない。そこで、PAR-1 アンタゴニストを前処置した NPCs に対する thrombin の影響について検討を行った。PAR-1 アンタゴニストは、thrombin の酵素活性には影響を及ぼさず、thrombin および PAR-1 アゴニストの作用を阻害することが知られている。PAR のアンタゴニストは、これまでに非ペプチド性、あるいはペプチド性の PAR-1 および PAR-4 アンタゴニストが報告されている。PAR-2 あるいは PAR-3 に対するアンタゴニストについては、現在のところ十分な効力を示す化合物の報告は無い。PAR-1 アンタゴニストの一部を Table 4 に示す。



Table 4. PAR-1 アンタゴニスト

化合物	Thrombin (0.1-5 U/mL) による 血小板凝集抑制作用	文献
非ペプチド性		
SCH79797	IC <sub>50</sub> =3 $\mu$ M	(26)
FR17113	IC <sub>50</sub> =350 $\mu$ M	(27)
ペプチド性		
RWJ56110	IC <sub>50</sub> =340 $\mu$ M	(28)
RWJ58259	IC <sub>50</sub> =370 $\mu$ M	(29)

Thrombin とともに、PAR-1 選択的アンタゴニストである RWJ56110 を曝露し、4 日間培養後に MTT assay を行い、その増殖能を評価した (Fig. 15)。その結果、thrombin と RWJ56110 の共曝露下において、thrombin による NPCs の増殖能低下は有意に抑制された。この結果より、少なくとも今回使用した PAR-1 選択的アンタゴニストの濃度下においては、thrombin による NPCs の増殖能低下を抑制できることが明らかとなった。この結果は、thrombin による NPCs の増殖能低下は PAR-1 を介した作用であることを強く示唆するものと考ええる。

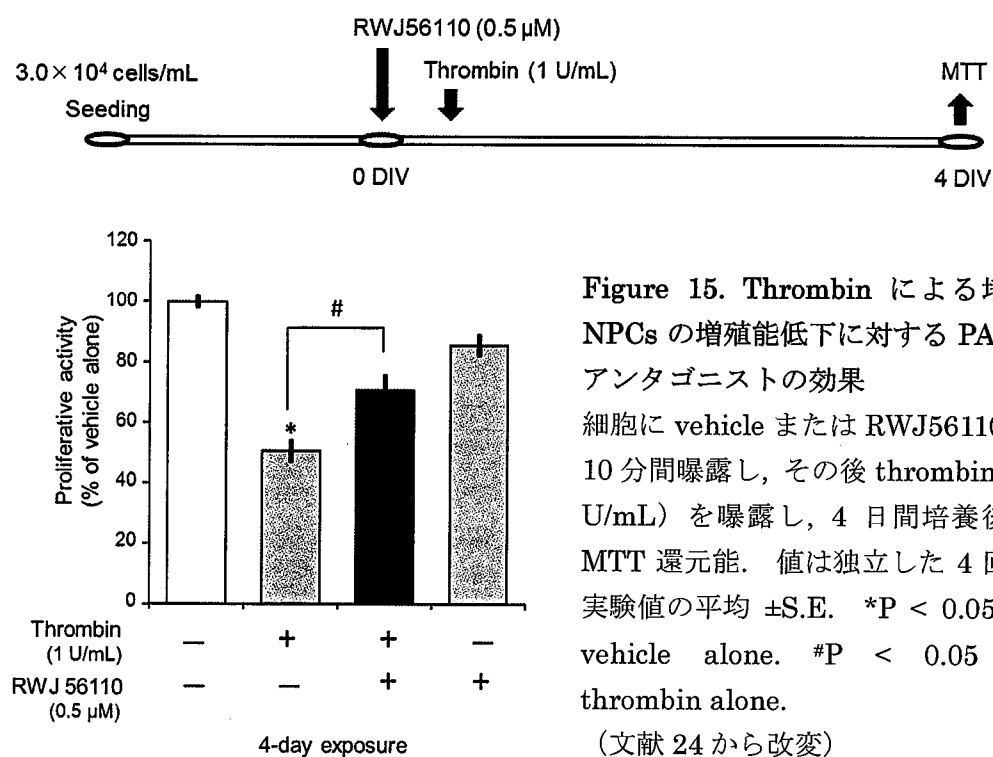


Figure 15. Thrombin による培養 NPCs の増殖能低下に対する PAR-1 アンタゴニストの効果

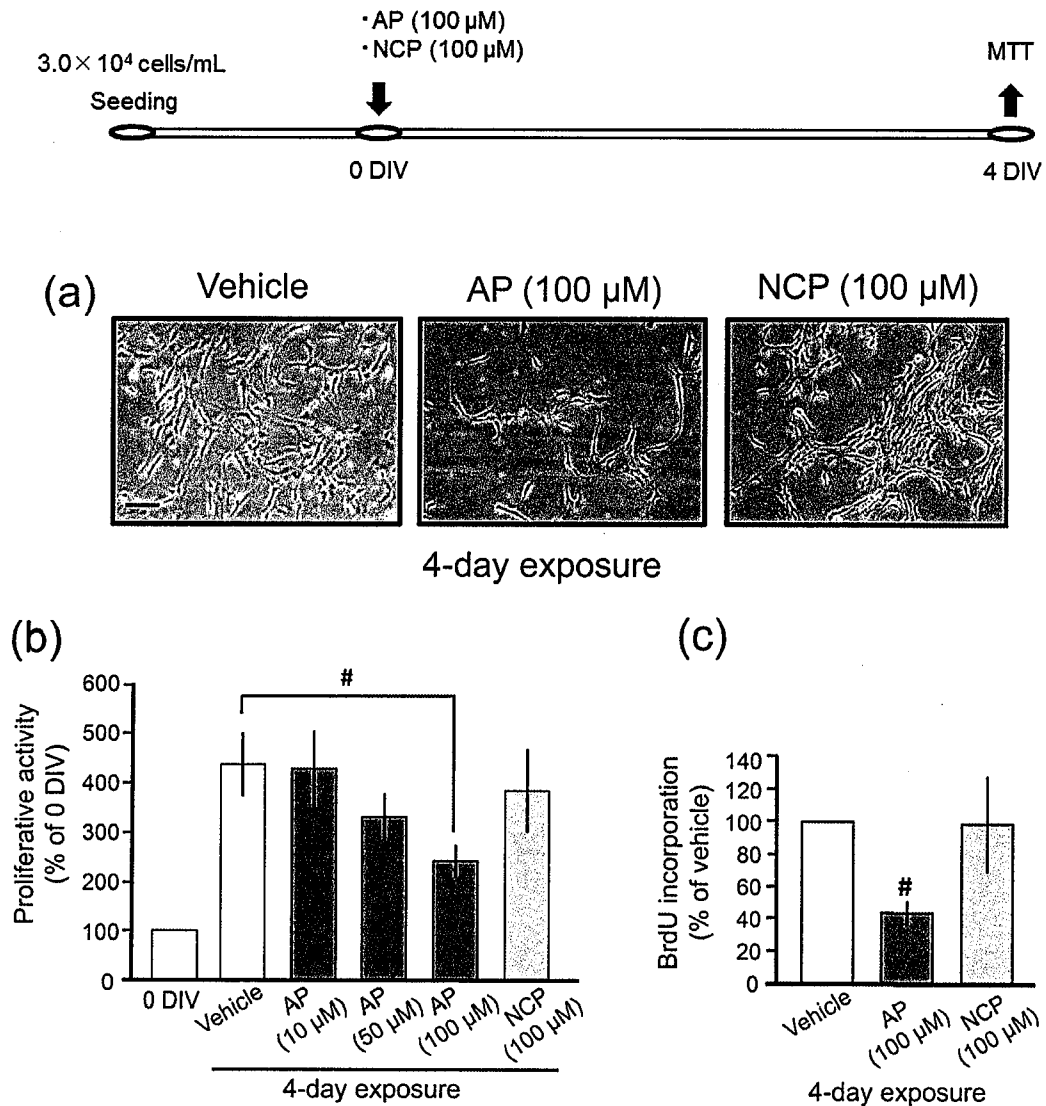
細胞に vehicle または RWJ56110 を 10 分間曝露し、その後 thrombin (1 U/mL) を曝露し、4 日間培養後の MTT 還元能。値は独立した 4 回の実験値の平均  $\pm$ S.E. \*P < 0.05 vs vehicle alone. #P < 0.05 vs thrombin alone.

(文献 24 から改変)

### 1.3.6. NPCs の増殖能に対する protease-activated receptor-1 agonist peptide (AP) の効果

前述の結果より、thrombin による NPCs の増殖能低下は、PAR-1 を介した作用である可能性が示唆されたが、thrombin は、PAR-1 以外にも PAR-3、PAR-4 についてもアゴニスト作用を示すことが知られており、さらなる確認が必要であると考えた。そこで、thrombin の代わりに AP (SFLLR-NH<sub>2</sub>) を曝露し、4 日間培養後に MTT assay を行い、NPCs の増殖能について評価した。AP の対照として、NCP (negative control peptide, RLLFT-NH<sub>2</sub>) を曝露し、同様の条件下で培養を行った。その結果、画像において AP (100  $\mu$ M) の曝露によって、vehicle と比べて細胞数の明らかな減少が認められた。MTT 還元能においては、AP の濃度依存的に MTT 還元能は低下し、AP (100  $\mu$ M) の曝露では、vehicle と比べ有意に低下した (Fig. 16a and b)。一方、NCP の曝露は、画像においても、MTT 還元能においても vehicle と差を認めなかった (Fig. 16a and b)。続いて、細胞内への BrdU 取り込み能を検討したところ、AP (100  $\mu$ M) 曝露 12 時間後の BrdU 取り込み能は、vehicle と比べて有意に低下した。一方、NCP 曝露後の BrdU 取り込み能は、vehicle と差を認めなかった (Fig. 16c)。

この結果より、AP による PAR-1 の活性化は、thrombin 曝露時と同様に NPCs の増殖能を低下させることが明らかとなった。



**Figure 16.** 培養 NPCs の増殖能に対する AP または NCP の効果

(a) 4 日間培養後の顕微鏡画像. Scale bar = 50 μm.

(b) Vehicle, AP または NCP を曝露し 4 日間培養後の MTT 還元能. 値は平均 ±S.E.

(c) AP または NCP 曝露 12 時間後の BrdU 取り込み能. #P < 0.05 vs vehicle alone.

(文献 24 から改変)

### 1.3.7. Thrombin および AP の培養 NPCs に対する細胞障害性

前述までの結果より、NPCs に thrombin または AP を曝露すると、少なくとも 4 日間における NPCs の増殖能は低下し、その作用は PAR-1 を介したものである可能性が明らかとなった。しかし、MTT 還元能、および BrdU の取り込み能はいずれも細胞死に依存して抑制される可能性も考えられる。そこで、thrombin および AP によって細胞死が誘導されたかどうかを解析するために、NPCs における培養液中に放出された LDH の活性について解析した。その結果、二種類の測定キットを使用した検討において、thrombin および AP は、放出された LDH の活性に影響を与えないことが確認された (Fig. 17a and b)。この結果より、thrombin および AP は細胞死を誘発することなく、NPCs の増殖能を抑制したと推察される。

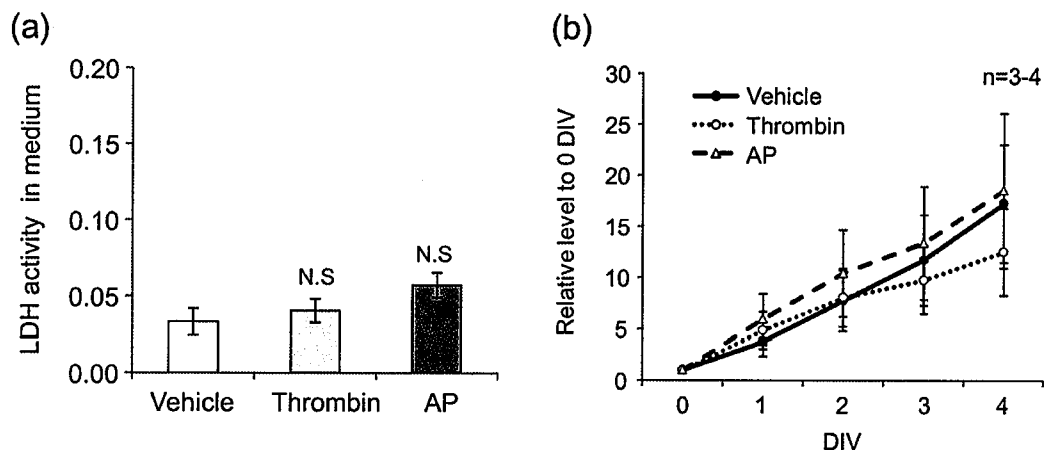


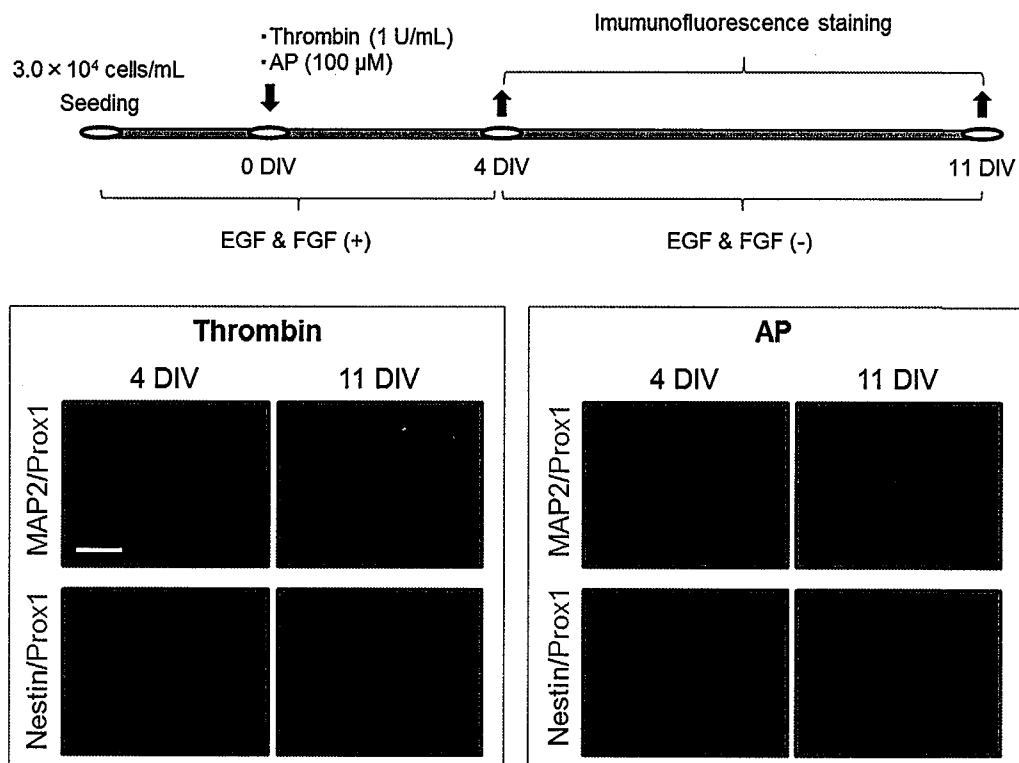
Figure 17. 培養液中の LDH 活性

- (a) Vehicle, thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu$ M) 曝露 24 時間後の培養液中 LDH 活性. LDH Cytotoxicity Detection Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA) を使用. 値は平均  $\pm$ S.E. N.S., 有意差なし vs vehicle alone. (文献 24 から転載)
- (b) Vehicle, thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu$ M) 曝露後の培養液中 LDH 活性の経日変化. LDH Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio Inc., Japan) を使用. 値は平均  $\pm$ S.E.

