

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659692

研究課題名（和文） 脳虚血時の血管周皮細胞におけるシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of signal transduction pathways in brain pericytes in ischemic stroke

研究代表者

佐々木 富男（SASAKI TOMIO）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10134561

研究成果の概要（和文）：

血管周皮細胞（ペリサイト）は脳虚血において様々な機能を発揮している可能性が指摘されてきているが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。本研究では塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が虚血巣周囲のペリサイトにおける血小板由来成長因子β受容体(PDGFRβ)シグナルを増強させること、またペリサイトにおける PDGFRβシグナルがペリサイトの増殖・生存・神経栄養因子の発現増加など様々な機能に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

It has been suggested recently that brain pericytes play various important roles in ischemic stroke, but its detail mechanism remains elusive. In our project, we demonstrated that PDGFRβ signaling in brain pericytes in peri-infarct area was enhanced by basic fibroblast growth factor (bFGF) and mediated cell growth, survival and production of neurotrophic factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳血管障害、周皮細胞、細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

血管周皮細胞（ペリサイト）は脳血管に多く存在する細胞で、血液脳関門の制御や血管新生において中心的な役割を果たしていることが解明されてきているが、脳虚血時におけるペリサイトの機能については未知の点が多い。このペリサイトの機能発現においては血小板由来成長因子β受容体(PDGFRβ)やプロスタグランジン(PGs)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などのシグナル伝達機構が関与している可能性が示唆されているが、その詳細な分子メカニズムについては解明されていない。こ

れまでに我々は脳虚血時のプロスタグランジンなどの細胞内シグナルについての知見を蓄積してきており、またラット脳虚血巣周囲で PDGFRβ の発現が著明に上昇することを予備実験で明らかにしていた。そこで我々は脳虚血時のペリサイトにおける細胞内シグナル伝達機構に着目し、そのメカニズムを解明することが脳虚血疾患の新しい治療の開発に繋がる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

脳虚血時のペリサイトにおけるシグナル伝達機構について詳細に検討する。

3. 研究の方法

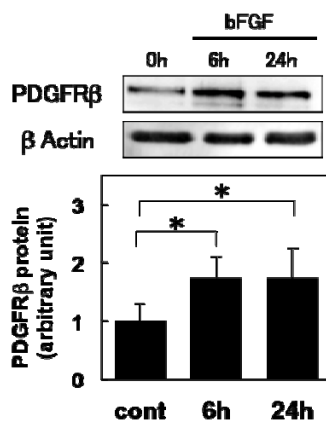
初年度は培養ヒト脳微小血管ペリサイトに低酸素刺激を与えたり PDGF・VEGF・bFGF・NO ドナーなどを投与し、PDGFR β 発現を制御するメカニズムについて詳細に検討を行った。次年度はさらにこの PDGFR β についての検討を進めたため、PGs や VEGF などのシグナル伝達機構については検討できなかった。具体的にはクリプトンレーザーとローズベンガル溶液による光化学反応を利用したラット中大脳動脈閉塞モデルを用いて、*in vivo* での PDGFR β 発現制御機構について検討した。また培養ペリサイトを用いて、ペリサイトにおける PDGFR β シグナルの役割について分子生物学的に詳細に検討した。

4. 研究成果

ペリサイトにおける PDGFR β 発現調整機構の解明

培養ペリサイトにおける PDGFR β 発現調整機構を解明するため低酸素や血管新生因子などの様々な刺激を用いて検討した。その結果、1%低酸素刺激や PDGF、VEGF、NO ドナー投与では PDGFR β 発現量は増加せず、bFGF 投与で PDGFR β の発現が有意に増加した。この結果より PDGFR β の発現調節には bFGF が主な役割を担っていることが示唆された (図 1)。

(図 1) 培養ペリサイトに bFGF を投与した時の PDGFR β 蛋白の発現変化 (*: p<0.05)

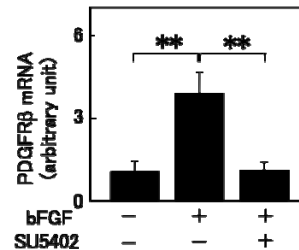


ペリサイトにおける PDGFR β 発現調整機構の解明(細胞実験)

FGF 受容体は FGFR1-4 の 4 つのアイソフォームがあるが、RT-PCR の結果よりペリサイトは FGFR1 のみを発現していた。ペリサイトにおける bFGF を介した PDGFR β の発現上昇は

FGFR1 阻害剤である SU5402 で阻害され、この反応がペリサイトに発現する FGFR1 を介していることを明らかにした (図 2)。

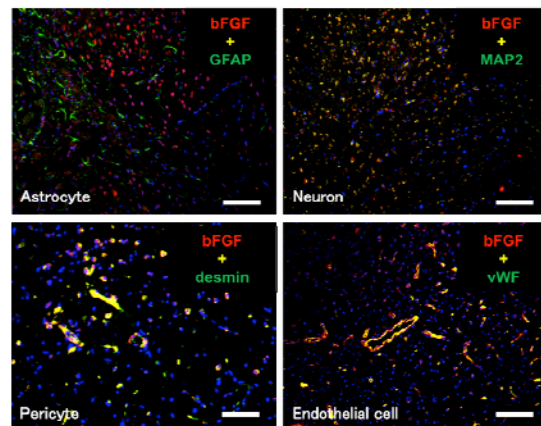
(図 2) 培養ペリサイトに bFGF および SU5402 を投与した時の PDGFR β 蛋白の発現変化 (*: p<0.01)



