

---



---

原 著

---



---

## 保護的末梢血単核球移植による脳梗塞に対する機能回復促進療法

畠 山 公 大

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：小野寺理教授)

### Cell Transplantation Using Protective Peripheral Blood Mononuclear Cells Against Focal Cerebral Ischemia

Masahiro HATAKEYAMA

*Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science/ Course for Molecular and Cellular Medicine/*

*Molecular Neuroscience and Brain Disease/ Neurology*

*(Director: Prof. Osamu ONODERA)*

#### 要 旨

当研究室では、これまでミクログリアに軽度の脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖刺激 (OGD) を加えることにより、ミクログリアを保護的な極性に変える技術を開発した。また、OGD ミクログリアを、脳梗塞7日後に後遺症を有するラットに、動脈投与することで機能予後を著明に回復させることを示した。しかしながら、ミクログリアは成体から分離することが困難である。そこで、同技術のさらなる臨床応用を目指して、ミクログリアに類似した性質を持ち、簡便に取得できる末梢血単核球 (PBMC) に着目した。OGD 刺激を加えた PBMC が、ミクログリア同様、脳梗塞治療効果を有するかを検討した。

ラット末梢血からフィコールを用いて、PBMC を遠心分離し、18 時間 OGD 刺激 (OGD-PBMC)、あるいは18 時間通常培養 (Normoxic-PBMC) を行った。保護的極性の評価として、培養培地を用いて、強力に血管新生、軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 VEGF のウェスタンブロッティングを行った。次に一過性局所脳梗塞モデルラットを作成し、脳梗塞7日後に OGD-PBMC、あるいは Normoxic-PBMC を投与した。細胞投与21日後の標本で VEGF の免疫染色を行った。また、血管内皮のマーカーである CD31、神経軸索のマーカーである SMI31 についても同様に免疫染色を行い、血管新生、軸索伸展の定量的評価を行った。さらに、コーナートストを用いて、細胞投与後のラットの神経学的機能評価を行った。VEGF のウェスタンブロッティングでは、OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し、Normoxic-PBMC

Reprint requests to: Masahiro HATAKEYAMA  
Department of Neurology,  
Brain Research Institute, Niigata University,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学脳研究所神経内科学教室

畠 山 公 大

では認められなかった。また免疫染色では、Normoxic-PBMC投与群に比し、OGD-PBMC投与群では虚血中心部辺縁で、VEGFの発現が亢進していた ( $p < 0.001$ )。また、Normoxic-PBMC投与群に比し、OGD-PBMC投与群では虚血中心部辺縁・ペナンプラにおける血管新生、およびペナンプラにおける軸索進展が亢進していた (各  $p < 0.001$ )。コーナートテストでは、細胞投与21日後に、OGD-PBMC投与群は対照群に比し、機能回復が認められた ( $p = 0.020$ )。

以上から、18時間のOGD刺激は、PBMCを保護的な極性に変え、OGD-PBMC投与は、血管新生、神経軸索進展を介して、脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が示唆された。

**キーワード：**脳梗塞、細胞移植療法、末梢血単核球、低酸素低糖刺激、血管新生、軸索進展

## 緒 言

脳血管障害は国内の死亡原因の第3位であり、8.2%を占める(厚生労働省 平成29年人口動態統計(確定数)の概況より)。65歳以上の要介護の原因疾患の17.2%と最多であり(内閣府 平成29年版高齢社会白書(全体版)より)、救命できたとしても重度の後遺症が生じる。現在、脳梗塞後遺症の機能回復療法として確立されたものは、リハビリテーションのみであり、さらなる機能回復療法の開発が望まれている。

骨髄由来の細胞を用いた細胞移植療法が、脳梗塞後遺症の回復に有効であることが報告されている<sup>1)</sup>。しかし、脳梗塞の再発予防治療として、抗血小板療法や抗凝固療法が実施される患者に対し、骨髄穿刺を実施して細胞を回収することは、安全面での懸念が生じる。また、ES細胞を用いた幹細胞療法は、倫理面での問題、iPS細胞を用いた細胞療法は癌化の懸念もあり、細胞療法が一般に普及するためには、安全かつ簡便で、自己由来の細胞療法が望ましい。