### 1.3.8. Thrombin および AP の培養 NPCs に対する分化誘導性

前述までの結果より、NPCs に thrombin または AP を曝露すると、細胞死を誘発することなく、NPCs の増殖能を抑制することが確認された。しかし、thrombin および AP の曝露によって培養 NPCs の分化が進行し、その結果、増殖能が低下した可能性も考えられる。そこで、thrombin または AP を曝露し 4 日間培養後の細胞と、その後

に分化誘導を行った細胞について、中間径フィラメントで神経系幹・前駆細胞のマーカである nestin、成熟ニューロンのマーカである MAP2、成熟顆粒細胞マーカである Prox1 の発現を蛍光免疫染色法にて解析した。その結果、thrombin または AP を曝露し 4 日間培養後の細胞において、大部分の細胞が nestin 陽性であることを確認した。一方、MAP2/prox1 両陽性細胞は、認められなかった。続いて thrombin または AP を曝露し、4 日間培養後に分化誘導を行った細胞においては、nestin 陽性の細胞は認められず、MAP2/prox1 両陽性細胞が多数確認された (Fig.18)。すなわち、培養 NPCs は、thrombin または AP の曝露後においても神経系幹・前駆細胞の分子マーカを発現していること、および分化誘導によって成熟ニューロンへ分化する分化能を有していることが確認された。この結果は、thrombin および AP 曝露による増殖能の低下は、NPCs の分化の進行によるものではないことを示唆するものと考ええる。



**Figure 18.** 培養 NPCs の Prox1 および MAP2 または nestin の蛍光免疫染色  
NPCs に thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu$ M) を曝露し 4 日間培養後、分化誘導を行った。Thrombin または AP 曝露後、4 日後および 11 日後に Prox1 および MAP2 または nestin の蛍光免疫二重染色を行った。Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 1.3.9. 成体マウス DG における PAR-1 の発現

次に、成体マウス DG において PAR-1 の刺激が NPCs の増殖能に影響を与えるか検討するため、まず、成体マウス DG における PAR-1 の発現を免疫組織化学法により確認した。未処置マウスにチミジン誘導体化合物の BrdU (50 mg/kg) を腹腔内に投与し、その3日後に灌流固定を行った。パラフィン切片を作製し、それぞれ BrdU/PAR-1、nestin/PAR-1、神経幹細胞およびアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP/PAR-1 の蛍光免疫二重染色を行った。その結果、BrdU/PAR-1 両陽性細胞、nestin/PAR-1 両陽性細胞は確認されなかった。一方、GFAP/PAR-1 両陽性細胞が確認された (Fig. 19)。この結果、成体マウス DG 顆粒細胞層下帯に PAR-1 を発現する GFAP 陽性細胞 (Type-1 神経系幹細胞またはアストロサイト) の存在が確認された。

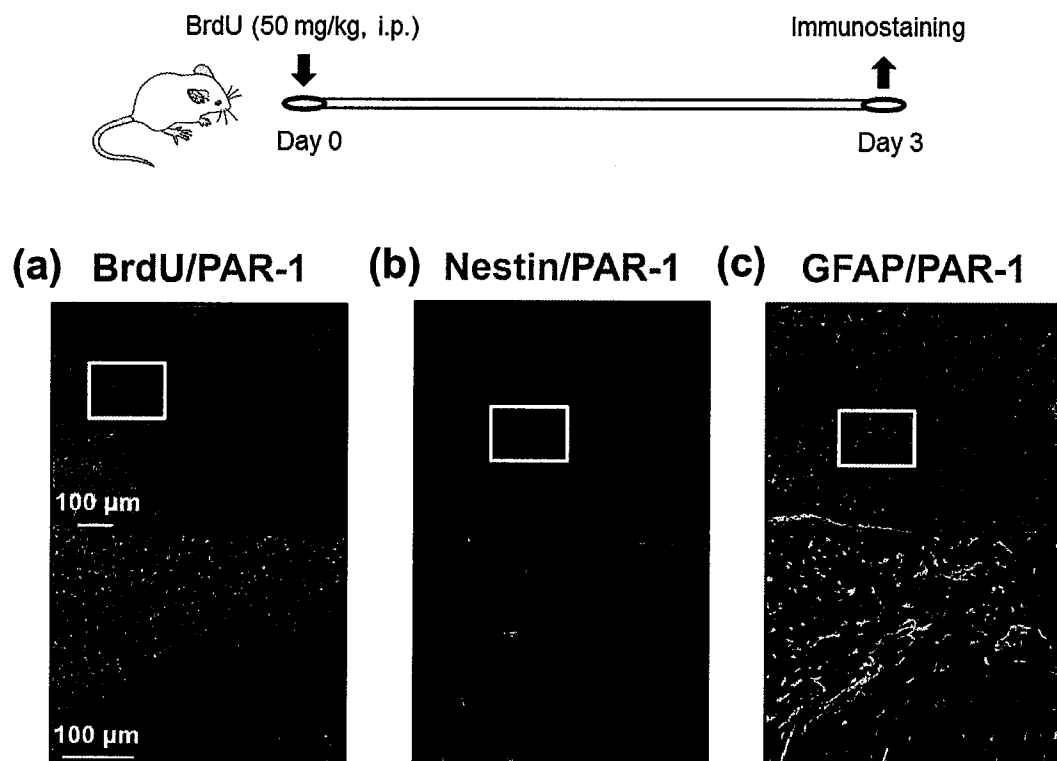


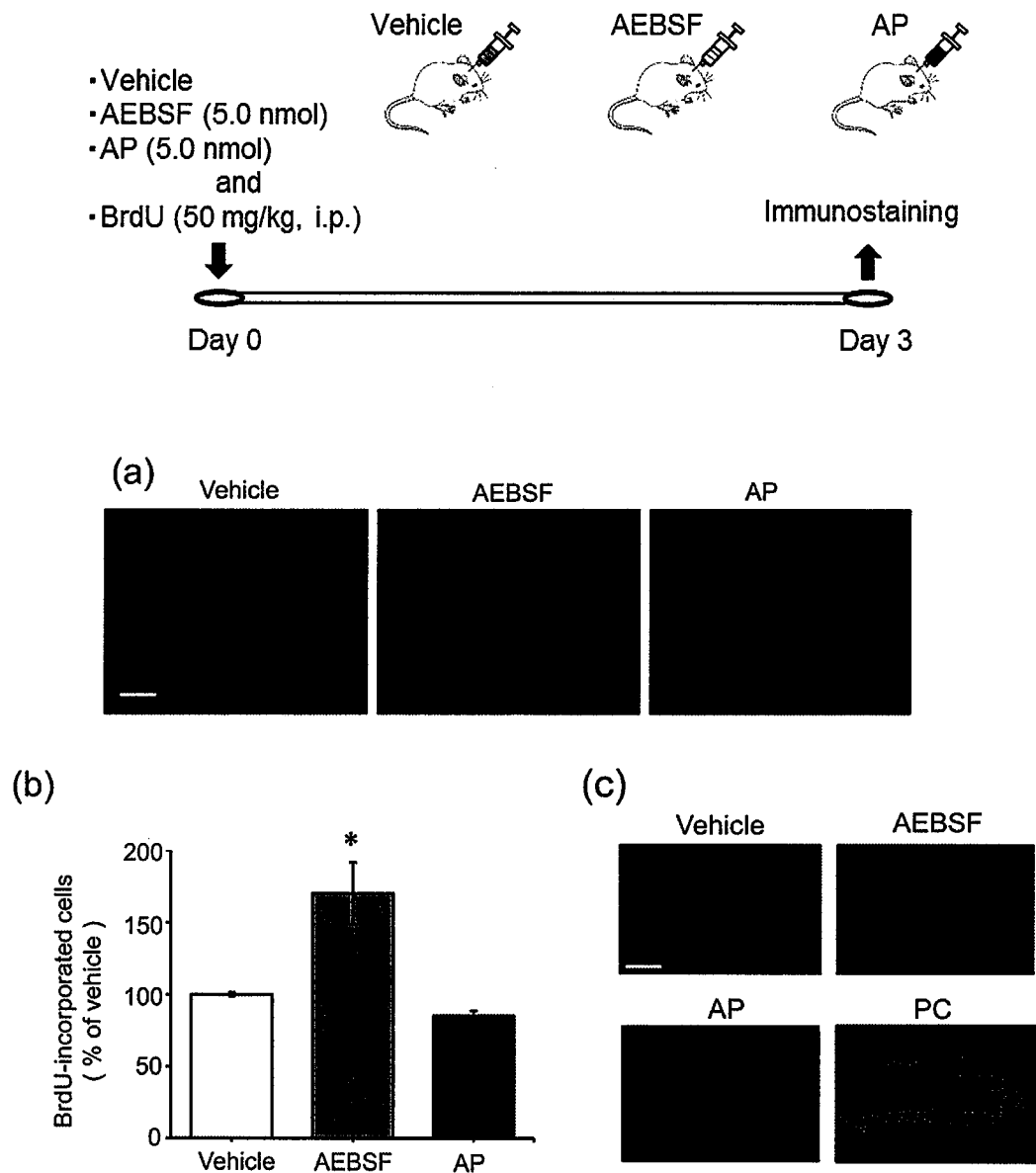
Figure 19. 成体マウス DG の BrdU/PAR-1, nestin/PAR-1 および GFAP/PAR-1 の蛍光免疫二重染色

- (a) BrdU (red) /PAR-1 (green) .
- (b) PAR-1 (red) /nestin (green) .
- (c) PAR-1 (red) /GFAP (green) .

#### 1.3.10. AEBSF または AP の成体マウス DG 顆粒細胞層下帯におけるニューロン新生に対する効果

前述までの結果より、成体マウス DG 顆粒細胞層下帯に PAR-1 の発現が確認された。続いて、成体マウス DG において PAR-1 の刺激が NPCs の増殖能に影響を与えるか検討するため、脳定位固定装置を用い、AEBSF または AP を各々 5 nmol/2  $\mu$ L を脳室内に投与した。対照群として溶媒である saline を投与した。投与直後に BrdU (50 mg/kg) を腹腔内に投与した。脳室内投与から 3 日後に灌流固定し、パラフィン切片を作成した。得られたパラフィン切片について BrdU の蛍光免疫染色を行い、細胞新生に対する薬物の影響を確認した。その結果、AEBSF の脳室内投与によって、DG 顆粒細胞層下帯の BrdU 陽性細胞数は、有意に増加した。一方、AP の脳室内投与は、DG 顆粒細胞層下帯の BrdU 陽性細胞数に影響を与えなかった (Fig. 20a and b)。

しかし、脳の障害は NPCs の増殖を一過性に促進することが知られており (30)、脳室内投与そのものによる神経障害、もしくは、AEBSF または AP による神経障害が惹起されていないかを確認するため、変性ニューロンを選択的に染色するフルオロジェイド B による染色を行った。フルオロジェイド B 染色のポジティブコントロールとして、マウスの DG を選択的に障害する塩化トリメチルスズ (trimethyltin chloride、TMT) 2.9 mg/kg をマウスの腹腔内に投与し (31)、作成したサンプルを用いた。フルオロジェイド B 染色を行った結果、vehicle、AEBSF および AP の投与による DG の神経障害は認められなかった (Fig. 20c)。これらの結果から、DG におけるニューロン新生は、生理的条件下においては、内因性の thrombin、もしくは PAR-1 アゴニストによって、常に抑制を受けていること、そして AEBSF は、成体マウス DG 顆粒細胞層下帯の神経変性を引き起こすことなく、細胞増殖を促進する作用を有することが示唆された。



**Figure 20.** 成体マウス DG の新生細胞に対する AEBSF および AP のインビボ実験での効果

(a) DG における BrdU 陽性細胞 (red) .

(b) DG の BrdU 陽性細胞数. 値は平均  $\pm$  S.E. \*P < 0.05 vs vehicle 処置マウス.

(c) フルオロジェイド B 染色. ポジティブコントロール (PC) : TMT (2.9 mg/kg) 処置 2 日後の DG パラフィン切片 (文献 31) . Scale bar = 100  $\mu$ m.

(文献 24 より改変)



### 1.3.11. PAR-1 活性化による RhoA タンパク質の発現量に対する影響

PAR-1 は様々な細胞において、Rho シグナル伝達経路を介することが知られている (32)。Rho シグナル伝達経路を構成する Rho ファミリー低分子量 guanosine triphosphate (GTP) 結合タンパク質は、単量体で働く低分子量 GTP 結合タンパク質 (分子量約 21 kDa) であり、細胞形態の主な制御因子であることが報告されている (33)。Rho ファミリーは、Rho、Rac、Cdc42 のサブファミリーからなる。さらに、Rho サブファミリー分子には、RhoA、RhoB、RhoC などが存在し、Rho キナーゼの活性化を介して細胞移動、接着、増殖、および分化などのプロセスを制御する分子スイッチとして機能している (34) (Fig. 21)。

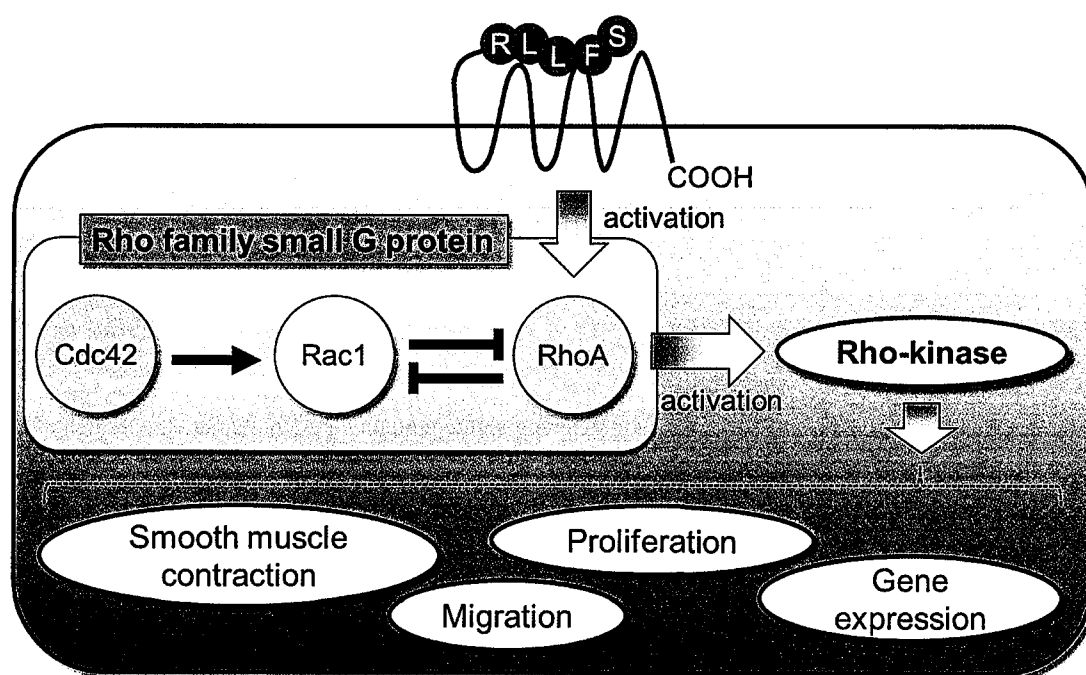


Figure 21. PAR-1 シグナル経路

NPCs における PAR-1 と Rho シグナル伝達経路の関連について検討するため、thrombin または AP 曝露後の Rho ファミリータンパク質の発現量について、western blotting 法を用いて解析した。その結果、thrombin または AP を曝露し、1 時間後の NPCs において total RhoA の発現量が有意に増加していることを確認した (Fig. 22a)。一方、thrombin または AP を曝露し、1 時間後の NPCs における Cdc42 の発現量は、vehicle と比べて差を認めなかった (Fig. 22b)。また、Rac1 は、本実験条件下において検出されなかった。この結果は、thrombin または AP による PAR-1 のシグナルの下流に、RhoA を介した伝達経路が関与する可能性を示唆するものである。

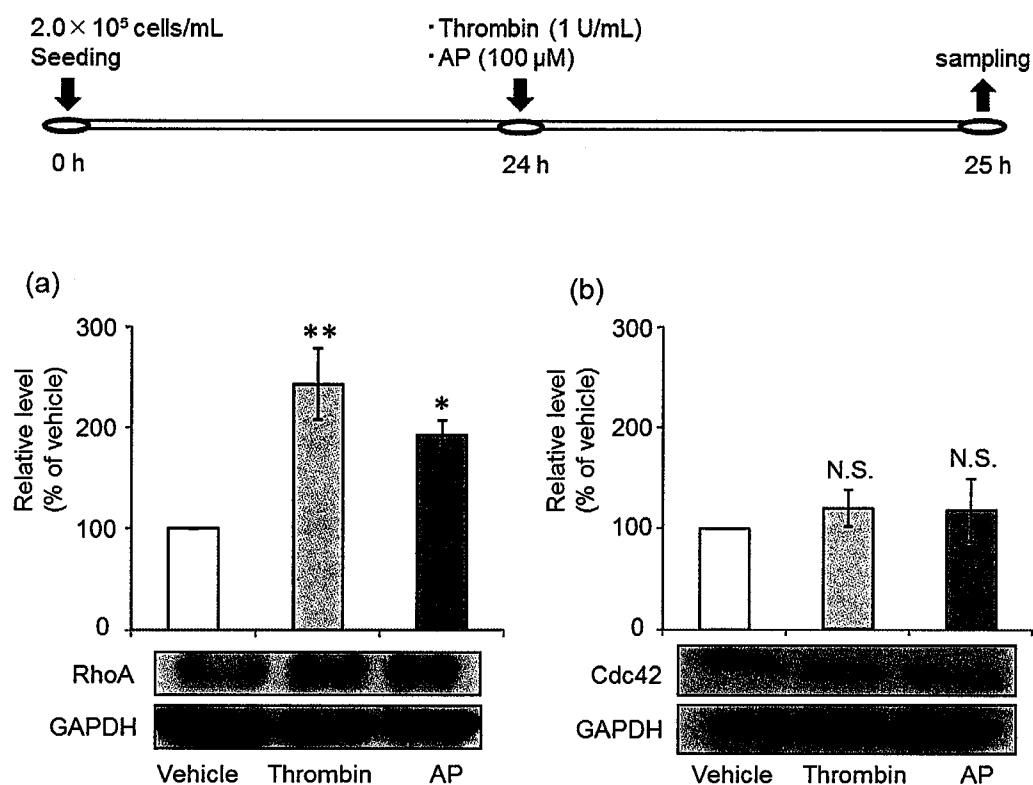


Figure 22. 培養 NPCs における RhoA および Cdc42 のタンパク質発現量に対する thrombin または AP の効果

NPCs に vehicle, thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu$ M) を曝露 1 時間後の RhoA (a) または Cdc42 (b) のタンパク質発現量. 値は平均  $\pm$ S.E. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle alone. N.S., 有意差なし vs vehicle alone. (文献 24 より改変)