ペリサイトにおける PDGFR β 発現調整機構の解明(動物実験)

さらに動物モデルにおいて bFGF の発現を検討した。局所脳虚血モデルの虚血半球では対側半球・シャム手術群に比較して bFGF 発現量が 5 倍に増加していた。また免疫染色では特に虚血巣周囲で bFGF の発現が著明に増加していた。そこで蛍光二重染色法により bFGF を発現する細胞を詳細に検討すると、神経細胞・ペリサイト・血管内皮細胞が bFGF を多く発現していた (図 3)。

(図 3) bFGF と種々の細胞マーカー蛋白との二重染色 (scale bar : 100 μ m)

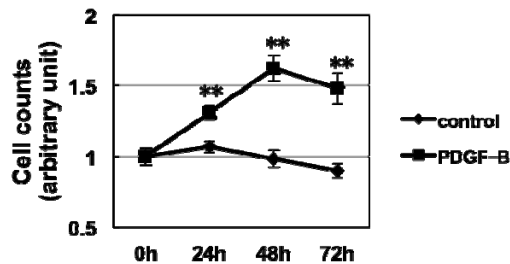


PDGFR β シグナルのペリサイトに与える影響の検討

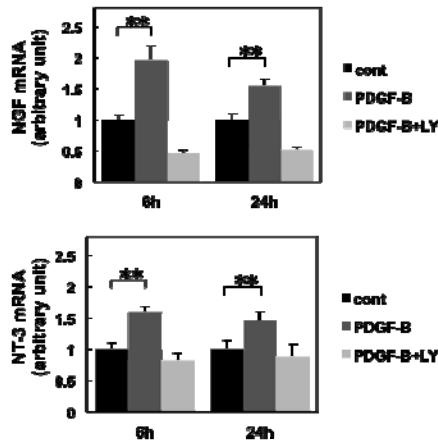
PDGF-PDGFR β シグナルの活性化により培養ペリサイトにおいて Akt、Erk、PLC γ などの様々なシグナル蛋白が活性化されたが、その中でも特に Akt の強いリン酸化がみられた。ペリサイトに PDGF-B を投与するとコントロール群と比較して細胞数が著明に増加し (図 4)、その反応は PI3K 阻害剤である LY294002 で抑制された。さらに PDGF-B

投与でアポトーシス関連タンパクの一つである Bad のリン酸化や Caspase-3 の cleavage 阻害も認められ、PDGFR β -Akt シグナルによる抗アポトーシス効果が示唆された。また、PDGF-B 投与によりペリサイトにおける NGF や NT-3 などの神経栄養因子の発現も増加し、この反応も LY294002 によって抑制された(図 5)。これらの結果から PDGFR β シグナルは Akt の活性化を介してペリサイト自身の細胞増殖・アポトーシスを制御し、さらに神経栄養因子の発現を促していることが明らかになった。

(図 4)PDGF-B 投与時のペリサイトの増殖反応 (* *: p<0.01)



(図 5)PDGF-B 投与時のペリサイトにおける神経栄養因子の発現増加(* *: p<0.01、LY: LY294002, PI3K inhibitor)



本研究の成果として、脳虚血巣周囲の様々な細胞が bFGF を分泌することによりペリサイトにおける PDGFR β シグナルが活性化され、ペリサイトの増殖・生存および神経栄養因子発現増加などの多様な機能が発揮されている可能性が示唆された。本研究の成果は脳虚血疾患の新しい治療の開発に繋がる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T. "PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury." *Curr Neurovasc Res*. 査読有 2012 Feb;9(1):1-9.

[学会発表] (計 3 件)

国際学会

- (1) Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Sugimori H, Kuroda J, Ishitsuka K, Sasaki T, Kitazono T. "Neuroprotective Role of Brain Pericytes through PDGFR β -Akt Signaling in Ischemic Stroke." *International Stroke Conference 2012*, New Orleans, LA, USA, 1-3 Feb 2012.
- (2) Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Sugimori H, Kuroda J, Ishitsuka K, Sasaki T, Kitazono T. "Neuroprotective Roles of Brain Pericytes through PDGFR β -Akt Signaling in Ischemic Stroke." *American Heart Association Scientific Sessions 2012 (Best of AHA specialty conference)*, Los Angeles, CA, USA, 3-7 Nov 2012.

国内学会

- (3) 有村公一, 吾郷哲朗, 杉森宏, 黒田淳哉, 鴨打正浩, 佐々木富男, 北園孝成 "脳虚血における PDGF-B シグナルを介したペリサイトの神経保護作用" 第 37 回日本脳卒中学会総会, 福岡国際会議場, 福岡, 26-28 Apr 2012.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 富男 (SASAKI TOMIO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：10134561

(2) 研究分担者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50380621

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：80529800

吉川 雄一郎 (KIKKAWA YUICHIRO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80423515

(3) 連携研究者

なし