当研究室ではこれまで、軽度の脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖(oxygen-glucose deprivation, OGD)刺激を加えることにより、ミクログリアを保護的な極性に変える技術を開発した<sup>2)</sup>。ミクログリアには、大別して炎症誘発性のミクログリアと、組織保護的に働く抗炎症性ミクログリアの2つの極性が存在する<sup>3)</sup>。このうち抗炎症性保護的ミクログリアは血管内皮増殖因子(VEGF)、プログラニュリンなどの組織修復因子を分泌し、血管新生や神経軸索進展を促すなど組

織保護的に作用することが知られている<sup>4)</sup>。当研究室では、ミクログリアに18時間OGD刺激を加えることにより、ミクログリアからのVEGF分泌が亢進することを示した。また、OGD刺激を加えたミクログリアを、脳梗塞後遺症を有するラットに、脳梗塞7日後に動脈投与することで機能予後を著明に回復させることを示した<sup>2)</sup>。

しかしながら、ミクログリアはヒトの成体から分離することが困難である。同技術のさらなる臨床応用を目指して、より簡便かつ安全に取得できる細胞として末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)に着目した。単球・マクロファージを含むPBMCは、ミクログリア類似の性質を持ち、脳梗塞後の病態に関与することが知られている<sup>5)</sup>。そこで、本研究ではOGD刺激を加えたPBMCが、ミクログリア同様、脳梗塞治療効果を有するかを検討した。

## 材料と方法

本研究は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け(#SD00931)、新潟大学動物実験指針およびARRIVE(Animal Research: Reporting *In vivo* Experiments)ガイドラインに従って実施した<sup>6)</sup>。

### 1. 初代細胞培養

体重290~320gの雄性Sprague-Dawley(SD)ラットを使用した。イソフルラン吸入で麻酔を維持し、開胸下に心腔穿刺を行い、末梢血を採取した。Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare, 17-5446-02)を用いて、PBMCを遠心分離した。

通常培養条件では、分離したPBMCをグルコース濃度 4500 mg/L の培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich) を用いて 37°C で 19 時間培養した。

OGD 条件では、PBMC とグルコース濃度 1000 mg/L の培地を低酸素チャンパー (Billups-Rothenburg, Del Mar, CA, USA) 内に静置した。95% 窒素、5% 二酸化炭素の混合ガスを 1 時間充填した後、密封し 37°C で 18 時間培養した。この刺激で、4 時間後にはチャンパー内は O<sub>2</sub> 濃度 0.1-0.4% に低下することが示されている<sup>7)</sup>。

## 2 ウェスタンブロッティング

OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) および、通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC) の培地を採取し、2-メルカプトエタノールを加えて煮沸した。Tris-glycine SDS-PAGE で電気泳動し、その後 PVDF 膜に転写し、5% スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした。一次抗体はウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体 (Abcam, ab46154, 1000 倍希釈) を用いて、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ抗体を室温で 1 時間反応させ、Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare) を用いて、VEGF の蛋白バンドを ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Life Science) で撮影した。内部コントロールとして、トランスフェリンを使用し、ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて、トランスフェリンに対する VEGF の発現強度を半定量した。

## 3. 一過性局所脳梗塞モデル

体重 290 ~ 320g の雄性 SD ラットを、イソフルラン吸入で麻酔を維持し、手術を実施した。手術中、深部体温を経直腸的に測定し、37.0 ± 0.5°C に維持した。手術用顕微鏡の直視下に前頸部を正中切開後、左総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を露出した。外頸動脈を結紮し、切断した。その後、外頸動脈断端にナイロン糸 (径 0.148mm) を挿入し、中大脳動脈を閉塞した。90 分後にナ

イロン糸を引き抜き、血流の再開通を行った<sup>8)</sup>。

## 4. 細胞移植

5 × 10<sup>5</sup> 個の OGD-PBMC および、Normoxic-PBMC をそれぞれ PBS 200 μl で懸濁した。脳梗塞を作成したラットを無作為に 3 群 (OGD-PBMC 投与群、Normoxic-PBMC 投与群、PBS 投与群) に割りつけた。脳梗塞 7 日後に左外頸動脈断端から、細胞懸濁液、あるいは PBS を緩徐に注入した。全ての群で同量の PBS を用いた。