### 1.3.12. Thrombin および AP 曝露による培養 NPCs の増殖能低下に対する Rho キナーゼ阻害剤の効果

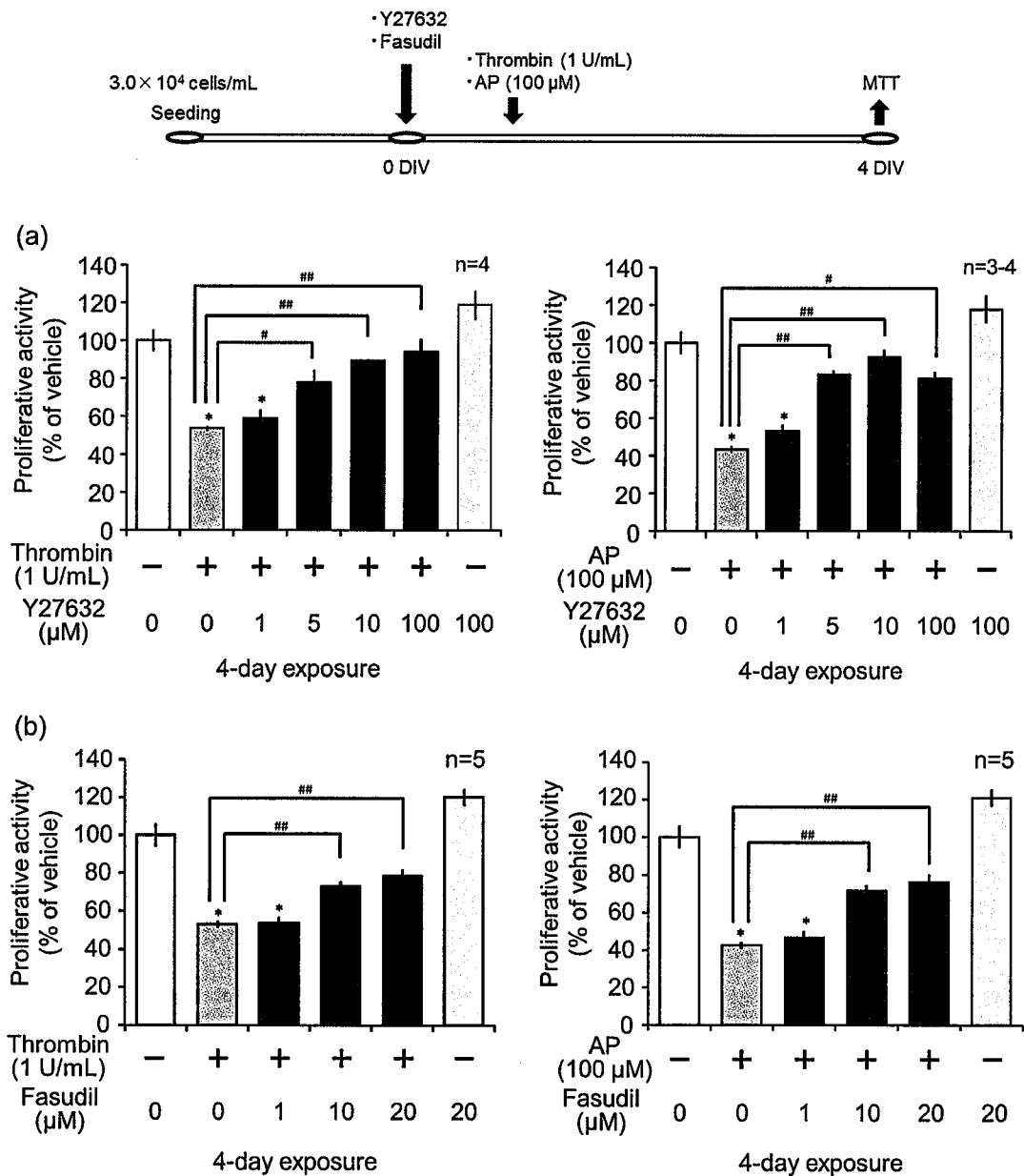
前述の結果より、PAR-1 のシグナルにより RhoA タンパク質の発現量が増加することが確認された。RhoA は、Rho キナーゼを活性化し、さらに下流にシグナルを伝えることが知られている。そこで、thrombin または AP による NPCs の増殖能の低下作用に対する Rho キナーゼ阻害剤の影響について検討を行った。使用した Rho キナーゼ阻害剤とその特徴を Table 5 に示す。

Table 5. 曝露したプロテアーゼ阻害剤の阻害対象・特徴

Rhoキナーゼ 阻害剤	阻害対象	特徴
Y27632	ROCK	選択的かつ強力なROCK阻害剤。ROCKのシグナル伝達系による血管平滑筋の収縮、がん細胞の浸潤や細胞分化制御を阻害する
Fasudil	ROCK	臨床において、くも膜下出血術後の脳血管攣縮、およびこれに伴う脳虚血症状の改善に用いられる。Rhoキナーゼの触媒活性部位に結合して、酵素活性を阻害する。

ROCK : Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho結合キナーゼ

検討の結果、Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 および fasudil は、thrombin または AP との共曝露下において、thrombin および AP による NPCs の増殖能低下作用を濃度依存的に抑制することが認められた (Fig. 23a and b)。Rho キナーゼ阻害剤単独では、NPCs の増殖能低下作用は認められなかった。この結果から、PAR-1 による NPCs の増殖能の低下は、Rho シグナル伝達経路を介したメカニズムにより起こることが明らかとなった



**Figure 23.** 培養NPCsのthrombinおよびAPによる増殖能低下に対するRhoキナーゼ阻害剤の効果

NPCsにvehicle, Y27632 (a)またはfasudil (b)を20分間インキュベートし,その後thrombin (1 U/mL)またはAP (100  $\mu$ M)を曝露し,4日間培養後のMTT還元能。値は平均 $\pm$ S.E. \* $P < 0.05$  vs vehicle alone. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs thrombin alone.

## 1.4. 考察

本章での発見は、PAR-1 を活性化すると未処置の成体マウス DG 由来の NPCs の増殖を負に調節することである。これは、thrombin と AP の両剤が PAR-1 の発現が明確に示された DG 由来の培養 NPCs において、細胞増殖を阻害する能力を有していたことが確認された *in vitro* 実験の知見に由来する。また、本章における *in vivo* 実験では、thrombin を含むセリンプロテアーゼ阻害剤が、成体海馬の NPCs が発生する場である DG 顆粒細胞層下帯において、BrdU 取り込み細胞で示された新生細胞を、劇的に増加させることを明らかにした。これらの結果は、thrombin または他のセリンプロテアーゼは、内因的に活性化しており、生理的条件下において海馬における NPCs の増殖を抑制するという可能性を支持するものである。さらに、推測ではあるが、PAR-1 は生理的条件下で常に活性化されており、成体の海馬におけるニューロン新生を負に調節している可能性が考えられる。これは、本章で得られた *in vivo* 実験の結果において、AP による PAR-1 の活性化が、DG 顆粒細胞層下帯における新生細胞数に影響を与えなかったことから示唆される。また、正常な生理的条件下において脳実質内には thrombin が存在し、PAR-1 は生理的条件下で、海馬におけるシナプスの可塑性に対する閾値の調整 (35)、NMDA 受容体機能の増強 (36)、神経突起の退縮を刺激 (37)、アストロサイトの増殖の刺激と、星状化の逆行 (38) など、脳機能の重要な役割に寄与しているとの報告が散見される。

さらに、PAR-1 はシナプスの形成 (39) や、ニューロンの発達 (40) に関与するとの報告もある。これらの知見に加え、本章の結果は、生理的条件下の脳機能における PAR-1 の新規機能を仮定するものである。脳出血や脳梗塞など、脳の障害時に活性化する反応性アストロサイトは、細胞形態変化や異常増殖によって特徴付けられる細胞であるが、脳損傷時に脳実質内に流入する血液由来因子のうち、thrombin は PAR-1 を介してアストロサイトを活性化し (41)、アストロサイトの過度の増殖と形態変化に最も重要な役割を果たしている (42)。さらに、これら PAR-1 の活性化が脳損傷後のアストログリオーシスのトリガーであることも報告されている (43)。PAR-1 の活性化は、NPCs の増殖能低下を介してニューロン新生を減少させることを示すこれまでの報告、および本章の結果から、脳損傷後の PAR-1 の活性化は、アストログリオーシスのアップレギュレーション、およびニューロン新生のダウンレギュレーションを誘導する可能性を示唆するものと考えられる。

しかしながら、障害を受けた海馬におけるニューロン新生は、顆粒細胞層下帯および脳室下帯における NPCs の増殖を介して増強されることが知られている (29)。これらの知見は、海馬のニューロン新生は生理的条件下において内因性 thrombin また

は他の PAR-1 アゴニストで抑制されている一方、ニューロンが損傷した条件下では多くの因子によりニューロン新生が増強されていることを示唆するものと考えられる。ニューロン損傷後に PAR-1 が不活性化されるという結果は得られていないものの、本章では、PAR-1 の不活性化は、DG における NPCs の増殖を増強することを示した。今後、神経損傷後のニューロン新生のトリガーとしての PAR-1 の役割を解明する必要があると考える。

反応性アストロサイトにおいて PAR-1 は、イノシトール三リン酸依存性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の放出、および細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入によって活性化された、Gq/11 共役タンパク質のシグナルによる thrombin 起因の形態変化と、異常増殖に関与していると報告されている (44)。さらにその後の研究で、アストロサイトにおける thrombin/ PAR-1 誘発性の反応は、p44/42 mitogen-activated protein kinase (ERK) および Jun N 末端キナーゼを含む、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介することが示された (41,45)。アストロサイトの反応に加えて、出血性脳障害時の神経障害は、thrombin/ PAR-1 を介した MAPK 経路 (46)、および ERK と反応性ミクログリアの p38 活性化によって引き起こされる thrombin 誘発性神経毒性 (47) によって引き起こされることが報告されている。

しかし、本章の予備的検討では、NPCs に thrombin を曝露し 24 時間後の ERK および Akt は、有意な活性上昇を認めないことから、成体海馬 NPCs における PAR-1 の細胞内シグナルは、アストロサイトおよびミクログリアの細胞内シグナルとは、全く異なる可能性が示唆された。

一方、PAR-1 は様々な細胞において、Rho シグナル伝達経路を介することが知られている (32)。さらに Rho、Rac、Cdc42 を含む Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は、細胞移動、接着、増殖および分化のプロセスを制御する分子スイッチとしての機能を有することが報告されている (34)。本章の結果から、NPCs に thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu\text{M}$ ) を曝露 1 時間後、RhoA の発現量が有意に上昇すること、そして Cdc42 の発現量には影響を与えないことが示された。さらに、Rho キナーゼ阻害薬である Y27632 および fasudil は、thrombin および AP による NPCs の細胞増殖能の低下を抑制することを発見した。これらの知見は、NPCs の PAR-1 シグナルの下流に、他の細胞と同様の RhoA シグナルの関与を示唆するものであるが、NPCs の増殖における RhoA 依存性の調節メカニズムの解明は、今後の研究課題である。

Dabigatran は、非弁膜症性心房細動患者における虚血性脳卒中および全身性塞栓症の発症抑制の適応を有し、臨床において頻用される直接 thrombin 阻害薬である。近

年の臨床研究において、dabigatran の投与は、虚血性脳卒中発症後の重症度を減少させることが報告されている (48)。中大脳動脈を結紮・閉塞し脳卒中を誘発させた成体 Sprague Dawley ラットにおいて、虚血時に thrombin を動脈内に投与すると、血管破壊と細胞障害を増加させることから (49)、thrombin/PAR-1 は、虚血時における神経障害に関連することが示唆される。このモデルにおいて、直接 thrombin 阻害作用を有するアルガトロバンの投与によって、神経血管障害が軽減された (49)。

以上、本章の結果および上記知見から、神経障害および長期的な認知障害に thrombin 活性が臨床上有意に関連していること、そして脳梗塞を発症した患者において、thrombin 阻害薬による早期治療が有用である可能性を示唆するものとする。本章の結果から AEBSF は、海馬 NPCs の増殖活性の正の調節を介して、海馬におけるニューロン新生を増強させることから、dabigatran などの thrombin 阻害薬による脳梗塞治療が脳虚血予防のみならず、ニューロン新生の面からも有用であることを支持するものとする。

## 第2章 成体マウス DG ニューロン障害後の ニューロン新生における PAR-1 の役割

### 2.1. 背景・目的

第1章の結果から、成体マウス DG 由来 NPCs において、PAR-1 の刺激は NPCs の増殖を負に調節することが明らかとなった。海馬 NPCs は、ニューロン障害後に一過性に増殖が促進されるが (30)、ニューロン障害後のニューロン新生における PAR-1 の役割は不明である。脳梗塞治療などの臨床応用を想定するにあたり、ニューロン障害後の NPCs における PAR-1 の役割を確認する必要がある。

有機スズ化合物の一種である TMT は、ヒトおよびげっ歯類において海馬や梨状葉、新皮質、扁桃体、脳幹などの中枢神経系に神経変性を誘発することが知られている (50,51)。当研究室では以前、マウスへの TMT 処置により、TMT シンドロームと呼ばれる多動、振戦、尾の自傷および攻撃性の亢進などの行動変化が起こることを報告した (52)。TMT は、マウス DG を特異的に障害することが知られており、さらに、DG において TMT 投与後に NPCs のマーカータンパク質である nestin の陽性細胞が増加し、TMT 投与後 3 日間に増殖した細胞が、2 週間後に成熟ニューロンのマーカータンパク質である neuronal nuclei (NeuN) を発現することが報告されている (53)。マウスにおける TMT 投与モデルは、他の海馬障害モデルとは異なり、CA1 領域がほとんど障害を受けないことから、海馬ニューロンの脆弱性の領域による差異や、DG の機能的役割を解析できる 1 つの有用な動物モデルになることが示唆されている (54)。

本章では、DG ニューロン損傷/修復のモデルである TMT 処置マウスを用い、DG 障害後成体マウス由来 NPCs における PAR-1 の役割について解析を行った。



## 2.2. 方法

### 2.2.1. 動物飼育

1.2.1.に準じて飼育を行った。

### 2.2.2. 薬物投与

投与薬物である TMT は 2.8-3.0 mg/kg の用量でマウスに投与した。使用当日に PBS に溶解した後、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。また、BrdU は 50 mg/kg の用量でマウスに腹腔内投与した。

### 2.2.3. 培養 dish の作成

1.2.2.に準じて培養 dish を作成した。

### 2.2.4. TMT 処置後の成体マウス DG 由来 NPCs の培養

2.2.2.に準じて TMT を投与したマウスについて、TMT 投与 3 日後に DG を単離し、1.2.3.に準じて初代培養、2 代目培養、3 代目培養を行った。

### 2.2.5. MTT 法

1.2.4.に準じて MTT assay を行った。

### 2.2.6. ELISA による BrdU の取り込み能の測定

1.2.5.に準じて ELISA による BrdU の取り込み能の測定を行った。

### 2.2.7. 分化誘導

1.2.6.に準じて細胞の分化誘導を行った。

### 2.2.8. LDH 活性測定

1.2.7.1.に準じて、培養液中に放出された LDH の活性を測定し、評価した。

### 2.2.9. mRNA の調製

1.2.8.に準じて mRNA の調製を行った。

### 2.2.10. RT-PCR 法

1.2.9.に準じて cDNA の合成および RT-PCR を行った。使用した各種 primer、および反応条件を Table 6 に示す。

**Table 6. RT-PCR 分析に用いた primer および反応条件**

Genes	Upstream (5'–3') Downstream (5'–3')	Product (b.p.)	Annealing temperature Annealing time
PAR-1	AGCCAGCCAGAATCAGAGAG TCGGAGATGAAGGGAGGAG	206	60.1 °C 30 s
PAR-2	TGGGAGGTATCACCTTCTG CCAGGTTGGCCATGTAAATC	330	62.0 °C 30 s
PAR-3	AGACAACCTCAGCAAAGCCAAC TAGCCCTCTGCCTTTTCTTCT	243	57.0 °C 30 s
PAR-4	AGCCGAAGTCCTCAGACAAG GCAAGTGTAAGCCAGTCGT	303	60.0 °C 30 s

## 2.2.11. 免疫細胞化学法

### 2.2.11.1. Protease-activated receptor-1 (PAR-1) /Nestin

1.2.10.3.に準じて染色、封入を行った。

### 2.2.11.2. GFAP/Nestin

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、その 24 時間後の細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4°C で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-GFAP polyclonal antibody (1:500)、および mouse anti-nestin monoclonal antibody (1:500) を混合して antibody diluent で希釈し、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

### 2.2.11.3. GFAP/Tuj-1

1.2.3.に準じて培養した細胞を 1.2.2.に準じて作成した培養 dish に回収し、その 24 時間後の細胞を用いた。4% paraformaldehyde (4% PFA) を用いて、20 分間、4°C で細胞を固定した後、0.03% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBST) で洗浄し、TBST で希釈した 5% ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行った。続いて、rabbit anti-GFAP polyclonal antibody (1:500)、および mouse anti-Tuj-1 monoclonal antibody (1:500) を混合して antibody diluent で希釈し、4°C で一晩反応させた。

TBST で洗浄後、TBST で希釈した Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody、および Alexa-Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (H+L) antibody を混合し、室温・遮光で 2 時間反応させた。続いて、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を TBST で希釈し、室温・遮光で 20 分間反応させた。その後、TBST で 2 回洗浄し、VECTASHIELD® mounting medium (Hard set) を用いて封入を行った。

## 2.2.12. 組織の固定と包埋

1.2.12. に準じて組織固定および包埋を行った。

## 2.2.13. 免疫組織化学法

### 2.2.13.1. BrdU/PAR-1

1.2.13.1. に準じて作製した。

### 2.2.13.2. Nestin/PAR-1

1.2.13.2. に準じて作製した。

### 2.2.13.3. GFAP/PAR-1

1.2.13.3. に準じて作製した。

## 2.2.14. ホモジネートの調製

マウスを頸椎脱臼により致死させた後、全脳を摘出した。これを直ちに homogenizing buffer [20 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) , 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT) , 10 mM sodium β-glycerophosphate (phosphatase inhibitor) , 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 µg/mL each of protease inhibitors < (p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride (APMSF) , benzamide, leupeptin, and antipain>] で洗浄後、マウス用ブレインスライサーを用いて海馬を厚さ 500 µm にスライスした。この切片について、実態顕微鏡下で海馬の DG を分画した。この分取した組織を homogenizing buffer 中にてホモジナイズを行いこの全蛋白ホモジネートをサンプルとした。

