

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10291

研究課題名(和文) 血管内皮細胞由来因子を用いた認知症前駆期における大脳白質高信号の治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of extracellular vesicles derived from microvascular endothelial cells: towards the development of treatment for cerebral white matter infarction

研究代表者

倉知 正 (Kurachi, Masashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20271546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小血管内皮細胞由来細胞外小胞(MVEC-EV)表面にフィブロネクチン(FN)が存在すること、EV表面のFNとオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の結合を阻害することによりOPCでEVの取込が減少してOPCの生存・増殖が低下することを明らかにした。また、MVEC-EV表面に血小板由来成長因子B(PDGF-B)が存在すること、PDGF-BはHSPGを介してEV表面に繋がれていることを明らかにした。PDGF-Bに対する中和抗体がOPC増殖におけるEVの活性を低下させたことから、MVEC-EV表面のPDGF-BがOPCの増殖を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小血管内皮細胞由来細胞外小胞の表面にフィブロネクチン、血小板由来成長因子PDGF-Bが存在すること、小胞内にrno-miR-21-5pなどのマイクロRNAが含まれることを明らかにした。また、細胞外小胞表面のPDGF-Bがオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進することを明らかにした。これらの知見は、運動機能や認知機能の障害に関わる白質病変の改善に向けた治療戦略の構築に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I found that fibronectin (FN) was abundant on the surface of extracellular vesicles derived from brain microvascular endothelial cells (MVEC-EVs) and that FN on EVs mediated their internalization into oligodendrocyte precursor cells (OPCs) by its binding to heparan sulfate proteoglycan (HSPG) on OPCs. OPC survival and proliferation promoted by EVs were attenuated by blocking the internalization of EVs into OPCs. Moreover, I also found that platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) was on the surface of MVEC-EVs and that PDGF-B was tethered to the EV by HSPG. The neutralizing antibody against PDGF-B significantly reduced the promoting activity of MVEC-EVs on OPC proliferation, suggesting that PDGF-B on the surface of MVEC-EV promotes OPC proliferation.

研究分野：神経科学

キーワード：血管内皮細胞 細胞外小胞 エクソソーム オリゴデンドロサイト前駆細胞 神経科学 再生医学 認知症 脳白質障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病などの認知症を、まだ認知機能低下の顕在化していない前駆期に早期診断、早期先制治療を実施し、認知症発症を防止することが国家的な課題となっている。これまでのアルツハイマー型認知症の治療法に関する研究は、主としてアミロイド 蛋白質の蓄積や神経原線維変化に注目してなされてきた。MRI 解析による大脳白質高信号はアルツハイマー型認知症の発症前駆期からの急激な認知機能低下に関連する危険因子であるが、白質病変の改善に向けた有効な治療法はない。

(2) 研究代表者はこれまでに、白質虚血ラットモデルの梗塞域に脳微小血管内皮細胞を移植することにより脱髄巣周辺のオリゴデンドロサイト前駆細胞のアポトーシスが抑制されて脱髄病巣の縮小と再髄鞘化が促進されること (Puentes *et al.*, 2012; Iijima *et al.*, 2015) 脳微小血管内皮細胞由来細胞外小胞が *in vitro* でオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖を促進すること (Kurachi *et al.*, 2016) を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

上記のように脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖を促進する活性をもつことから、この細胞外小胞に含まれる分子 (タンパク質やマイクロ RNA) を明らかにすることができれば、これらの分子を認知症前駆期における白質高信号の治療に応用することができると考えられる。本研究では血管内皮細胞が分泌する細胞外小胞に含まれるオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖を促進する分子を同定し、この分子を利用した白質病巣の修復法を開発することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

オリゴデンドロサイト前駆細胞は生後 2 日齢 SD ラットの脳皮質から immunopanning 法により調製し、PDGF-AA を含む無血清培地により培養した。脳微小血管内皮細胞は成体 SD ラットの脳皮質から酵素処理および Percoll 密度勾配遠心法により調製し、2%FBS を含む内皮細胞増殖培地により培養した。ラット線維芽細胞株 Rat-1 は 10%FBS を含む培地により培養した。