## 5. GFP マウス

大阪大学遺伝情報実験センターで作成され、新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野にて飼育された green fluorescent protein (GFP) マウスを用いて、ラット同様に PBMC を遠心分離した。GFP マウス由来の PBMC を 18 時間 OGD 刺激、あるいは通常培養した。脳梗塞 7 日後に、ラットの左外頸動脈断端から GFP マウス由来の OGD-PBMC、Normoxic-PBMC を緩徐に注入した。脳梗塞 10 日後 (細胞移植 3 日後) のラットをイソフルラン過剰投与で安楽死させた後、4°C 生理食塩水、および 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて灌流後、脳を摘出した。摘出した脳を free-float 法で 50 μm 厚に薄切し<sup>7)</sup>、二光子顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察を行った。

## 6. 免疫染色

脳梗塞 28 日後 (ラット由来 PBMC 移植 21 日後) のラットをイソフルラン過剰投与で安楽死させた後、4°C 生理食塩水、および 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて灌流後、脳を摘出した。摘出した脳をパラフィンで包埋し、4 μm 厚に薄切した。パラフィン標本を、メタノールで処理後、オートクレーブ (121°C, 10 分間) による抗原賦活を行った。1% ウシ血清アルブミン-PBS で 30 分ブロッキングした後、一次抗体はウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体 (Santa Cruz, sc-152, 200 倍希釈)、マウスモノクローナル抗 MAP-2 抗体 (Sigma Aldrich, M9942, 250

倍希釈)を用いて4℃で一晩反応させた。蛍光標識された二次抗体 (Alexa Fluor) を100倍希釈し、室温で1時間反応させ、Vectashield 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で封入した。

同様に、血管内皮のマーカーであるCD31、神経軸索のマーカーであるSMI31についても、一次抗体としてマウスモノクローナル抗CD31抗体 (Dianova, DIA-310, 20倍希釈)、マウスモノクローナル抗SMI31抗体 (BioLegend, 801601, 500倍希釈)を用いて、MAP2との免疫二重染色を行った。

MAP2陰性の領域を虚血中心、その辺縁のMAP2陽性の領域をペナンプラと定義し、二光子顕微鏡 (LSM710; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察を行った。

630倍の強拡大にて、虚血中心、ペナンプラの各領域につき、1サンプルあたり重複のない7視野を観察した。データは0.03-mm<sup>3</sup>の関心領域 (ROI) から定量的に取得した。Z軸方向に0.15 μm 間隔でデータを取得し、3次元画像を再構成した。IMARIS imaging software (BitplaneAG, Zurich, Switzerland)を用いて、盲検的にデータの定量的評価を行った<sup>9)</sup>。

## 7. 神経学的機能評価

脳梗塞前及び、脳梗塞後0日、1日、4日、7日、10日 (細胞移植3日後)、14日 (細胞移植7日後)、21日 (細胞移植14日後)、28日 (細胞移植21日後)の段階で、コーナーテストを用いた運動・感覚機能の評価を行った<sup>10)</sup>。治療効果の評価は盲検的に実施した。

## 8. 統計学的評価

全てのデータは平均±標準偏差で表記した。2群間の比較には、対応のないt検定を用い、3群間以上の比較には1元あるいは2元配置分散分析を用いた。その後、ダネットあるいはボンフェローニのポストホック解析を行った。統計学的処理にはSPSS (ver. 25.0. Armonk, NY, USA)を用いた。P値が0.05未満のものを統計学的有意とした。

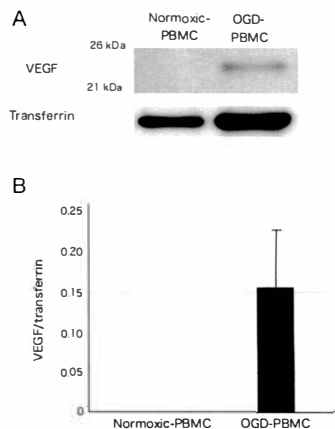


図1 OGD-PBMCとNormoxic-PBMCのVEGF分泌  
A) 通常培養を行ったPBMC (Normoxic-PBMC) と18時間OGD刺激を加えたPBMC (OGD-PBMC)のVEGFに対するウェスタンブロッティング。PBMC: peripheral blood mononuclear cells, OGD: oxygen-glucose deprivation, VEGF: vascular endothelial growth factor.  
B) トランスフェリンに対するVEGFのデンストメトリ。OGD-PBMCではVEGFの分泌が認められたのに対し、Normoxic-PBMCでは認められなかった (N=4)。