## 2.2.15. タンパク質レベル測定

1.2.15. に準じてタンパク質レベル測定を行った。

## 2.2.16. データ解析

1.2.16 に準じてデータ解析を行った。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の培養

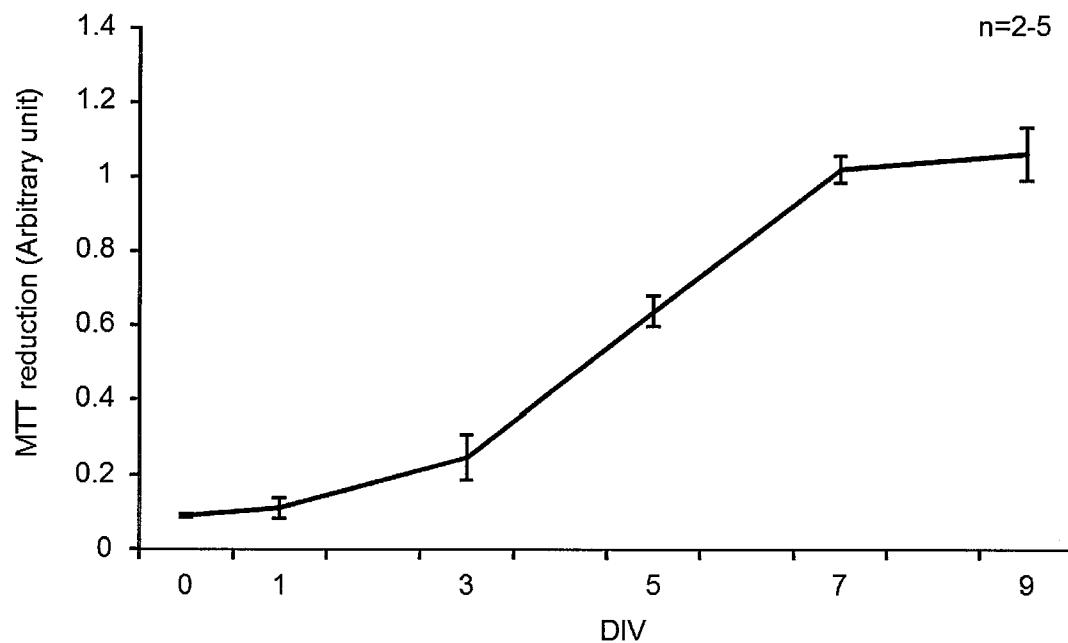
本章で用いた TMT 処置マウス DG 由来 NPCs について、中間径フィラメントで神経系幹・前駆細胞のマーカーである nestin、または神経幹細胞およびアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP の抗体による蛍光免疫二重染色を行ったところ、95%以上の細胞において nestin が陽性であることを確認した (Fig. 24)。

## Nestin/GFAP/Hoechst



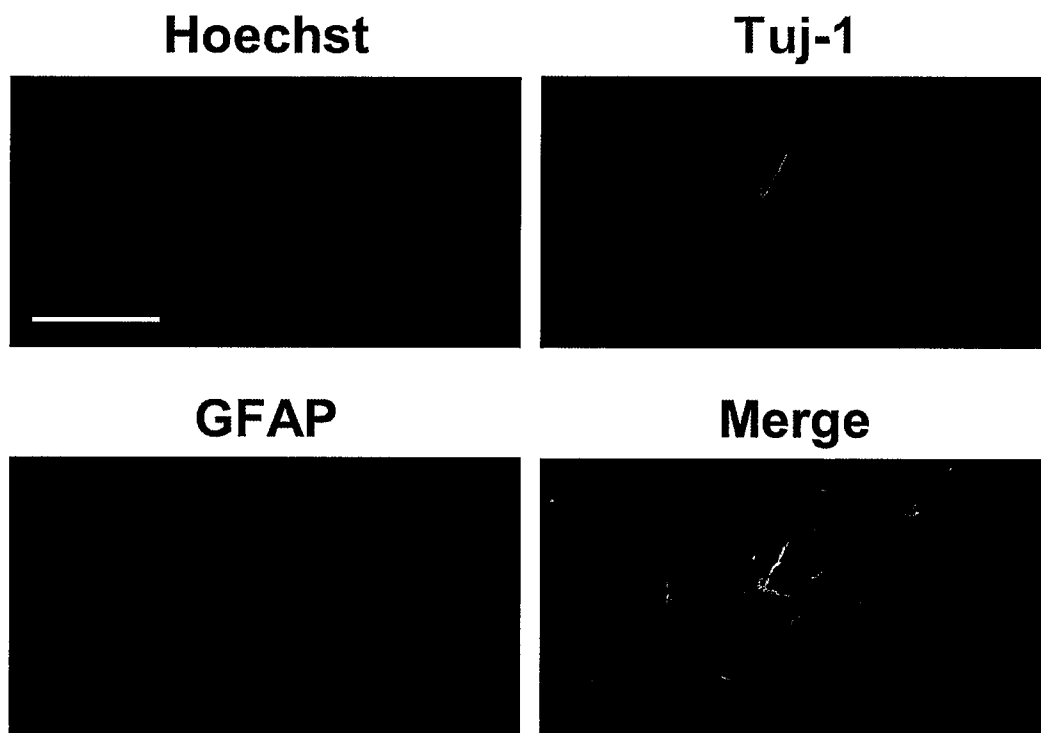
**Figure 24.** TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の nestin および GFAP の蛍光免疫染色  
Scale bar = 50  $\mu$ m.

続いて増殖能について解析するため、2.2.2.に準じて培養した細胞を、30,000 cells/mL で播種し 24 時間静置後の NPCs を 0 日目とし、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、9 日後の MTT 還元能を測定した。その結果、第 1 章で使用した TMT 未処置マウス DG 由来 NPCs と同様に培養 7 日目で confluent となることが認められた (Fig. 25)。



**Figure 25.** TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖曲線  
値は平均  $\pm$ S.E.

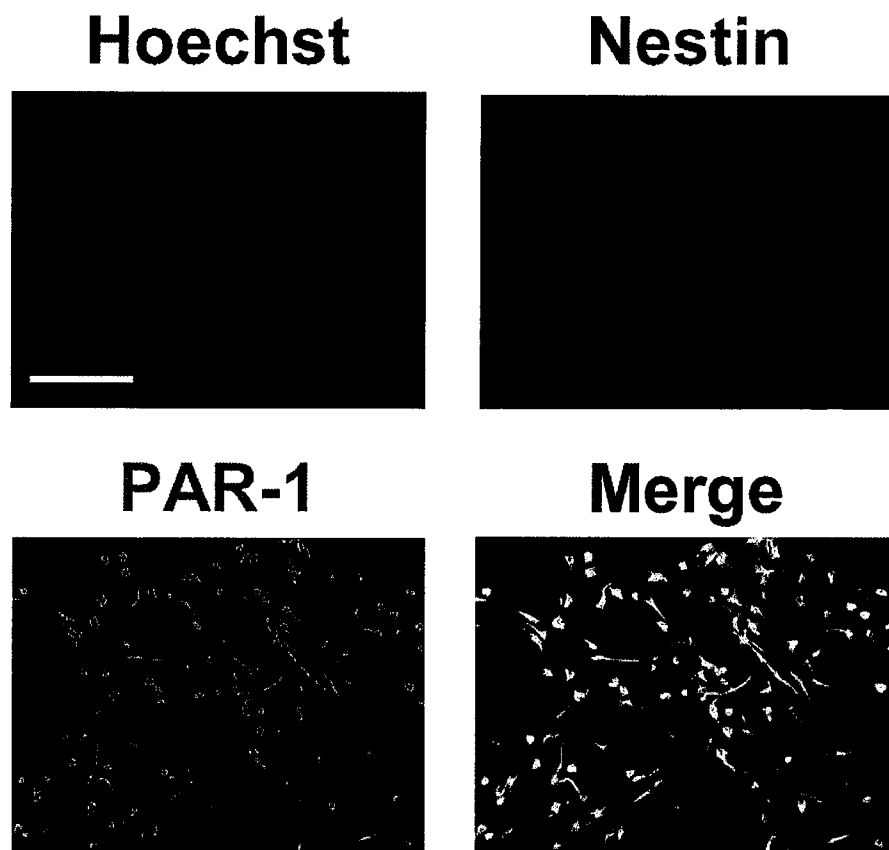
さらに、増殖後に分化誘導条件下で成熟細胞の特性を確認するために、成熟ニューロンのマーカーである Tuj-1 の発現を蛍光免疫染色法により解析したところ、Tuj-1 陽性の細胞を確認できた (Fig. 26)。また、分化誘導後の細胞において、アストロサイトのマーカータンパク質である GFAP 抗体に陽性を示す細胞についても確認できた。したがって、本章で調製した細胞は、増殖能およびニューロン (顆粒細胞) やグリア細胞への多分化能をもつ神経系幹・前駆細胞であることが判明した。



**Figure 26.** NPCs 分化誘導後の Tuj-1 および GFAP の蛍光免疫染色  
Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 2.3.2. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の PAR の発現解析

本章で用いた TMT 処置マウス DG 由来 NPCs における PAR サブユニットの発現を確認するため、nestin および PAR-1 の蛍光免疫二重染色を行ったところ、nestin 陽性細胞の 90%以上に PAR-1 の発現が確認された (Fig. 27)。



**Figure 27.** 培養 NPCs における PAR-1 の発現  
Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

また、RT-PCR において 4 つのサブタイプすべての PAR の mRNA を有することが明らかになった (Fig. 28)。以上より、本章で調製した NPCs には、すべてのサブタイプの PAR が発現していることを示唆する。

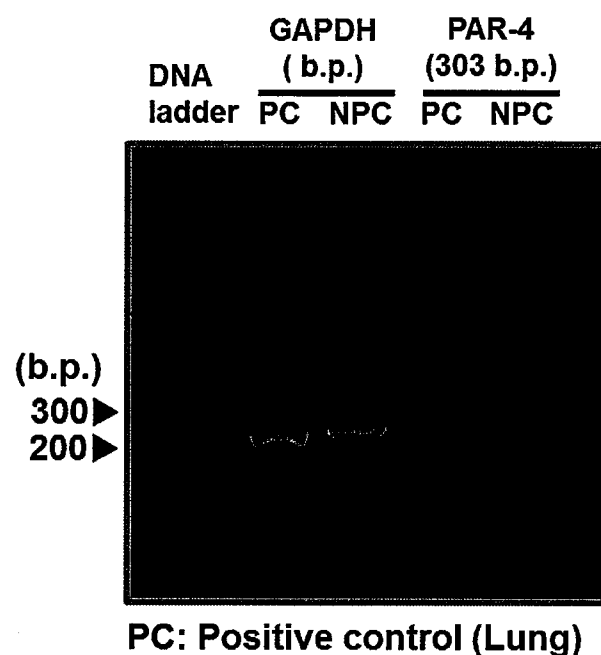
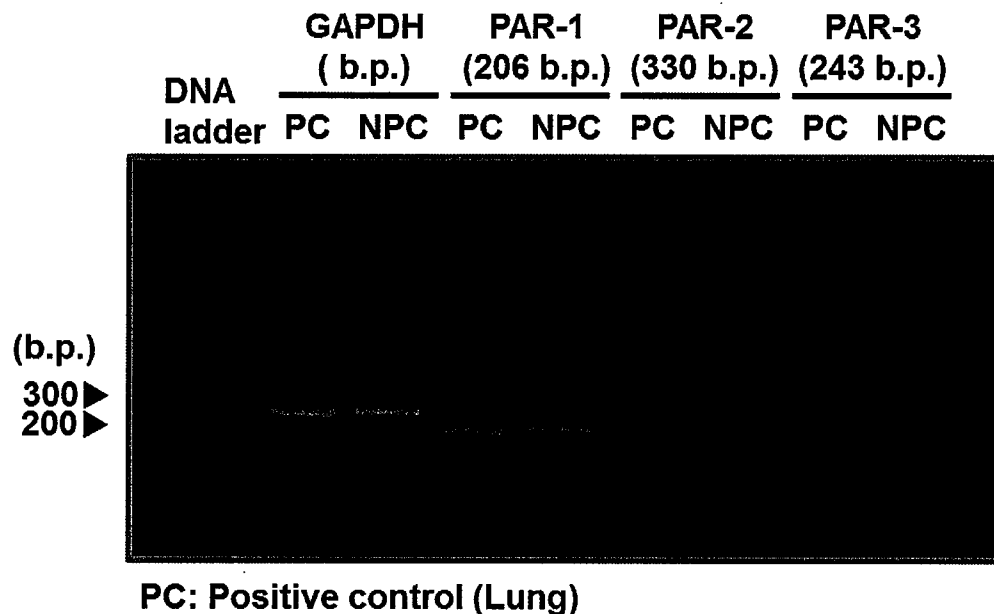
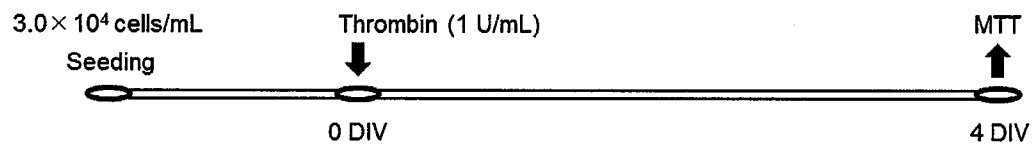


Figure 28. 培養 NPCs における PARs の遺伝子発現

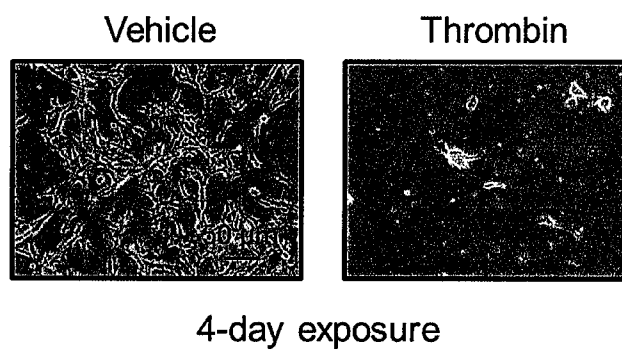


### 2.3.3. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖能に対する thrombin の効果

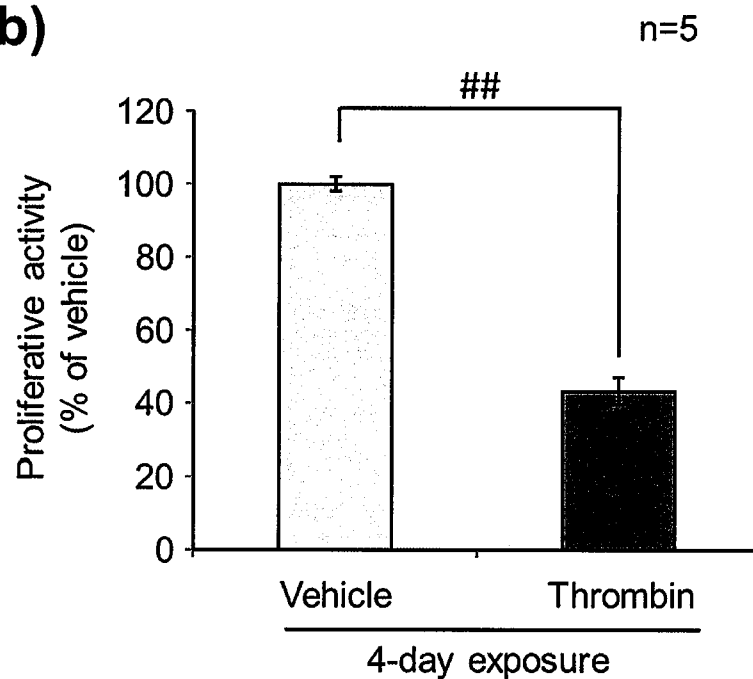
TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖に対する PAR-1 の役割を評価するため、2.2.4. に準じて培養した細胞に thrombin (1 U/mL) を曝露し、その後 4 日間培養を行った。また、対照として thrombin 非存在下 (vehicle) に 4 日間培養を行い、増殖能を MTT 還元能で解析した。その結果、画像上、thrombin 曝露により vehicle と比べて細胞数の明らかな減少が認められた。また、thrombin 曝露群は、vehicle と比べて MTT 還元能が約 40% から 50% 程に低下した (Fig. 29)。



a)



b)



**Figure 29.** 培養 NPCs の増殖能に対する thrombin の効果

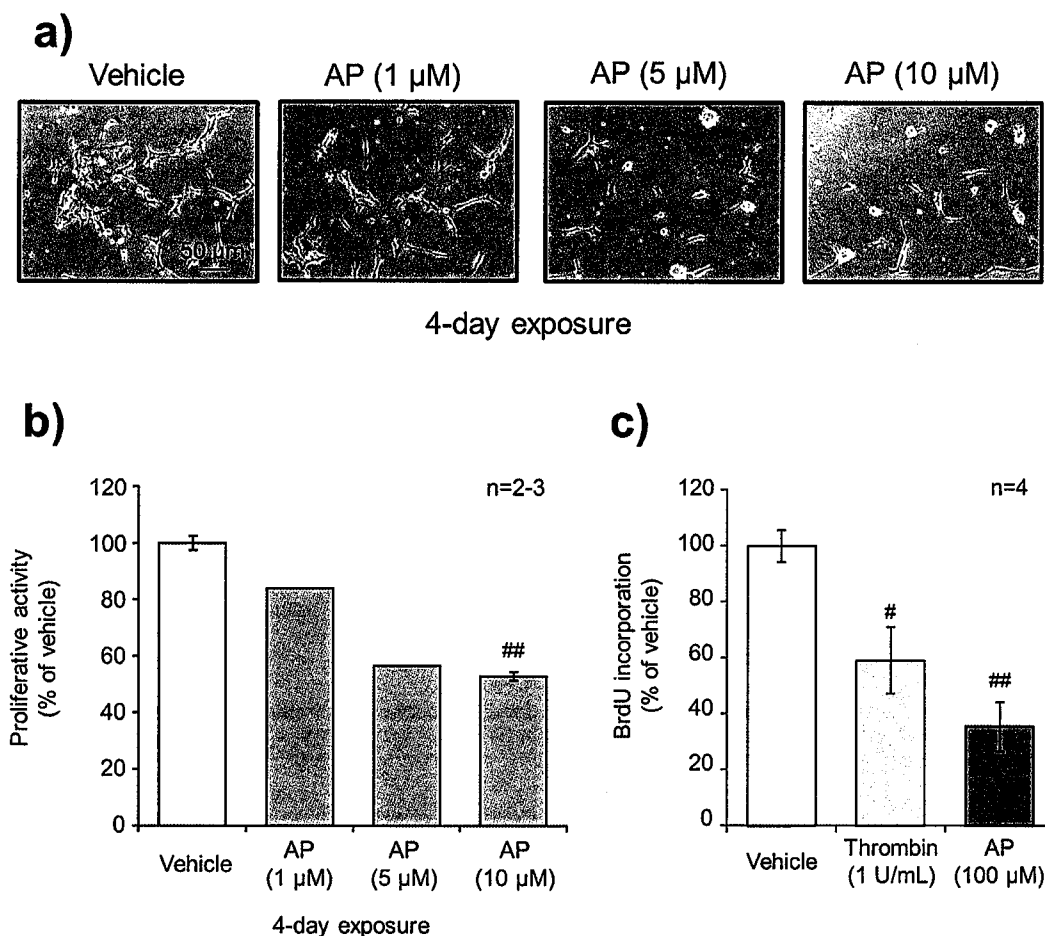
(a) Vehicle または thrombin を曝露し 4 日間培養後の顕微鏡画像.