#### (2) 細胞外小胞の回収

脳微小血管内皮細胞および Rat-1 細胞をエクソソーム除去済みの FBS を含む培地で培養した後、培養上清を回収し、エクソソーム回収試薬を用いてそれぞれの細胞由来細胞外小胞を得た。

#### (3) 質量分析

脳微小血管内皮細胞由来細胞外小胞 (MVEC-EV)、Rat-1 由来細胞外小胞 (Rat-1-EV) を SDS-PAGE により分画、トリプシンでゲル内消化した。得られたペプチドを nanoLC MS/MS 解析した。

#### (4) ELISA

一定量の EV タンパク質を含むサンプルを調製し、市販の Rat Fibronectin ELISA Kit (Abcam) および Mouse & Rat PDGF-BB ELISA Kit (R&D systems) を推奨プロトコルに従って使用してサンプル中のフィブロネクチン量および PDGF-BB 量を定量した。

#### (5) 細胞死および BrdU アッセイ

OPC の細胞死は Hoechst33342 を用いた核染色により核凝縮 (Pyknosis) した OPC の割合により評価した。OPC の増殖は BrdU 取り込みにより評価した。OPC を BrdU で 4 時間ラベルした後、固定し、抗 BrdU 抗体を用いて染色して BrdU 陽性 OPC の割合を算出した。

#### (6) ウェスタンブロット

各条件で処理した OPC に含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 PDGFR 抗体、抗リン酸化 PDGFR 抗体、抗  $\alpha$ -アクトニン抗体を用いて各タンパク質を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳微小血管内皮細胞由来細胞外小胞の表面に存在するフィブロネクチンはオリゴデンドロサイト前駆細胞における細胞外小胞の取り込みに関与する

脳微小血管内皮細胞由来細胞外小胞 (MVEC-EV) およびラット線維芽細胞株 Rat-1 由来細胞外小胞 (Rat-1-EV) の表面に存在するタンパク質を質量分析により解析し、フィブロネクチン (FN) が存在することを見出した。ELISA 法により EV 表面の FN を定量したところ、MVEC-EV 表面の FN は Rat-1-EV 表面の FN よりも多かった (図 1)。MVEC-EV に比べて Rat-1-EV はオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の生存・増殖を促進する活性が低い。この活性の差は MVEC-EV と Rat-1-EV における FN 量の違いより生じている可能性が示唆された。

MVEC-EV 表面の FN と OPC 表面のインテグリン

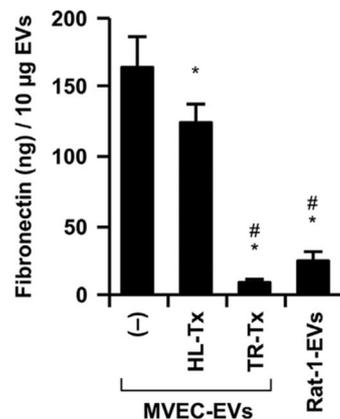


図1. MVEC-EV, Rat-1-EVにおけるフィブロネクチンの量 (-); 処理なし、HL-Tx; ヘパリンナーゼ処理、TR-Tx; トリプシン処理)。

の相互作用がEVによるOPC生存・増殖の促進に関与しているかを確認するため、FNのインテグリン結合ドメインであるRGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列を模したペプチドを用いてFN-インテグリン相互作用を阻害した。OPCをRGDペプチドで前処理することでOPC上のインテグリンへのFNの結合がブロックされたが、OPCに対するEVの効果は変化しなかった。この結果は、EVによるOPC生存・増殖の促進にはインテグリンを介したシグナル経路が関与していないことを示唆する。

OPCでのEV取り込みにおけるFNの関与を検討するため、OPCあるいはEVを様々な条件で処理し、フローサイトメータを用いてOPCへのEVの取り込みを測定した。OPCのヘパリチナーゼ処理によりEVの取り込みは減少した(図2A)。EVの取り込みは、EVをヘパリチナーゼで処理することによっても減少した(図2B)。また、EVをヘパリチナーゼ処理することによりEVにおけるFN量の減少が認められたことから(図1B)、FNの一部がEVのHSPGに結合していることが示