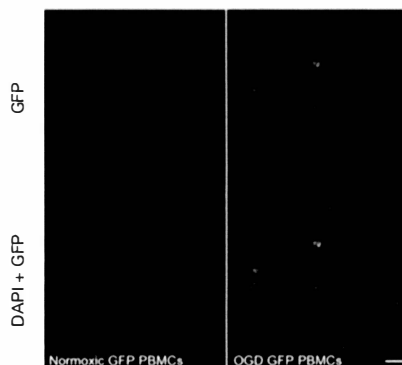


図2 OGD-PBMCの脳内への移行

脳梗塞7日後のラットに、GFPマウス由来のNormoxic-PBMCあるいはOGD-PBMCを移植し、脳梗塞10日後 (細胞移植3日後)にVEGFに対する免疫染色を行った。OGD-PBMC投与群ではGFP陽性細胞が認められたのに対し、Normoxic-PBMC投与群ではみとめられなかった。GFP: green fluorescent protein, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, OGD: oxygen-glucose deprivation (N=3)。

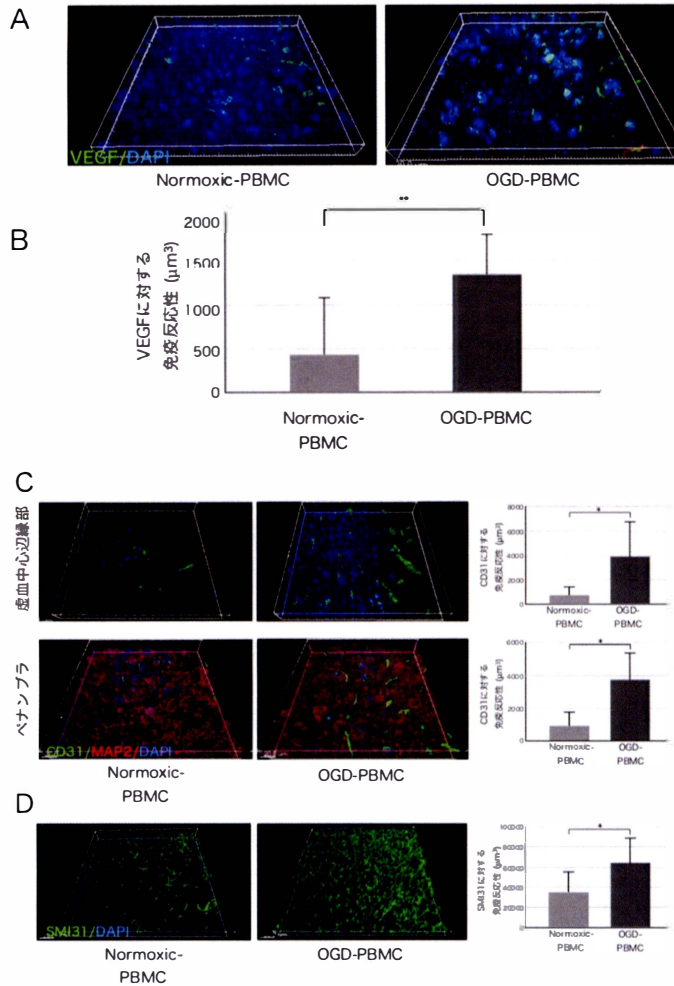


図3 PBMCを移植したラットの脳のVEGFの発現、血管新生・軸索伸展

- A) 脳梗塞7日後のラットにNormoxic PBMCあるいはOGD-PBMCを移植し、脳梗塞28日後（細胞移植21日後）にVEGFに対する免疫染色を行った。PBMC: peripheral blood mononuclear cells, OGD: oxygen-glucose deprivation, VEGF: vascular endothelial growth factor.
- B) 脳梗塞28日後、OGD-PBMC投与群では、Normoxic-PBMC投与群に比し、有意に虚血中心辺縁部でのVEGFの発現が亢進していた (\*\* $p < 0.001$ ).  $N = 28$ .
- C) 脳梗塞7日後のラットにNormoxic-PBMCあるいはOGD-PBMCを移植し、脳梗塞28日後（細胞移植21日後）にCD31に対する免疫染色を行った。虚血中心辺縁部、ペナンプラにおけるCD31の免疫反応性は、Normoxic-PBMC投与群に比し、OGD-PBMC投与群で有意に大きかった (各 $*p < 0.01$ ).  $N = 28$ . CD31: cluster of differentiation 31.
- D) 同様に、脳梗塞28日後（細胞移植21日後）にSMI31に対する免疫染色を行った。ペナンプラにおけるSMI31の免疫反応性は、Normoxic-PBMC投与群に比し、OGD-PBMC投与群で有意に大きかった ( $*p < 0.01$ ).  $N = 28$ .