(b) Vehicle または thrombin を曝露し 4 日間培養後の MTT 還元能. 値は平均  $\pm$ S.E.

##P < 0.01 vs vehicle alone.

#### 2.3.4. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖能に対する AP の効果

前述の結果より、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs は、TMT 未処置マウス DG 由来 NPCs と同様に thrombin 曝露によって、その増殖能が低下することが確認された。そこで、thrombin に代えて AP を曝露し、4 日間培養後に MTT assay を行い、NPCs の増殖能について評価した (Fig. 30)。



**Figure 30.** 培養 NPCs の増殖能に対する AP の効果

(a) Vehicle または AP (1, 5, 10  $\mu$ M) 曝露し 4 日間培養後の顕微鏡画像.

(b) Vehicle または AP を曝露し 4 日間培養後の MTT 還元能. 値は平均  $\pm$ S.E.

<sup>#</sup>P < 0.05 vs vehicle alone.

(c) Thrombin または AP 曝露 48 時間後の BrdU 取り込み能.

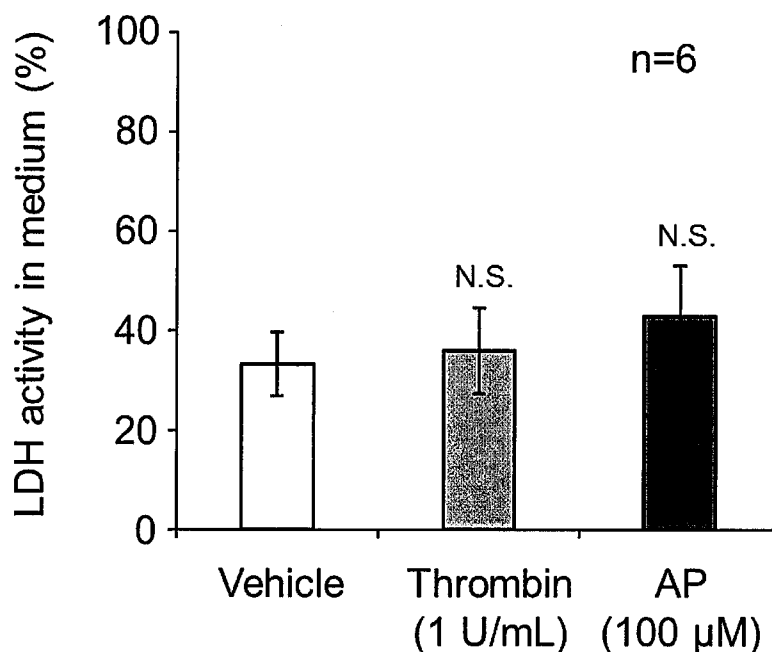
<sup>#</sup>P < 0.05, <sup>##</sup>P < 0.01 vs vehicle alone.

その結果、画像において AP (1,5,10  $\mu$ M) の曝露によって、AP の濃度依存的に vehicle と比べて細胞数の明らかな減少を認めた。また、MTT 還元能においては、AP の濃度依存的に低下し、AP (10  $\mu$ M) の曝露で MTT 還元能の有意な低下を認めた (Fig. 30a and b)。この結果は、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の thrombin による増殖能の低下は、PAR-1 を介した作用であることを示唆するものとする。また、TMT 未処置マウス DG 由来 NPCs は、AP (100  $\mu$ M) の曝露時に細胞増殖能の有意な低下を認めたのに対し、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs は、その 1/10 の濃度である AP (10  $\mu$ M) の曝露で細胞増殖能の有意な低下を認めた。この結果は、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs は、thrombin に対する感受性が高まっている可能性を示唆するものとする。

続いて、細胞内への BrdU 取り込み能を検討したところ、thrombin (1 U/mL) または AP (100  $\mu$ M) の曝露 48 時間後の BrdU 取り込み能は、vehicle と比べて有意に低下した (Fig. 30c)。この結果より、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs における thrombin または AP による PAR-1 の活性化は、TMT 未処置マウス DG 由来 NPCs の PAR-1 の活性化時と同様に、NPCs の増殖能を低下させることが明らかとなった。

#### 2.3.5. Thrombin および AP 曝露による培養 NPCs に対する細胞障害性

前述までの結果より、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs に thrombin または AP を曝露すると、少なくとも 4 日間における NPCs の増殖能は低下し、その作用は、PAR-1 を介したものである可能性が明らかとなった。しかし、MTT 還元能、および BrdU の取り込み能は、いずれも細胞死に依存して抑制される可能性も考えられる。そこで、thrombin および AP によって細胞死が誘導されたかどうかを解析するために、NPCs における培養液中に放出された LDH の活性について解析した。その結果、thrombin および AP は、放出された LDH の活性に影響を与えないことが確認された (Fig. 31)。この結果より、thrombin および AP は、細胞死を誘発することなく、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖能を抑制したと推察される。



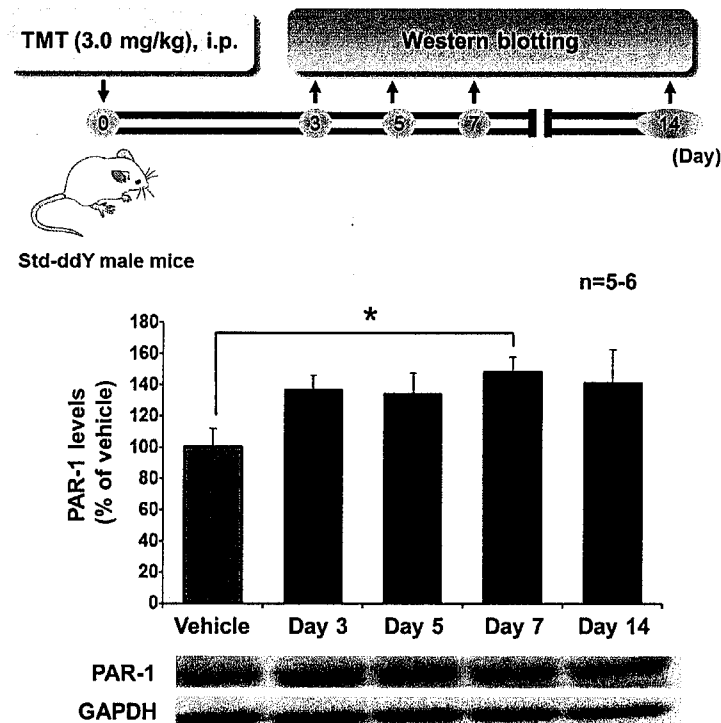
**Figure 31.** 培養液中の LDH 活性

Vehicle, thrombin (1 U/mL) または AP (100 μM) 曝露 24 時間後の培養液中 LDH 活性. LDH Cytotoxicity Detection Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA) を使用. 値は平均 ±S.E. N.S., 有意差なし vs vehicle alone.

### 2.3.6. TMT 処置成体マウス DG における PAR-1 の発現

#### 2.3.6.1. TMT 処置マウスにおける PAR-1 タンパク質の発現量の変化

前述までの結果より、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs は、thrombin や AP の曝露によって、細胞死が誘発されることなく、増殖能が抑制されることが示された。一方、TMT 未処置マウス DG 由来 NPCs と比べて、低濃度の AP の曝露で増殖能が抑制されたことから、PAR-1 の反応性が增強している可能性が示唆される。ラットにおいて、脳血管障害後に PAR タンパク質の発現増加が引き起こされていることが報告されており (55)、TMT 処置マウス DG では PAR の発現量が変化している可能性が考えられた。そこで、マウスに TMT (3.0 mg/kg) の腹腔内投与し、TMT 投与 3、5、7 および 14 日後の DG における PAR-1 の発現量を western blotting 法により確認した。その結果、TMT 投与 7 日後において control と比較して PAR-1 タンパク質の発現量に有意な増加が認められた (Fig. 32)。



**Figure 32.** マウス脳障害後の PAR-1 タンパク質の発現レベル

TMT (3.0 mg/kg, i.p.) 処置 3, 5, 7, 14 日後の PAR-1 タンパク質の発現量. \* P<0.05 vs vehicle 処置マウス.

#### 2.3.6.2. TMT 処置マウス DG における PAR-1 の発現

前述までの結果から、TMT 処置マウスの DG において、PAR-1 タンパク質の発現量が有意に増加していることが示された。そこで、PAR-1 の発現を調べるために、マウスに TMT (3.0 mg/kg) の腹腔内投与を行い、その 48、60 時間後に BrdU を腹腔内投与し、各日数経過後に灌流固定を行い、パラフィン切片を作製した。得られた切片について、PAR-1 の発現とともに、BrdU、nestin または GFAP の発現について解析した。その結果、BrdU と PAR-1 の蛍光免疫二重染色において、TMT 処置、3、5、7 および 14 日後において BrdU/PAR-1 両陽性細胞が認められた (Fig. 33a)。また、nestin と PAR-1 の蛍光免疫二重染色において、TMT 処置、3、5 および 7 日後において PAR-1/nestin 両陽性細胞が認められた。しかし TMT 処置、14 日後において PAR-1/nestin 両陽性細胞は認められなかった (Fig. 33b)。GFAP と PAR-1 の蛍光免疫二重染色においては、TMT 処置、3、5、7 および 14 日後において PAR-1/GFAP 両陽性細胞が認められた (Fig. 33c)。

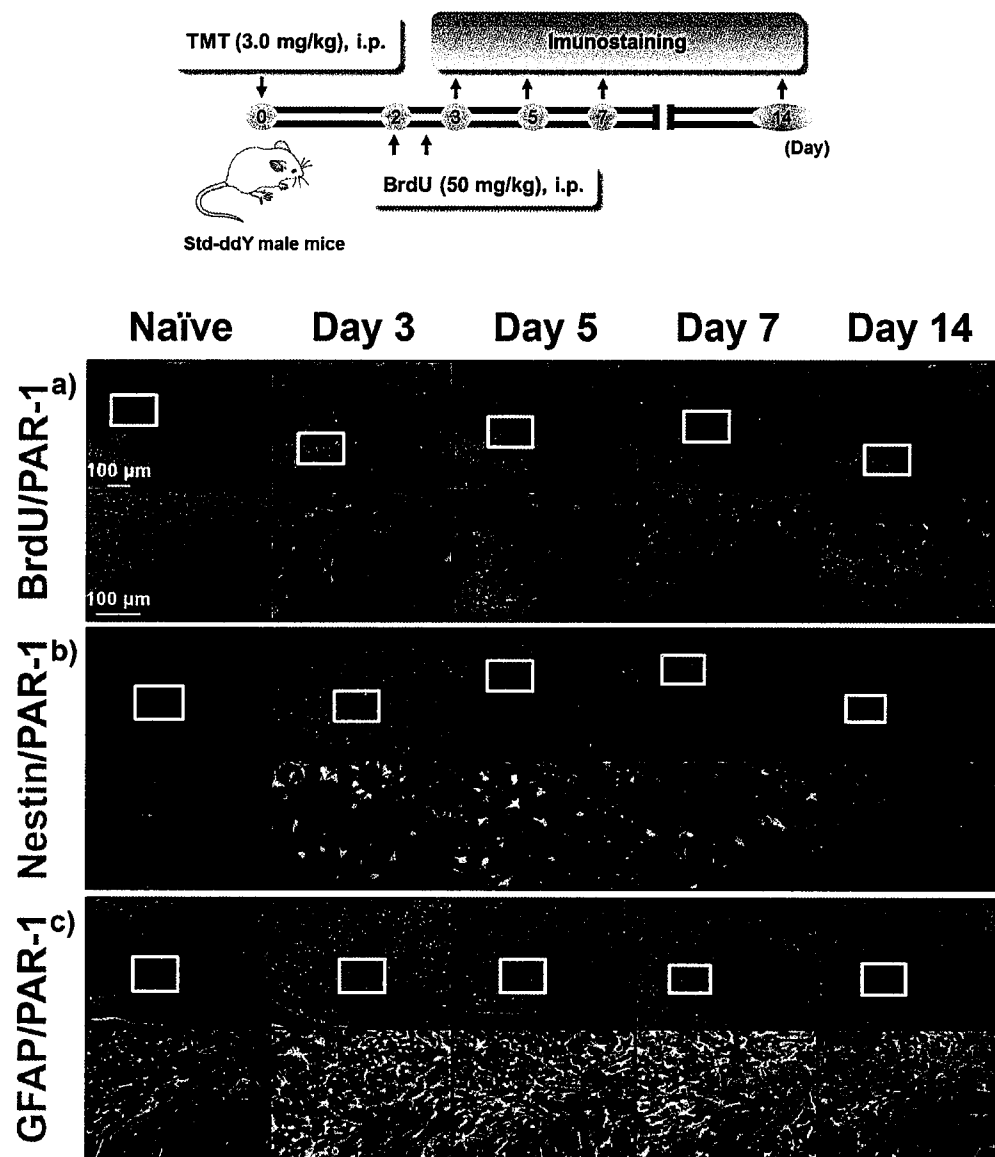


Figure 33. マウス DG 障害後における PAR-1 の発現

- (a) BrdU (red) , PAR-1 (green) .
- (b) PAR-1 (red) , nestin (green) .
- (c) PAR-1 (red) , GFAP (green) .

## 2.4. 考察

本章では、DGにおけるニューロン損傷/自己修復モデルとして、TMT処置マウスを用いた。このモデルは、TMT処置後2日目にGCLにおけるニューロンの脱落后、DGにおいて神経新生が起これ、ニューロン障害後のGCLを再生する。(56)。このモデルを用いた組織学的評価では、ニューロンの修復段階でDGにおけるnestinまたはDCX/BrdU両陽性細胞数が劇的に増加したことから、TMT処置によってニューロン障害後のGCLを修復する神経新生作用の増強が示された。実際、TMT処置後30日目に歯状回GCLにおいてBrdU/NeuN両陽性細胞が観察されたという知見は、GCLにおけるニューロン障害後に新生された細胞が、ニューロンに分化する能力を有することを示す。本章で用いたTMT処置マウスDG由来NPCsにおいても、*in vitro*の分化実験により、ニューロンに分化することを確認した。

TMT処置マウスDG由来NPCsにおける蛍光免疫二重染色、およびRT-PCRによるPAR-1の発現解析では、未処置マウスと同様にNPCsにPAR-1が発現することを確認した。また、thrombinの曝露により、TMT未処置マウスと同様にNPCsの増殖能が抑制されることを確認した。さらに、APの曝露による検討では、thrombin曝露時と同様に、NPCsの増殖能が低下したことから、本現象はPAR-1を介した作用である可能性が推察された。そこで、APの曝露濃度を変化させ、検討を行ったところ、TMT未処置マウスDG由来NPCsでは、増殖能に変化を認めなかったAP (10  $\mu$ M)の濃度において、vehicleと比べて、細胞増殖能の有意な低下を認めたことから、TMT処置マウス由来NPCsでは、PAR-1の感受性が増強している可能性が示唆された。ラットにおいては、脳血管障害後のPARタンパク質の発現増加が報告されている(55)。そこで、western blotting法によりPAR-1タンパク質の発現量を解析したところ、予測どおりTMT処置後3日目以降よりPAR-1タンパク質の発現量の増加を認めた。また、蛍光免疫二重染色による解析では、BrdU/PAR-1両陽性細胞数、nestin/PAR-1両陽性細胞数が、TMT処置3、5日目に著明に増加しており、TMT処置後にDGに出現する新生細胞は、PAR-1陽性のNPCsであることが確認された。これまでの結果より、TMT処置マウス由来NPCsはPAR-1の発現量が増加しており、thrombinに対する感受性が増強している可能性が考えられる。

本章の結果および前述の知見から、神経障害および長期的な認知障害にthrombin活性が臨床上有意に関連していること、そして神経障害後の患者では、PAR-1の発現量が増加しており、thrombinに対する感受性の増強および細胞新生にPAR-1が強く関与する可能性が推察された。本章では、dabigatranによるthrombin阻害剤の検討は、行えなかったが、将来の研究で、dabigatranが脳梗塞再発予防のみならず、NPCs



の増殖能低下の抑制、および機能再生治療への有用性について、解明される可能性がある。PAR-1 の神経新生への関与について詳細に解析することによって、脳血管障害における機能再生治療に役立つことを期待する。

## 第3章 成体マウス DG ニューロン障害後の ニューロン新生に対する cilostazol の 効果

### 3.1. 背景・目的

Cilostazol は、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の分解を抑制し、cAMP に依存する細胞内シグナルを活性化する選択的ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤である (57)。Cilostazol は、抗血小板剤として作用し、臨床的ににおいて閉塞性動脈硬化症の治療や、アテローム性脳梗塞およびラクナ脳梗塞に対する脳梗塞再発予防のために投与される (58)。また、cilostazol は、抗アポトーシスシグナル伝達経路の活性化 (59)、そして脳虚血時に脳内の血管新生を誘導する (60)。さらに、中大脳動脈の閉塞によって誘発された脳卒中において cilostazol は、SVZ 中の NPCs の発生を増強する (61)。しかし、DG における神経障害後に一過性に増加するニューロン新生に対し、cilostazol の影響は不明である。

本章では、DG のニューロン損傷/修復のモデルである TMT 処置マウスにおいて、DG における神経障害後のニューロン新生における cilostazol の影響を解析した (62)。