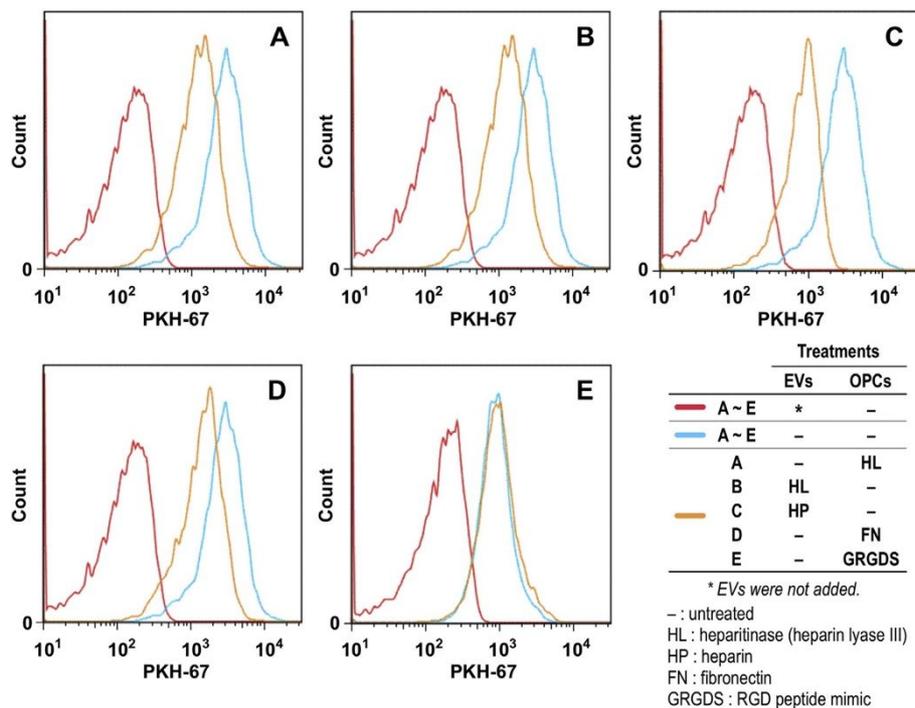


図2. フィブロネクチン(FN)とヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の相互作用を阻害することによりOPCにおけるMVEC-EVの取り込みが減少する。(A):OPCをヘパリチナーゼ処理、(B):MVEC-EVをヘパリチナーゼ処理、(C):MVEC-EVをヘパリン処理、(D):OPCをフィブロネクチン処理、(E):OPCをGRGDSペプチドで処理。