## 結 果

### 1. OGD-PBMC では VEGF が分泌される

ラット由来の PBMC の保護的極性への変化を定量的に評価するために、VEGF のウェスタンブロットティングを行った。OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し、Normoxic-PBMC では認められなかった ( $P = 0.029$ ) (図 1 A, B)。

### 2. OGD-PBMC は細胞移植後、脳梗塞後のラットの脳内に移行する

脳梗塞モデルラットに投与した PBMC が、ラットの脳内に移行するかについて、GFP マウス由来の PBMC を用いて検討した。脳梗塞 10 日後 (細胞移植 3 日後) に、OGD-PBMC 投与群では、虚血中心とペナンプラの境界に GFP 陽性細胞が認められたのに対し、Normoxic-PBMC 投与群では認められなかった (図 2)。

### 3. OGD-PBMC を移植したラットでは、脳内の VEGF 発現を認める

次に、脳梗塞モデルラットにラット由来の OGD-PBMC を移植した後、脳内で VEGF の発現を認めるかもしくは増加するかを免疫蛍光染色で検証した。偽手術を行ったラットの脳内では、VEGF が認められなかったのに対し、脳梗塞 28 日後 (細胞移植 21 日後) のラットでは、虚血中心辺縁部で VEGF を認めた。さらに、OGD-PBMC 投与群では、Normoxic-PBMC 投与群に比し、VEGF の発現が増加していた ( $p < 0.001$ , 図 3 A, B)。

### 4. OGD-PBMC を移植したラットでは血管新生が亢進する

当研究室ではこれまで、18 時間 OGD 刺激を加えたミクログリアを、脳梗塞モデルラットに移植することで、ラットの虚血中心辺縁部で血管新生が亢進することを報告した<sup>2)</sup>。そこでミクログリア同様に、ラット由来の OGD-PBMC を移植した脳梗塞モデルラットで脳内の血管新生が亢進するかについて、免疫蛍光染色で検証した。血管内

皮のマーカーである CD31 に対する抗体を用いた免疫蛍光染色で血管新生を定量的に評価した<sup>2)</sup>。脳梗塞 28 日後 (細胞移植 21 日後)、虚血中心辺縁部における CD31 の免疫反応性は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で大きかった ( $p < 0.01$ , 図 3C 上段)。また、ペナンプラにおける CD31 の免疫反応性も、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で大きかった ( $p < 0.01$ , 図 3C 下段)。

### 5. OGD-PBMC を移植したラットでは軸索伸張も生じる

次にラット由来の OGD-PBMC を移植したラットの脳内で軸索伸張が生じるか免疫蛍光染色で検証した。軸索のマーカーである SMI31 に対する抗体を用いた免疫蛍光染色で、軸索伸張を定量的に評価した<sup>2)</sup>。脳梗塞 28 日後 (細胞移植 21 日後)、ペナンプラにおける SMI31 の免疫反応性は、Normoxic-PBMC 投与群に比し、OGD-PBMC 投与群で増加していた ( $p < 0.01$ , 図 3D)。

### 6. OGD-PBMC を移植したラットでは、脳梗塞後の機能が著明に改善する

最後に、OGD-PBMC 細胞移植療法が脳梗塞後の運動・感覚機能障害を改善させるかコーナートテストを用いて検証した。脳梗塞 28 日後 (細胞移植 21 日後) に、OGD-PBMC 投与群では、PBS 投与群に比し、有意に運動・感覚機能障害が改善した ( $p = 0.020$ )。一方、Normoxic-PBMC 群と PBS 投与群の間に運動・感覚機能障害に有意差はなかった ( $p = 0.77$ ) (図 4)。