## 3.2. 方法

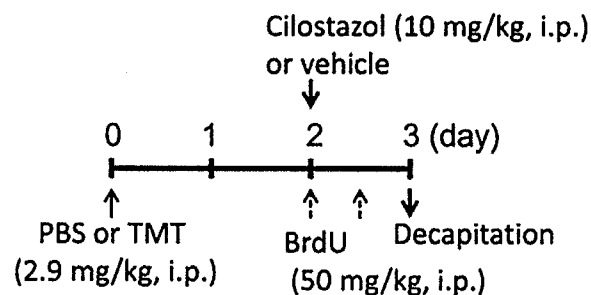
### 3.2.1. 動物飼育

1.2.1.に準じて飼育を行った。

### 3.2.2. 薬物投与

概要を Fig. 34 に示した。実験 1 では、PBS または TMT (2.9 mg/kg) をマウスに腹腔内投与し、その 48 時間後に vehicle (0.5% carboxymethyl cellulose) または cilostazol (10 mg/kg) を腹腔内投与した。また、BrdU (50 mg/kg) を 12 時間ごとに 2 回腹腔内投与した。実験 2 では、PBS または TMT (2.9 mg/kg) をマウスに腹腔内投与し、その 48 時間後から vehicle (0.5% carboxymethyl cellulose) または cilostazol (10 mg/kg) を 24 時間ごとに 14 日間連続投与した。また、BrdU (50 mg/kg) を 12 時間ごとに 2 回腹腔内投与した。全ての薬物は、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。

#### Exp. 1 (acute treatment)



#### Exp. 2 (chronic treatment)

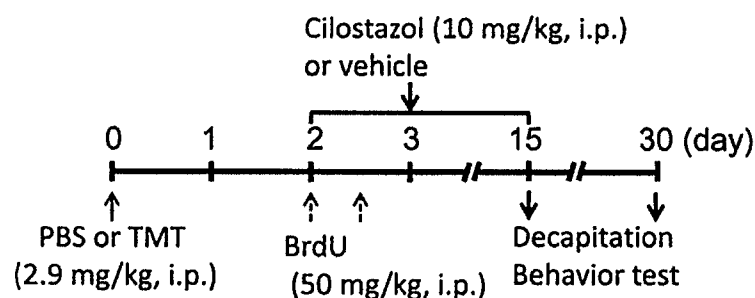


Figure 34. 実験 1 および実験 2 のスケジュール概要

実験 1 および実験 2 の薬物投与およびサンプリングスケジュール。

(文献 62 より転載)

### 3.2.3. 組織の固定と包埋

1.2.12.に準じて組織の固定と包埋を行った。

### 3.2.4. 培養 dish の作成

1.2.2.に準じて培養 dish を作成した。

### 3.2.5. 成体マウス DG 由来 NPCs の培養

1.2.3.に準じて NPCs の培養を行った。

### 3.2.6. MTT 法

1.2.4.に準じて MTT assay を行った。

### 3.2.7. 免疫組織化学法

#### 3.2.7.1. NeuN/BrdU

1.2.12.に準じて作製した標本切片を xylene により脱パラフィン処理した後、ethanol 系列 (100・50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却したのちに TBST で洗浄後、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、mouse anti-NeuN monoclonal antibody および rat anti-BrdU monoclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody および Alexa Fluor® 594 conjugated goat anti-rat IgG (H+L) antibody を混合して TBST で希釈し、室温で 2 時間反応させた。その後、TBST および TB で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

#### 3.2.7.2. Nestin/BrdU

1.2.12.に準じて作製した標本切片を xylene により脱パラフィン処理した後、ethanol 系列 (100・50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却したのちに TBST で洗浄後、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 1 時間のブロッキングを行い、mouse anti-nestin monoclonal antibody および rat anti-BrdU monoclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody および Alexa Fluor® 594 conjugated goat anti-rat IgG (H+L) antibody を混合して TBST で希釈し、室温で 2 時間反応させた。その後、TBST および TB で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

### 3.2.7.3. DCX/BrdU

1.2.12.に準じて作製した標本切片を xylene により脱パラフィン処理した後、ethanol 系列 (100 - 50%) に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で、マイクロウェーブによる抗原賦活化処理を行った。室温まで冷却したのちに TBST で洗浄後、TBST で希釈した 5%ヤギ正常血清で室温 20 分間のブロックングを行い、goat anti-DCX monoclonal antibody および rat anti-BrdU monoclonal antibody を混合して antibody diluent で希釈し、4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody および Alexa Fluor® 594 conjugated goat anti-rat IgG (H+L) antibody を混合して TBST で希釈し、室温で 2 時間反応させた。その後、TBST および TB で洗浄し、VECTASHIELD mounting medium を用いて封入を行った。

### 3.2.8. 免疫細胞化学法

1.2.10.1.に準じて作製した。

### 3.2.9. 成体マウス DG 由来 NPCs のホモジネートの調製

1.2.14.に準じて調製した。

### 3.2.10. タンパク質レベル測定

#### 3.2.10.1. SDS 電気泳動

1.2.14.に準じて回収した細胞質画分タンパク質サンプルに、タンパク変性用試薬 {sodium dodecylsulfate (SDS) 処理用緩衝: 10% glycerol、2% SDS、0.01% bromophenol blue および 2% 2-mercaptoethanol を含む 50 mM Tris-HCL buffer (pH 6.8)} を用量比 4:1 で添加して 100°C、10 分間煮沸した。このように、SDS 処理を行った標品を、電気泳動槽中でポリアクリルアミドゲル (濃縮用ゲル 4.5%、分離用ゲル 10%) を用いて、室温で電気泳動 (15 mA/plate) を行った。

#### 3.2.10.2. Western blotting

SDS 電気泳動後のゲルを、あらかじめ 100% methanol で活性化しておいた polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に、90-100 mA、100 V で 45 分間ブロッティングした。ブロッティング終了後、同膜を、0.05% Tween 20 を含む 0.05% TBST で洗浄した後、0.05% TBST で溶解した 5% スキムミルクで 1 時間ブロックングを行った。この PVDF 膜を 1% スキムミルクで各濃度に希釈した pCREB および GAPDH に対する各抗体溶液を用いて、室温で 2 時間反応させた。0.05% TBST で洗浄 (5 分間×3 回) した後、Polyclonal Swine Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP を 1% スキムミルクで希釈した溶液を室温で 1 時間反応させた。その後 0.05% TBST で洗浄 (10 分間×3 回)

し、Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus による発光反応を X 線フィルムで検出した。

#### 3.2.11. 強制水泳試験法

TPX ビーカー (18×26 cm; Sanplatec, Osaka, Japan) に深さ 18cm の淡水を張り、25℃に維持した状態で、マウスを個々に泳がせた。マウスがもがいたり、泳いだりして逃避する行動をあきらめた状態を無動と見なし、5 分間の試験中における、全無動時間を記録した。個々のマウスを薬物で処理した後の無動時間の変化を測定した。

#### 3.2.12. データ解析

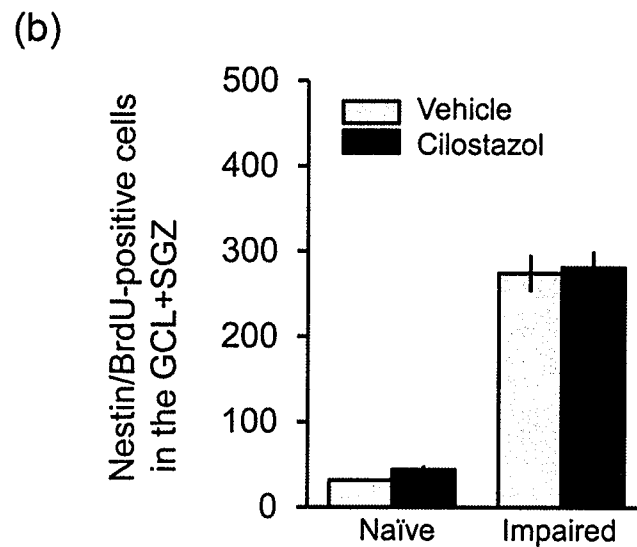
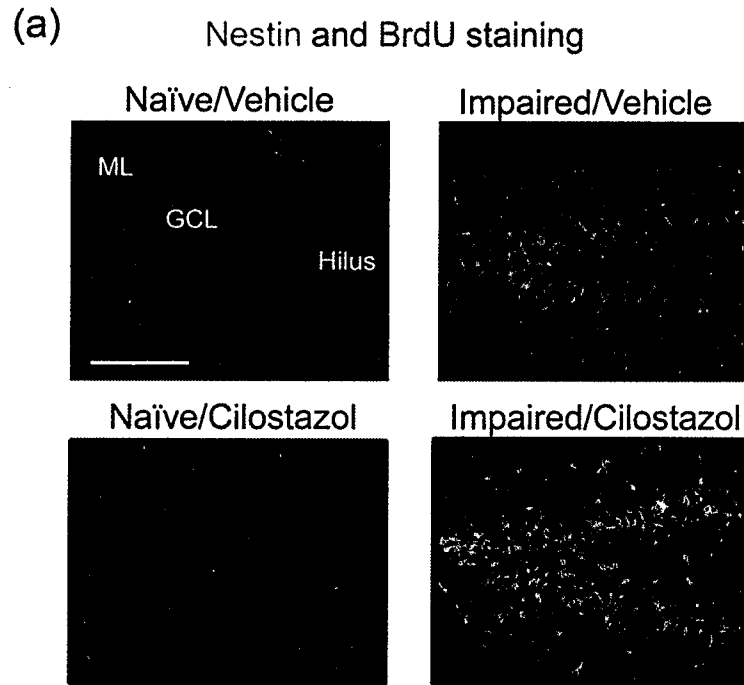
1.2.16. に準じてデータ解析を行った。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. 成体マウス DG ニューロン障害後急性期における nestin/BrdU 両陽性細胞の新生に対する cilostazol の効果

当研究室では以前、マウスの腹腔内に TMT (2.8・2.9 mg/kg) を投与した 2 日後に、DG 顆粒細胞層においてニューロンが選択的に障害され、認知障害を生じることを報告した (56)。DG において TMT 誘発ニューロン障害後、BrdU 陽性細胞および神経発生関連マーカーである nestin、NeuroD、または DCX 陽性細胞数が顕著に増加する様子が観察される。この神経系の損傷/自己修復モデルを用いて、ニューロン障害後の神経修復に対する cilostazol の効果を評価した。ニューロン障害後急性期のマウス DG における nestin/BrdU 両陽性細胞の新生に対する cilostazol の効果を評価するために、TMT 処置後 2 日目に cilostazol (10 mg/kg) および BrdU を腹腔内投与した (Fig. 35)。

その結果、TMT 未処置マウスと比べて、TMT 処置マウスでは、GCL/SGZ 領域、分子層、および歯状回門を含む DG 全体において、nestin/BrdU 両陽性細胞数が劇的に増加した。これらの中で GCL/SGZ 領域は、TMT 処置マウスにおいて nestin/BrdU 両陽性細胞の割合が最も多かった。cilostazol の投与は、TMT 未処置マウス、または TMT 処置マウスにおいて、少なくとも本領域における nestin/BrdU 両陽性細胞の新生数に有意な変化を与えなかった。



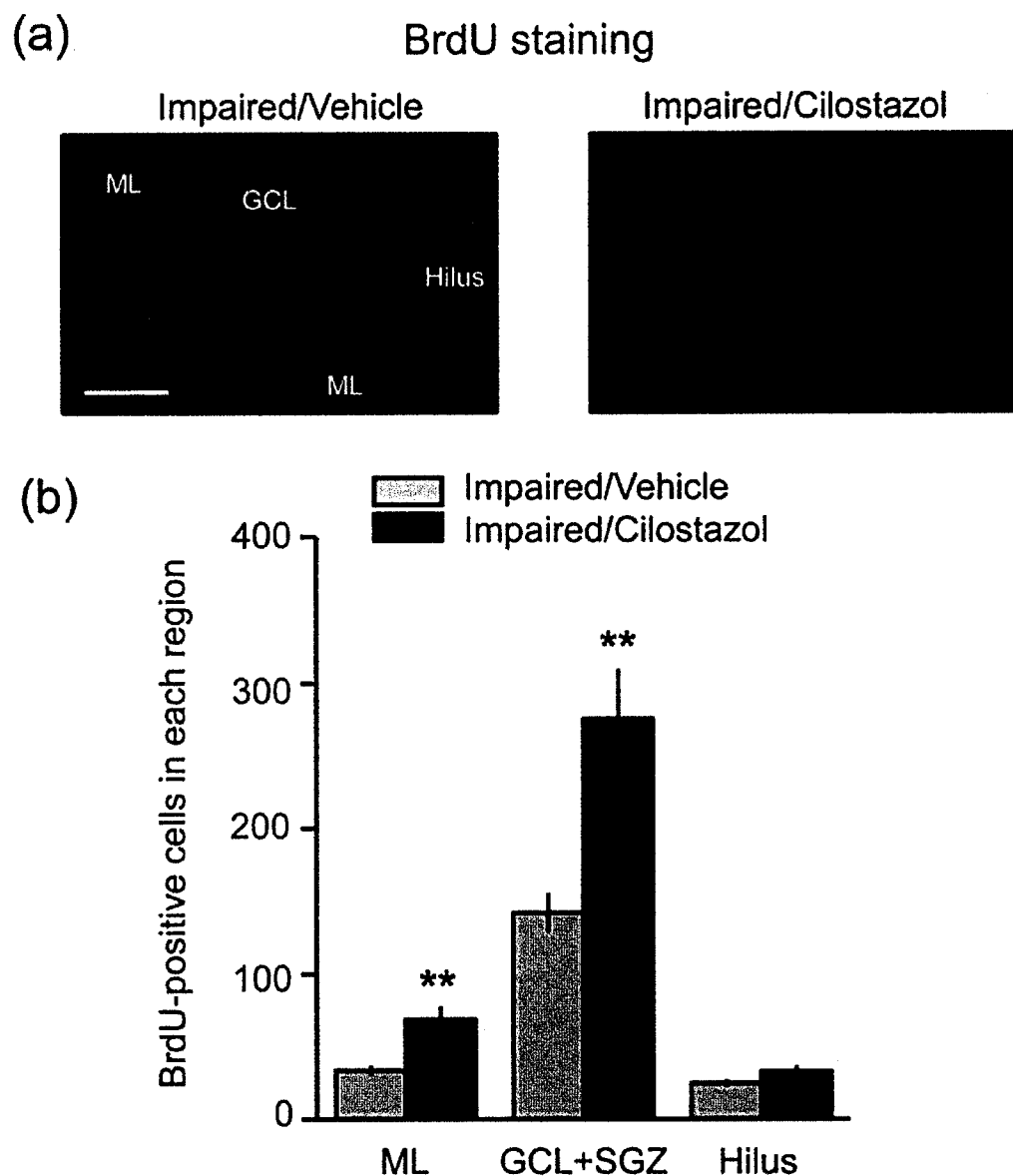
**Figure 35.** 成体マウス DG ニューロン障害後急性期における nestin/BrdU 両陽性細胞の新生に対する cilostazol の効果 (実験 1)

- (a) Naïve/Vehicle, Naïve/Cilostazol, Impaired/Vehicle, Impaired/Cilostazol の各群の DG における nestin (green) および BrdU (red) の蛍光顕微鏡写真.
- (b) 各群の GCL/SGZ 領域における nestin/BrdU 両陽性細胞数. 値は平均  $\pm$ S.E. Scale bar =100  $\mu$ m. (文献 62 より転載)



### 3.3.2. 成体マウス DG ニューロン障害後に新生された BrdU 陽性細胞の生存に対する cilostazol の効果

DG ニューロン障害後に、新生された NPCs の生存および神経分化の促進は、ニューロン変性に伴うニューロン再生に重要である。そこで、TMT 処置マウスに cilostazol を 14 日間連続投与し、DG ニューロン障害後における BrdU 陽性細胞の生存に対する効果を解析した。TMT 処置後 30 日目に DG の 3 つの異なる小領域に生存する BrdU 陽性細胞を計数することによって、細胞生存率を評価した (Fig. 36)。その結果、BrdU 陽性細胞数は、TMT 処置マウスの分子層および歯状回門と比べて、GCL/SGZ 領域において最も多かった。また、TMT 処置マウスに cilostazol を 14 日間連続投与すると、vehicle と比べて、分子層および GCL/SGZ 領域における BrdU 陽性細胞数が有意に増加した。歯状回門では、BrdU 陽性細胞数に有意差は認められなかった。



**Figure 36.** 成体マウス DG ニューロン障害後に新生された BrdU 陽性細胞の生存に対する cilostazol の効果 (実験 2)

- (a) TMT 処置マウス DG における BrdU 陽性細胞の蛍光顕微鏡画像
- (b) Vehicle または cilostazol を投与した TMT 処置マウスの分子層 (ML), GCL/SGZ および歯状回門 (hilus) 領域における BrdU 陽性細胞数. 値は平均  $\pm$  S.E. \*\* $P < 0.01$  vs vehicle group. Scale bar = 100  $\mu$ m. (文献 62 より転載)