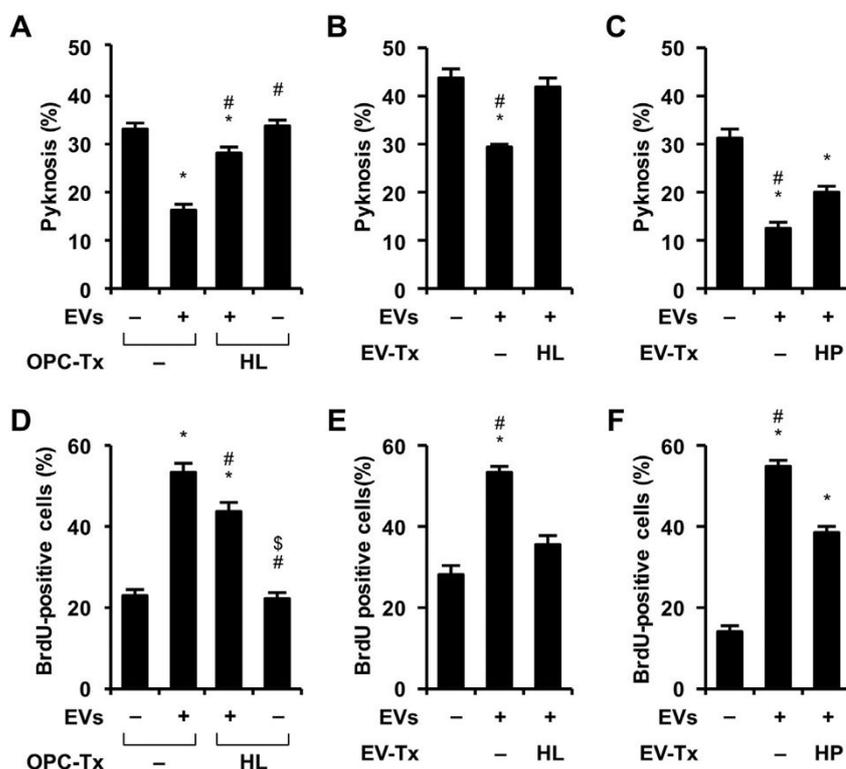


図3. フィブロネクチン(FN)とヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の相互作用を阻害することにより、MVEC-EVがOPCの生存・増殖を促進する活性は低下する。(A-C):OPCの細胞死の割合、(D-F):BrdU陽性OPCの割合。(A,D):OPCをヘパリチナーゼ処理、(B,E):MVEC-EVをヘパリチナーゼ処理、(C,F):MVEC-EVをヘパリン処理。

唆された。FN で前処理した OPC が EV の取り込みを減少させたことから (図 2D) EV 上の FN が取り込みに重要であることが示唆された。EV のヘパリン処理も OPC による EV の取り込みを抑制した (図 2C)。対照的に、GRGDS ペプチドによる OPC の前処理は EV の取り込みを抑制しなかった (図 2E)。これらの結果から、FN の一部が EV 上の HSPG に結合していること、OPC による EV の取り込みが OPC 上の HSPG への FN の結合によってもたらされていることが明らかになった。

OPC による EV 取り込みの低下がもたらす OPC の生存・増殖への影響を検討した。ヘパリナーゼ処理などにより EV の取り込みを低下させたところ、OPC の生存および増殖が抑制された (図 3)。この結果から、OPC に対する EV の効果は EV が OPC に取り込まれることにより生じている可能性が示唆される。

(2) 脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞の表面に存在する PDGF-B はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進する

MVEC-EV に比べて Rat-1-EV は OPC の生存・増殖を促進する活性が低いことから、OPC の生存・増殖の促進に關与する EV に含まれるタンパク質を探索するため MVEC-EV および Rat-1-EV を質量分析により解析、比較した。MVEC-EV に含まれるタンパク質 (1388 個) Rat-1-EV に含まれるタンパク質 (695 個) を同定した。このうち MVEC-EV のみに含まれるタンパク質は 869 個であり、この中で OPC の生存・増殖促進に關連することが強く示唆される血小板由来成長因子 PDGF-B を候補タンパク質として検討した。ELISA 法により MVEC-EV 1  $\mu$ g あたり約 10pg の PDGF-BB が検出されたが、Rat-1-EV については検出限界レベルであった (図 4)。抗 PDGF-B 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により MVEC-EV の膜表面に金コロイドの付着が認められ、PDGF-B の存在が確認された (図 5)。MVEC-EV をヘパリナーゼで処理したところ、EV に含まれる PDGF-BB の量が低下した (図 6)。これらの結果から、PDGF-BB は HSPG を介して EV 表面に繋がれていることが明らかになった。

OPC に対する MVEC-EV に含まれる PDGF-BB の効果を検討するため、MVEC-EV を添加した OPC 培養系に PDGF-BB に対する中和抗体を加えたところ、抗体存在下で OPC の増殖が有意に低下した (図 7A, B)。MVEC-EV に含まれる PDGF-BB の刺激による OPC 膜面に存在する受容体 PDGFR のリン酸化の変化をウエスタンブロットにより確認した。MVEC-EV の添加は OPC の PDGFR のリン酸化を亢進させたが、PDGF-BB に対する中和抗体の添加により PDGFR のリン酸化は

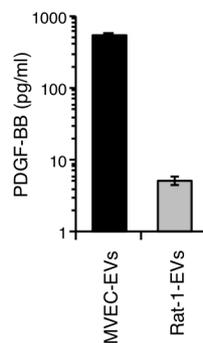


図4. ELISAによるMVEC-EVおよびRat-1-EVに含まれるPDGF-BBの定量。(サンプル50  $\mu$ lあたり1  $\mu$ gのEVを含む.)