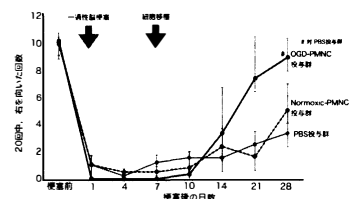


図 4 コーナートテストを用いた運動・感覚機能評価  
脳梗塞 28 日後 (細胞移植 21 日後) に、OGD-PBMC 投与群では、PBS 投与群に比し、有意に運動・感覚機能障害が改善した ( $p = 0.020$ )。

## 考 察

今回、OGD 刺激を PBMC に加えることにより、PBMC からの VEGF 分泌が生じ、PBMC が組織保護的な極性に変わることを示した (図 1)。当研究室ではこれまで、18 時間の OGD 刺激を脳内炎症性細胞ミクログリアに加えることにより、ミクログリアが保護的な極性に変わることを報告した<sup>2)</sup>。本研究においても、ミクログリア同様、OGD 刺激により PBMC から VEGF 分泌が亢進し、組織保護的な極性に变化した可能性が考えられた。PBMC 中にはマクロファージが存在し、マクロファージは低酸素刺激により VEGF を分泌することが報告されており<sup>11)</sup>。OGD-PBMC から VEGF が分泌される機序の一つと考える。今後、OGD 刺激による PBMC の保護的極性への変化の機序に関して検討する必要がある。

さらに OGD-PBMC を投与することにより、脳梗塞後のラットの脳内に PBMC が移行し (図 2)、脳内の VEGF の発現が亢進し (図 3A, B)、血管新生・軸索伸展が亢進することを示した (図 3C, D)。これは、投与した OGD-PBMC が、脳内で組織修復因子である VEGF を分泌し、血管新生や軸索伸展を亢進させたためと考える。VEGF は血管新生のみならず、軸索伸展にも寄与することが報告されており<sup>12)</sup>、軸索伸展の一部は VEGF の作用によるものと考えられる。VEGF の他に、プロングラニューリンなども脳梗塞後に組織保護的な作用を持つことが報告されており<sup>11)</sup>、今後 OGD-PBMC におけるこれらの因子の関与についても、検討する必要がある。

最後に、OGD-PBMC の投与により、ラットの脳梗塞後の機能が著明に改善することを示した (図 4)。PBMC は比較的簡便に採取できる細胞であることから、今後は臨床応用を目指して行くとともに、さらなる機序の解明を進める方針である。

## 結 論

18 時間の OGD 刺激により、PBMC が保護的な極性に变化し、血管新生・軸索伸展を介して、

脳梗塞後の機能回復を促進する可能性が考えられた。

## 謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただきました、新潟大学脳研究所神経内科小野寺理教授、金澤雅人講師、現・岐阜大学神経内科・老年内科下畑享良教授に深謝申し上げます。

GFP マウスは、大阪大学遺伝情報実験センター岡部勝先生が樹立され、当施設に提供されたものを使用した。マウス提供にもお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, Fan X, Jiang Y, Stetler RA, Liu G and Chen J: Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. *Prog Neurobiol* 115: 92-115, 2014.
- 2) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M and Shimohata T: Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 7: 42582, 2017.
- 3) Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T and Shimohata T: Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *Int J Mol Sci* 18: e2135, 2017.
- 4) Dudvarski Stankovic N, Teodorczyk M, Ploen R, Zipp F and Schmidt MHH: Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta Neuropathol* 131: 347-363, 2016.
- 5) Kim E and Cho S: Microglia and monocyte-derived macrophage in stroke. *Neurotherapeutics* 13: 702-718, 2016.
- 6) Kilkeny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. *Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE*

- guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 991-993, 2011.
- 7) Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Yoshinori T, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M and Shimohata T: Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain* 138: 1932-1948, 2015.
- 8) Memezawa H, Smith ML and Siesjö BK: Penumbra tissue salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23: 553-559, 1992.
- 9) Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M and Shimohata T: Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. *PLoS One* 9: e98639, 2014.
- 10) Balkaya M, Kröber J, Gertz K, Peruzzaro S and Endres M: Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 15: 179-187, 2013.
- 11) Fang HY, Hughes R, Murdoch C, Coffelt SB, Biswas SK, Harris AL, Johnson RS, Imityaz HZ, Simon MC, Fredlund E, Greten FR, Rius J and Lewis CE: Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* 114: 844-859, 2009.
- 12) Sondell M, Lundborg G and Kanje M: Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulate axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19: 5731-5740, 1999.

(平成31年1月16日受付)

---