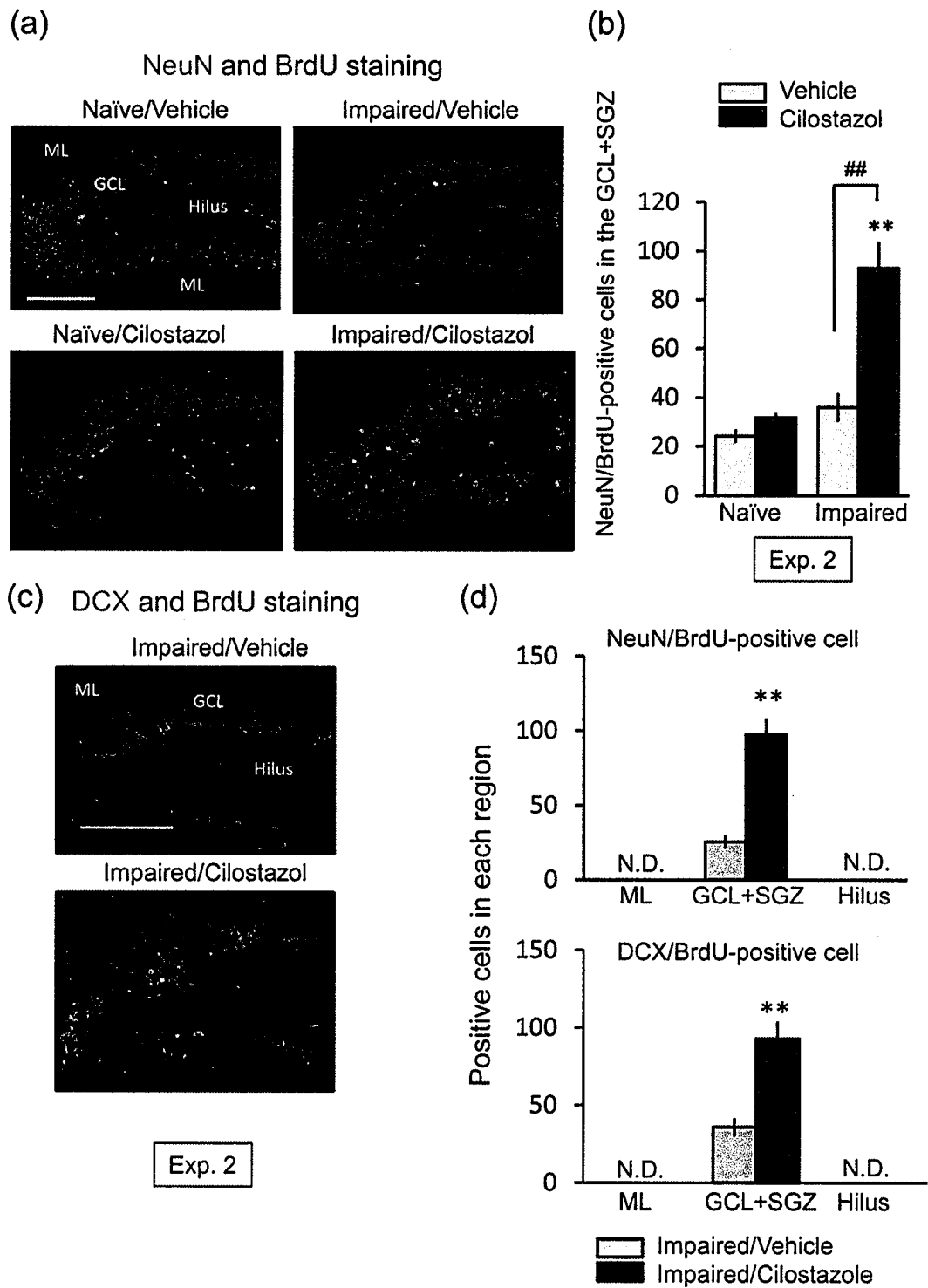


Figure 37. 成体マウス DG ニューロン障害後に新生された BrdU 陽性細胞のニューロン分化に対する cilostazol の効果 (実験 2)

- (a) 4 群 (Naive/Vehicle, Naive/Cilostazol, Impaired/Vehicle, Impaired/Cilostazol) の DG における NeuN (green) または BrdU (red) 陽性細胞および両陽性細胞 (yellow) の蛍光顕微鏡画像.
- (b) 4 群の GCL/SGZ 領域における NeuN/BrdU 両陽性細胞数. 値は平均  $\pm$ S.E.   
 \*\* $P < 0.01$  vs naïve マウス. ## $P < 0.01$  vs vehicle 処置マウス.
- (c) Vehicle または cilostazol 投与を行った TMT 処置マウス DG における BrdU (red) および DCX (green) 陽性細胞の蛍光顕微鏡画像.
- (d) Vehicle または cilostazol 投与を行った TMT 処置マウス DG の GCL/SGZ, ML および hilus 領域における両陽性細胞数. 値は平均  $\pm$ S.E.   
 \*\* $P < 0.01$  vs vehicle 処置マウス. (文献 62 より転載)

### 3.3.4. 成体マウス DG における pCREB の発現量に対する cilostazol の効果

Cilostazol は、cAMP の分解を抑制し、cAMP 依存性細胞内シグナル伝達として CREB を活性化する (57)。また pCREB は、神経保護分子を発現し、新生細胞の増殖、分化、および生存に重要な役割を果たすことが知られている (63,64)。そこで、cilostazol による cAMP 依存性細胞内シグナル伝達の活性化を確認するために、cilostazol 投与が DG における pCREB の発現量に影響を及ぼすかどうか検討を行った。その結果、cilostazol は、cilostazol 投与 3~24 時間の DG における pCREB 発現量を上昇させた (Fig. 38)。

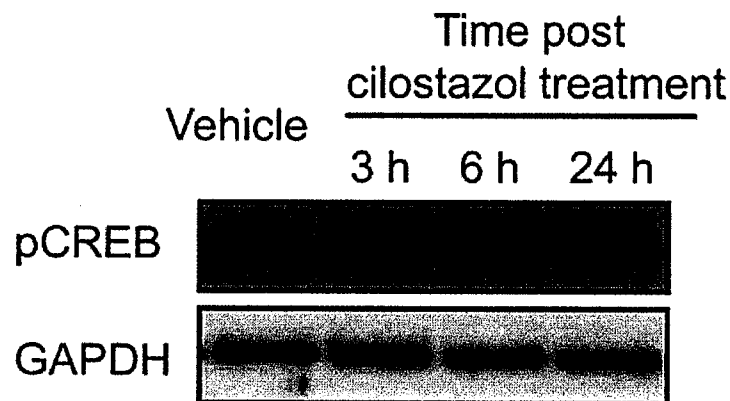


Figure 38. 成体マウス DG における pCREB の発現量に対する cilostazol の効果  
(文献 62 より転載)

### 3.3.5. 成体マウス DG ニューロン障害後のうつ病様行動に対する cilostazol の効果

当研究室では以前、TMT を 2.9mg/kg で投与されたすべてのマウスが 24 時間後に後肢運動麻痺を伴う全身性振戦を発症し、この症状は、TMT 処置後 3 日間持続することを報告した。また、TMT 処置されたすべてのマウスは、実験中、攻撃的な挙動を示した。しかし、TMT 処置で誘発されたこれらの行動変化は、TMT 処置後 4 日目に消失した (65-67)。これらの行動異常に加えて、TMT 処置後 4 日目に視覚認識の記憶障害が観察され、14 日目以降に改善された (56)。そこで別の異常行動として、TMT 処置マウスのうつ病様行動に注目した。その結果、強制水泳試験において、vehicle 群では、TMT 処置後 30 日目の無動時間が著しく延長した。一方、cilostazol 投与群では、TMT 処置後 30 日目の無動時間の延長が有意に軽減された (Fig. 39)。

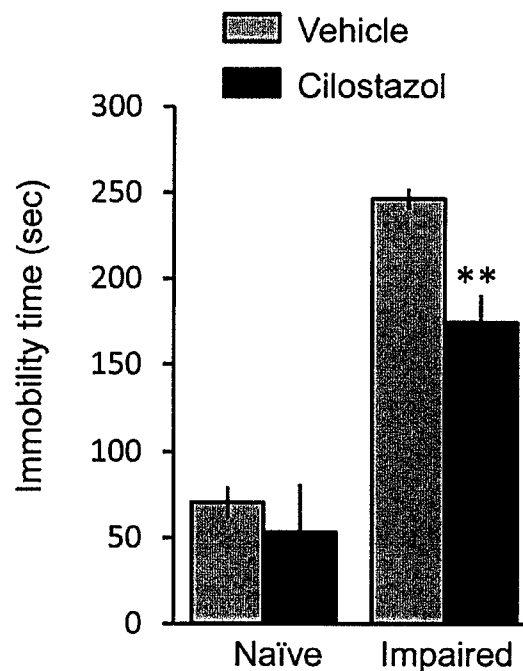


Figure 39. 成体マウス DG ニューロン障害後のうつ病様行動に対する cilostazol の効果 (実験 2)

値は平均  $\pm$ S.E. \*\*P<0.01 vs TMT 処置 vehicle 投与マウス. (文献 62 より転載)

### 3.3.6. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖活性および pCREB の発現量に対する cilostazol の効果

NPCs の増殖に対する cilostazol の直接曝露の効果を評価するために、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs を調製した (Fig. 40)。

Fig. 40b は、DG における NPCs の Type-1 または Type-2a 細胞のマーカートンパク質である nestin および BLBP の蛍光免疫染色の結果を示す (1-3)。その結果、95% 以上の細胞が nestin または BLBP の陽性細胞であった。

培養 NPCs に対し、cilostazol (0.1-1  $\mu$ M) の曝露によって、細胞増殖能が有意に上昇することを確認した (Fig. 40c)。

また、同様の実験条件下で、cilostazol 曝露による培養 NPCs 中の pCREB 発現量に及ぼす影響を検討したところ、cilostazol (0.1  $\mu$ M) の曝露によって、細胞内 pCREB の発現量が上昇することを確認した (Fig. 40d)。

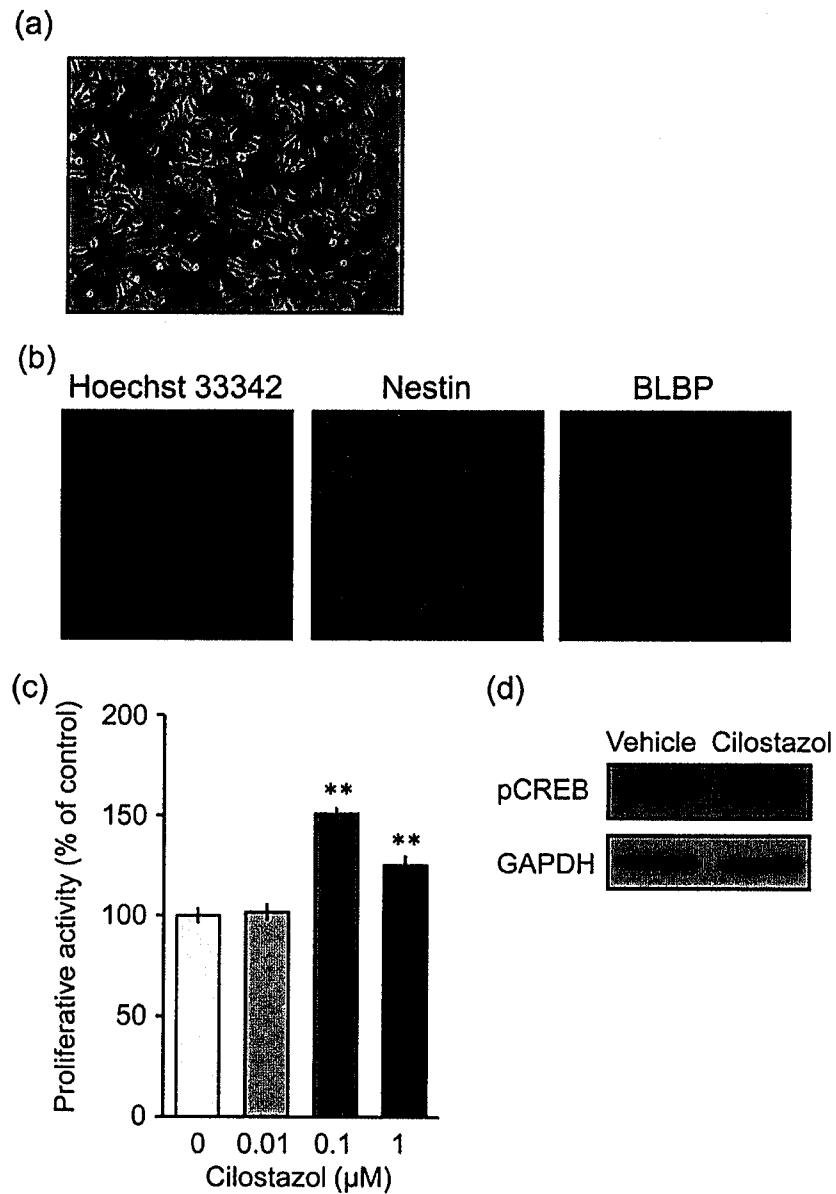


Figure 40. TMT 処置マウス DG 由来 NPCs の増殖活性および pCREB 発現量に対する cilostazol の効果

- (a) Cilostazol 非存在下で培養した細胞の顕微鏡画像.
- (b) Hoechst で対比染色した nestin および BLBP について蛍光免疫染色を行った細胞の蛍光顕微鏡画像.
- (c) Vehicle または cilostazol のいずれかの存在下で、各々の cilostazol 濃度で 4 日間培養後の MTT 還元能. \*\* $P < 0.01$  vs vehicle alone.
- (d) Vehicle または cilostazol (0.1  $\mu\text{M}$ ) のいずれかの存在下で培養後 cell lysates を調製し、immunoblot を施行. (文献 62 より転載)

### 3.4. 考察

本章では、ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤である *cilostazol* が、DG のニューロン障害後に生成された NPCs の生存および分化を促進することによって、神経再生に有益な効果を有することを示した。凍結損傷 (68)、アブレーション損傷 (69)、または定量的脳損傷モデル (70) では、損傷大脳皮質周囲の NPCs が増加することが示されている。本章では、前述のとおり、DG におけるニューロン損傷/自己修復モデルとして、TMT 処置マウスを用いた。このモデルは、TMT 処置後 2 日目に GCL におけるニューロン脱落后、DG において神経新生が起こり、神経障害後の GCL を再生する。(56)。このモデルを用いた組織学的評価では、修復段階で *nestin* または DCX 陽性 BrdU 陽性細胞の DG における数が劇的に増加し、TMT 処置によるニューロン障害後の GCL を修復する神経新生の増強が示された。実際、TMT 処置後 30 日目に歯状回 GCL において BrdU/NeuN 両陽性細胞が観察されたという知見は、GCL におけるニューロン障害後に新生された細胞がニューロンに分化する能力を有することを示す。このモデルの行動評価では、ニューロンの修復を伴う変性段階の間にマウスに認知障害が観察されるが(56,67)、うつ病様行動は TMT 治療後 30 日目にも観察可能であった(71,72)。

本章の結果は、*cilostazol* の連続投与が、このモデルにおけるうつ病様行動を改善し、*cilostazol* が DG におけるニューロン障害後の機能的ニューロン修復の増強により、おそらく神経変性症状を改善することができることを示唆している。海馬における成体の神経新生過程は、少なくとも 3 つの段階、すなわち NPCs の増殖、移動、および生存・分化に分けられる。そこで、海馬の神経新生過程に対する *cilostazol* の効果を調べるために、実験 1 および実験 2 の 2 つの実験スケジュールにより検討を行った。実験 1 では、DG におけるニューロン障害後の NPCs の増殖に対する *cilostazol* の効果を調べるために、TMT 処置後 2 日目に BrdU を投与し、*cilostazol* の 1 回投与による影響を検討した。実験 2 では、DG におけるニューロン障害後 30 日目における、新生細胞の生存または分化を検討するため、NeuN/BrdU または DCX/BrdU 両陽性細胞に対する *cilostazol* の連続投与の影響を検討した。実験 2 の条件下における本章の結果は、*cilostazol* の連続投与が、TMT 処置マウスにおける DG における新生細胞のニューロン分化を増強したことを示している。

成体海馬における神経新生の過程において、DG の GCL には、前述のとおり Type-1、2a、2b および Type-3 の異なる 4 つの段階がある (1-3)。Type-1 細胞は、放射状グリア様細胞に分類され、まれに細胞周期に入る (slow-cycling cell)。Type-2a 細胞は、*amplifying* 前駆細胞であり、Type-1 から誘導されることが知られ、頻繁に細胞周期に入る (fast-cycling cell)。Type-2b 細胞を介し、Type-3 細胞は増殖活性のない神経



芽細胞になり、GCLに移行する成熟ニューロンに分化する。TMT 未処置マウスおよび TMT 処置マウスの DG から調製した NPCs による *ex vivo* 実験では、TMT 未処置マウスにおける Type-1 細胞数は、Type-2 細胞数より約 3 倍多いが、TMT 処置マウスの神経修復の初期段階においては、Type-2a 細胞数が Type-1 細胞数より 1.5 倍に増えた (73)。これらの知見は、TMT 処置マウスの DG におけるニューロン修復の初期段階において、Type-1 細胞数よりも Type-2a 細胞数が多いことを示唆しているが、Type-1 および Type-2a 細胞の両方が DG において増加した。実験 1 の条件下で、cilostazol の単回投与が GCL/SGZ における新生細胞 (BrdU 取り込み細胞) の数に有意な変化をもたらさなかったことを示すデータは、DG におけるニューロン障害後の修復の初期段階では、cilostazol が Type-1 細胞および Type-2 細胞の増殖に有益な効果を示さないことを示している。しかしながら、TMT 処置マウス DG 由来 NPCs を増殖因子存在下で培養した *in vitro* 実験では、cilostazol の 4 日間曝露によって、NPCs の増殖能は有意に増強された。この知見は、cilostazol の連続曝露が、nestin および BLBP で標識された Type-1/2a 細胞である NPCs の増殖能を増強するのに有効であることを示唆する。

さらに本章では、cilostazol の連続曝露が、TMT 処置後 30 日目までの、GCL 中で新たに生成された NeuN 陽性細胞、および DCX 陽性細胞の数を劇的に増加させることを示した。これらの新生ニューロンは、分子層および歯状回門ではなく、GCL に主に位置していた。これらのデータは、cilostazol が、新生細胞をニューロンに分化させることができることを示唆し、ニューロンは GCL に移行する。cilostazol が TMT 未処置マウスの GCL において、新生ニューロンに対し、有意な影響を及ぼさなかったという知見は、cilostazol による海馬神経発生の増強は、ニューロン障害後の DG のみに選択的であることを示唆する。これらの知見と一致して、cilostazol によって TMT 誘発のうつ病様行動は改善された。DG のニューロン障害後の海馬における神経新生の増強は、非障害時の DG における機構とは異なるメカニズムによって調節されている可能性が最も高い。この興味深い可能性は、DG におけるニューロンの損傷/自己修復を観察できる本モデルマウスを用いることによって評価することができる。

ニューロン障害後の DG における神経新生の増強に対し、cilostazol はどのように関与しているのか。1 つの可能性は、cAMP 依存性シグナル伝達経路への関与である。一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスを用いた研究において、cilostazol が、脳室下帯で新生した BrdU/DCX 両陽性細胞の密度を、虚血処置が行われていない vehicle 群と比較して有意に増加させることが示された (61)。このモデルにおいて、cilostazol は、脳室下帯における DCX 陽性 pCREB 発現 NPCs の数を増加させることが示された。これらの結果は、cilostazol が、局所虚血後の cAMP 依存性シグナル伝達経路を介し