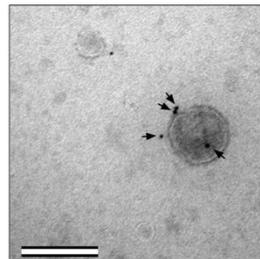


図5. 免疫電子顕微鏡によるMVEC-EVにおけるPDGF-Bの検出。(Scale bar, 200 nm)

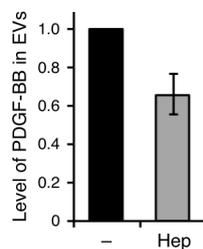


図6. ヘパリナーゼ処理によりMVEC-EVに含まれるPDGF-BB量は低下した。(-:処理なし、Hep:処理あり)。

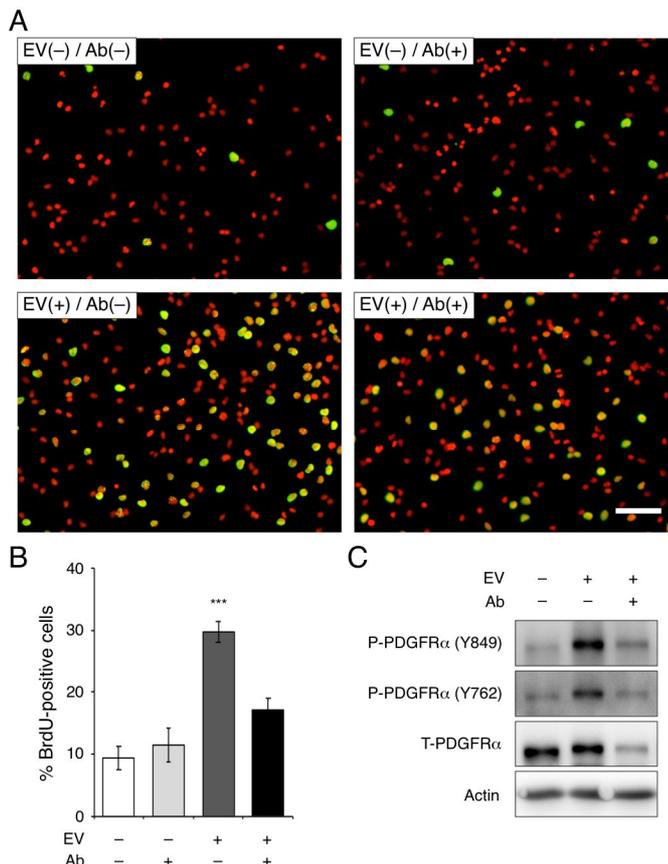


図7. PDGF-Bに対する中和抗体によりMVEC-EVのOPC増殖促進活性は低下した。

(A): 各培養条件下におけるBrdU染色像 (Scale bar, 50  $\mu$ m)。 (B): BrdU陽性細胞の割合。 (C): 中和抗体の添加により受容体PDGFR のリン酸化レベルが低下した。

抑制された(図 7C)。これらの結果より、MVEC-EV に含まれる PDGF-BB が OPC の PDGFR を刺激することで OPC の増殖を促進することが示唆された。