て脳室下帯における NPCs の増殖を増強することを示唆している。pCREB は、NPCs の増殖および生存に寄与することが知られている (74)。さらに、pCREB は、脳室下帯から嗅球へと吻側に移行する新生細胞から分化する神経芽細胞においてアップレギュレートされる (64)。上記の研究に加えて、現在のデータは、cilostazol の処置が DG における *in vivo*、および *in vitro* である培養 NPCs において pCREB 発現量を上昇させること、そして cilostazol が cAMP 依存性シグナル伝達経路の活性化を介して神経新生を促進することを示した。Cilostazol による他の作用メカニズムとして、cilostazol によるホスホジエステラーゼ 3 の阻害によって活性化される、cGMP/プロテインキナーゼ G シグナル伝達への関与である。実際に、cGMP/プロテインキナーゼ G シグナル伝達は、胎生マウス新皮質由来の NPCs の生存・増殖に必須であることが知られている (75)。

本章では、DG におけるニューロン障害後に発生した海馬 NPCs において、cilostazol が cGMP/プロテインキナーゼ G シグナル伝達を増強するかどうかは調べることができなかった。また、マウス胎児における pCREB について、活性化状態の Rho を不活性化状態に戻す GTPase activating protein (GAP) 欠損マウスでは、pCREB 発現量が減少し、一方、Y27632 の前処理によって、pCREB 発現量が増加することが報告されており (76)、PAR-1 シグナルと共通の経路を介する可能性も示唆されるが、検討を行うことはできなかった。今後、SVZ および DG における NPCs の増殖および生存・分化における cGMP/プロテインキナーゼ G シグナル伝達の関与を評価する将来の研究によって、cilostazol によって引き起こされる神経新生の増強メカニズムが解明される可能性がある。

本章では、cilostazol は、*in vivo* における TMT 処置後に誘発されるニューロン障害後の生存、神経分化または新生細胞の増殖を促進する作用を有することを確認した。そして、NPCs に対する cilostazol のこれらの作用機序は、cAMP 依存性シグナル伝達の活性化が関与していることが推察された。以上より、cilostazol は、成体動物の DG におけるニューロン障害後に神経新生を促進する可能性があると言える。

## おわりに

### 結語

近年、脳血管障害後の機能再生治療法として、iPS 細胞や ES 細胞を生体外で神経幹細胞へ分化誘導させ、ニューロンの脱落部位に移植する方法が注目されている。このような方法はきわめて有用であると考えられるが、その反面、移植時の拒絶反応などの様々な問題を抱える。一方、内在性の NPCs の増殖およびニューロン新生を促進することができれば、移植治療と比べはるかに安全性の高い治療方法になり得る。本研究では、(1) thrombin が NPCs の増殖能を抑制すること、(2) それらは臨床において脳梗塞の一次予防・二次予防に用いる dabigatran によって改善し得ること、(3) 脳梗塞発症後の再発予防に用いる cilostazol がニューロン障害後に一過性に増加する NPCs の生存を維持し、さらにそれらの細胞の、ニューロンへの分化を促進している可能性が示された。したがって、脳梗塞再発予防薬が NPCs 増殖能改善作用、ニューロン新生促進作用を介して脳血管障害後の機能再生治療に有効である可能性は高い。

今後、臨床現場で適応されている脳梗塞予防薬・治療薬についての本研究と同様な解析を推し進めることが、脳血管障害後の治療における予後の大きな改善につながると確信する。加えて、同薬物のニューロン新生促進メカニズムを更に詳細に解析することにより、脳梗塞再発予防薬・治療薬の脳血管障害後におけるニューロン脱落後のニューロン新生促進作用が期待される医薬品の開発を期待したい。

## 謝辞

本論文は、筆者が摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室において行った研究をまとめたものです。本研究の遂行において、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室教授、荻田喜代一先生に心より厚く御礼申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご助言とご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬物治療学研究室教授、前田定秋先生に心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたり、数多くの貴重なご助言とご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室准教授、米山雅紀先生に心より感謝申し上げます。

実験を実施するための環境を整備して頂き、数多くのご助言とご指導を戴きました摂南大学大学院薬学研究科薬理学研究室助教、山口太郎先生、同研究室助教、尾中勇祐先生に心より感謝申し上げます。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を戴いた同研究室の皆様にも心より感謝致します。

本研究の遂行において、貴重なご助言とご指導を戴きました九州保健福祉大学薬学部薬学科薬理学第Ⅰ講座助教、芝達雄先生、ならびに、大阪大学大学院歯学研究科薬理学教室助教、長谷部茂先生に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、社会人大学院進学にあたり、特段のご理解とご配慮を賜りました関西医科大学附属病院薬剤部部長、廣田育彦先生、ならびに、仕事と研究の両立にあたり、多大なるご支援とご協力を戴きました薬剤部の先生方に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *Journal of Neuroscience* 21:7153–7160.
2. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV., 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature Neuroscience* 7:1233–1241.
3. Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G., 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54, 805–814.
4. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
5. Jessberger S, Kempermann G., 2003. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *European Journal of Neuroscience* 18, 2707-2712.
6. Song H, Kempermann G, Overstreet Wadiche L, Zhao C, Schinder AF, Bischofberger J., 2005. New Neurons in the Adult Mammalian Brain: Synaptogenesis and Functional Integration. *Journal of Neuroscience* 25, 10366-10368.
7. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocamp. *Trends in Neurosciences* 27, 447-452.
8. Alessio Attardo, Klaus Fabel, Julia Krebs, Wulf Haubensak, Wieland B. Huttner, and Gerd K., 2009. Tis21 Expression Marks Not Only Populations of Neurogenic Precursor Cells but Also New Postmitotic Neurogenesis. *Cerebral Cortex* 20, 304-314.
9. Altman J, Das GD., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* 124, 319-335.
10. Reynolds BA, Weiss S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
11. Arlotta P, Magavi SS, Macklis JD., 2003. Molecular manipulation of neural precursors in situ: induction of adult cortical neurogenesis. *Experimental*

- Gerontology* 38, 173-182.
12. Ross, C.A. and Poirier, M.A., 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine* 10, S10-S17.
  13. Selkoe, D.J., 2004. Cell biology of protein misfolding the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology* 6, 1054-1061.
  14. Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Ogita K., 2011. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. *Journal of Pharmacological Sciences* 115, 425-32.
  15. Shinohara Y., 2006. Regional differences in incidence and management of stroke - is there any difference between Western and Japanese guidelines on antiplatelet therapy? *Cerebrovascular Diseases* 21, Suppl 1, 17-24.
  16. 篠原幸人. 2006. インターベンション時代の脳卒中学 超急性期から再発予防まで 序文. *日本臨床* 64, 1-5.
  17. Hata J, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Tanaka K, Okubo K, Nakamura H, Oishi Y, Ibayashi S, Iida M., 2005. Ten year recurrence after first ever stroke in a Japanese community: the Hisayama study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76, 368-372.
  18. Bernhardt J, Dewey H, Thrift A, Collier J, Donnan G., 2008. A very early rehabilitation trial for stroke (AVERT) : phase II safety and feasibility. *Stroke* 39, 390-396.
  19. Potter D, Burke M, Rigby P, Hooper L., 2008. Supplemental plant sterols and stanols for serum cholesterol and cardiovascular disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008.
  20. Lee YS, Bae HJ, Kang DW, Lee SH, Yu K, Park JM, Cho YJ, Hong KS, Kim DE, Kwon SU, Lee KB, Rha JH, Koo J, Han MG, Lee SJ, Lee JH, Jung SW, Lee BC, Kim JS., 2011. Cilostazol in Acute Ischemic Stroke Treatment (CAIST Trial) : a randomized double-blind non-inferiority trial. *Cerebrovascular Diseases* 32, 65-71.
  21. Almonte AG, Sweatt JD., 2011. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. *Brain Research* 1407, 107-122.
  22. Coughlin SR., 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264.
  23. Xi G, Reiser G, Keep RF., 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *Journal of Neurochemistry* 84, 3-9

24. Tanaka M, Yoneyama M, Shiba T, Yamaguchi T, Ogita K., 2016. *Journal of Pharmacological Sciences* 131, 162-171.
25. Temple, S., 1989. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340, 471-473.
26. Ahn HS, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M, Graziano M., 2000. Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl) phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3, 2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797) , a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochemical Pharmacology* 60, 1425-1434.
27. Kato Y, Kita Y, Nishio M, Hirasawa Y, Ito K, Yamanaka T, Motoyama Y, Seki J., 1999. In vitro antiplatelet profile of FR171113, a novel non-peptide thrombin receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 384, 197-202.
28. Andrade-Gordon P, Maryanoff BE, Derian CK, Zhang HC, Addo MF, Darrow AL, Eckardt AJ, Hoekstra WJ, McComsey DF, Oksenberg D, Reynolds EE, Santulli RJ, Scarborough RM, Smith CE, White KB., 1999. Design, synthesis, and biological characterization of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12257-12262.
29. Zhang HC, Derian CK, Andrade-Gordon P, Hoekstra WJ, McComsey DF, White KB, Poulter BL, Addo MF, Cheung WM, Damiano BP, Oksenberg D, Reynolds EE, Pandey A, Scarborough RM, Maryanoff BE., 2001. Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (par-1) antagonists: potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 1021-1024.
30. Parent JM., 2003. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist* 9, 261-272.
31. Ogita K, Sugiyama C, Acosta GB, Kuramoto N, Shuto M, Yoneyama M, Nakamura Y, Shiba T, Yamaguchi T., 2012. Opposing roles of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor in trimethyltin-induced cytotoxicity in the mouse hippocampus. *Neuroscience Letters* 511, 116-119.
32. DerMardirossian C, Bokoch GM., 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology* 15, 356-363.
33. Etienne-Manneville S, Hall A., 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
34. Whitehead IP, Zohn IE, Der CJ., 2001. Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors. *Oncogene* 20, 1547-1555.

35. Maggio N, Itsekson Z, Dominissini D, Blatt I, Amariglio N, Rechavi G, Tanne D, Chapman J., 2013. Thrombin regulation of synaptic plasticity: implications for physiology and pathology. *Experimental Neurology* 247, 595-604.
36. Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF., 2000. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *Journal of Neuroscience* 20, 4582-4595.
37. Gurwitz D, Cunningham DD., 1988. Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3440-3444.
38. Grabham P, Cunningham DD., 1995. Thrombin receptor activation stimulates astrocyte proliferation and reversal of stellation by distinct pathways: involvement of tyrosine phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 64, 583-591.
39. Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER., 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813-825.
40. Debeir T, Benavides J, Vige X., 1998. Involvement of protease activated receptor-1 in the in vitro development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 82, 739-752.
41. Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G., 2002. Thrombin (PAR-1) -induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 283, C1351-C1364.
42. Majumdar M, Seasholtz TM, Goldstein D, de Lanerolle P, Brown JH., 1998. Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 10099-10106.
43. Nicole O, Goldshmidt A, Hamill CE, Sorensen SD, Sastre A, Lyuboslavsky P, Hepler JR, McKeon RJ., 2005. Traynelis SF. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury. *Journal of Neuroscience* 25, 4319-4329.
44. Ubl JJ, Reiser G., 1997. Characteristics of thrombin-induced calcium signals in rat astrocytes. *Glia* 21, 361-369.
45. Wang Y, Luo W, Stricker R, Reiser G., 2006. Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1. *Journal of Neurochemistry* 98, 1046-1060.
46. Ohnishi M, Katsuki H, Fujimoto S, Takagi M, Kume T, Akaike A., 2007.



- Involvement of thrombin and mitogen-activated protein kinase pathways in hemorrhagic brain injury. *Experimental Neurology* 206, 43-52.
47. Fujimoto S, Katsuki H, Ohnishi M, Takagi M, Kume T, Akaike A., 2007. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. *Neuroscience* 144, 694-701.
  48. Hayashi T, Kato Y, Fukuoka T, Deguchi I, Maruyama H, Horiuchi Y, Sano H, Nagamine Y, Mizuno S, Tanahashi N., 2015. Clinical features of ischemic stroke during treatment with dabigatran: an association between decreased severity and a favorable prognosis. *Internal Medicine* 54, 2433-2437.
  49. Chen B, Friedman B, Whitney MA, Winkle JA, Lei IF, Olson ES, Cheng Q, Pereira B, Zhao L, Tsien RY, Lyden PD., 2012. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia. *Journal of Neuroscience* 32, 7622-7631.
  50. Reuhl, K. R., Smallridge, E. A., Chang, L. W., Mackenzie, B. A., 1983. Developmental effects of trimethyltin intoxication in the neonatal mouse. I. Light microscopic studies. *Neurotoxicology* 4, 19-28.
  51. Chang, L. W., Tiemeyer, T. M., Wenger, G. R., McMillan, D. E., 1982. Neuropathology of mouse hippocampus in acute trimethyltin intoxication. *Neurobehavioral toxicology and teratology* 4, 149-156.
  52. Ogita, K., Nitta, Y., Watanabe, M., Nakatani, Y., Nishiyama, N., Sugiyama, C., Yoneda, Y., 2004. In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacology* 47, 619-630.
  53. Harry GJ, McPherson CA, Wine RN, Atkinson K, Lefebvre d'Hellencourt C., 2004. Trimethyltin-induced neurogenesis in the murine hippocampus. *Neurotoxicity Research* 5, 623-627.
  54. Shintani N, Ogita K, Hashimoto H, Baba A., 2007. Recent Studies on the Trimethyltin Actions in Central Nervous System. *Yakugaku Zasshi* 127, 451-461.
  55. Pompili E, Fabrizi C, Nori SL, Panetta B, Geloso MC, Corvino V, Michetti F, Fumagalli L., 2011. Protease-activated receptor-1 expression in rat microglia after trimethyltin treatment. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 59, 302-11.
  56. Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y. 2005. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model.

- Journal of Neuroscience Research* 82, 609–621.
57. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi JJ., 2001. Cilostazol (pletal) : a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. *Cardiovascular Drug Reviews* 19, 369–386.
  58. Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Otomo E, Shinohara Y, Itoh E, Matsuda T, Sawada T., 2000. Cilostazol stroke prevention study: a placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 9, 147–157.
  59. Choi JM, Shin HK, Kim KY, Lee JH, Hong KW., 2002. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300, 787–793.
  60. Shin HK, Lee HR, Lee DH, Hong KW, Lee JH, Park SY, Lee SJ, Lee JS, Lee WS, Rhim BY, Kim CD., 2010. Cilostazol enhances neovascularization in the mouse hippocampus after transient forebrain ischemia. *Journal of Neuroscience Research* 88, 2228–2238.
  61. Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, Hattori N, Urabe T., 2010. Cilostazol attenuates ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 171, 1367–1376.
  62. Yoneyama M, Tanaka M, Hasebe S, Yamaguchi T, Shiba T, Ogita K., 2015. *Journal of Neuroscience Research* 93, 56–66.
  63. Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS., 2002. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *Journal of Neuroscience* 22, 3673–3682.
  64. Giachino C, De Marchis S, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schutz G, Fasolo A, Peretto P., 2005. cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience* 25, 10105–10118.
  65. Ogita K, Nitta Y, Watanabe Y, Nakatani Y, Nishiyama N, Sugiyama C, Yoneda Y., 2004. In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacology* 47, 619–630.
  66. Kawada K, Yoneyama M, Nagashima R, Ogita K., 2008. In vivo acute treatment with trimethyltin chloride causes neuronal degeneration in the murine olfactory bulb and anterior olfactory nucleus by different cascades in

- each region. *Journal of Neuroscience Research* 86, 1635–1646.
67. Shuto M, Higuchi K, Sugiyama C, Yoneyama M, Kuramoto N, Nagashima R, Kawada K, Ogita K., 2009. Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain in vivo: involvement of oxidative stress pathways. *Journal of Pharmacological Sciences* 110, 424–436.
  68. Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T., 2004. Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Research* 1028, 238–242.
  69. Douen AG, Dong L, Vanance S, Munger R, Hogan MJ, Thompson CS, Hakim AM., 2004. Regulation of nestin expression after cortical ablation in adult rat brain. *Brain Research* 1008, 139–146.
  70. Chen S, Pickard JD, Harris NG., 2003. Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology* 182, 87–102.
  71. Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Umeda K, Yamaguchi T, Ogita K., 2014. Lithium promotes neuronal repair and ameliorates depression-like behavior following trimethyltin-induced neuronal loss in the dentate gyrus. *PLoS One* 9, e87953. doi: 10.1371/journal.pone.0087953.
  72. Yoneyama M, Hasebe S, Kawamoto N, Shiba T, Yamaguchi T, Kikuta M, Shuto M, Ogita K., 2013. Beneficial in vivo effect of aripiprazole on neuronal regeneration following neuronal loss in the dentate gyrus: evaluation using a mouse model of trimethyltin-induced neuronal loss/ self-repair in the dentate gyrus. *Journal of Pharmacological Sciences* 124, 99–111.
  73. Kikuta M, Shiba T, Yoneyama M, Kawada K, Yamaguchi T, Hinoi E, Yoneda Y, Ogita K., 2013. In vivo and in vitro treatment with edaravone promotes proliferation of neural progenitor cells generated following neuronal loss in the mouse dentate gyrus. *Journal of Pharmacological Sciences* 121, 74–83.
  74. Dworkin S, Malaterre J, Hollande F, Darcy PK, Ramsay RG, Mantamadiotis T., 2009. cAMP response element binding protein is required for mouse neural progenitor cell survival and expansion. *Stem Cells* 27, 1347–1357.
  75. Yoneyama M, Kawada K, Shiba T, Ogita K., 2011. Endogenous nitric oxide generation linked to ryanodine receptors activates cyclic GMP/protein kinase G pathway for cell proliferation of neural stem/progenitor cells derived from embryonic hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences* 115, 182–195.
  76. Sordella R, Classon M, Hu KQ, Matheson SF, Brouns MR, Fine B, Zhang L,

Takami H, Yamada Y, Settleman J., 2002. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Developmental Cell* 2, 553-65.