### (3) 脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞に含まれるマイクロ RNA の解析

EV に多く含まれているマイクロ RNA (microRNA) が OPC 生存・増殖の促進に関与していると考えられることから、MVEC-EV および Rat-1-EV から miRNA を調製、microRNA 定量 PCR パネルにより解析した。また、MVEC-EV および Rat-1-EV に含まれる microRNA のライブラリーを構築して microRNA-Seq 解析により発現プロファイルを得た。MVEC-EV には rno-miR-21-5p, rno-miR-126a-3p, rno-miR-26a-5p, rno-miR-23a-3p, rno-miR-181a-5p などの成熟 microRNA が、Rat-1-EV には rno-miR-21-5p, rno-miR-26a-5p, rno-miR-221-3p, rno-miR-99b-5p, rno-miR-27b-3p などの成熟 microRNA が含まれていることを明らかにした。

#### < 引用文献 >

Puentes, S., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Imai, H., Ishizaki, Y., Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage., *Brain Research*, 1469, 2012, 43-53.

Iijima, K., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Puentes, S., Imai, H., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Ishizaki, Y., Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions., *Journal of Neurochemistry*, 135, 2015, 539-50.

Kurachi, M., Mikuni, M., Ishizaki, Y., Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells., *PLOS ONE* 11, 2016, e0159158.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Transplantation of iPS derived vascular endothelial cells improves white matter ischemic damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Kurachi Masashi, Naruse Masae, Shibasaki Koji, Sugio Shouta, Matsumoto Ken, Ema Masatsugu, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki	4. 巻 692
2. 論文標題 The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Flk1-GFP mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 70 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Yukari, Sejimo Yukihiko, Kurachi Masashi, Ishizaki Yasuki, Nakano Takashi, Takahashi Akihisa	4. 巻 119
2. 論文標題 X-ray irradiation induces disruption of the blood-brain barrier with localized changes in claudin-5 and activation of microglia in the mouse brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 199 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Hanako, Kurachi Masashi, Naruse Masae, Shibasaki Koji, Ishizaki Yasuki	4. 巻 496
2. 論文標題 BMP4 signaling in NPCs upregulates Bcl-xL to promote their survival in the presence of FGF-2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 588 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osawa Sho, Kurachi Masashi, Yamamoto Hanako, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki	4. 巻 488
2. 論文標題 Fibronectin on extracellular vesicles from microvascular endothelial cells is involved in the vesicle uptake into oligodendrocyte precursor cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 232 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.05.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Kurachi Masashi, Naruse Masae, Shibasaki Koji, Sugio Shouta, Matsumoto Ken, Ema Masatsugu, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki, Yasuki
2. 発表標題 The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Flk1-GFP mice.
3. 学会等名 The 29th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizaki Yasuki, Kurachi Masashi, Xu Bin, Matsuzaki Toshiyuki
2. 発表標題 A role for PDGF-B in the stimulatory effect of exosomes from cerebral microvascular endothelial cells on proliferation of oligodendrocyte precursor cells.
3. 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Hanako, Kurachi Masashi, Shibasaki Koji, Naruse Masae, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Calpain/calpastatin system plays a role for control of NPC survival by via cleavage of Bax.
3. 学会等名 Neuro 2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurachi Masashi, Xu Bin, Osawa Sho, Matsuzaki Toshiyuki, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 PDGF-B in the extracellular vesicles from brain microvascular endothelial cells promotes proliferation of oligodendrocyte precursor cells.
3. 学会等名 Neuro 2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Effect of transplantation of iPS-derived vascular endothelial cells on white matter infarct.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Transplantation of iPS-derived vascular endothelial cells ameliorates white matter infarct
3. 学会等名 The 10th Conference of International Society of Radiation Neurobiology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本華子, 倉知 正, 成瀬雅衣, 柴崎貢志, 石崎泰樹
2. 発表標題 FGF-2とBMP4シグナルによる神経幹細胞様細胞のアポトーシス抑制とBax制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 祥, 倉知 正, 山本華子, 好本裕平, 石崎泰樹
2. 発表標題 Fibronectin on extracellular vesicles from microvascular endothelial cells plays a role for the vesicle uptake into oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 The 9th Conference of International Society of Radiation Neurobiology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎泰樹, 倉知 正, 山口舞花, 山本華子, 吉田由香里, 大澤 祥, 行木信一, 高橋昭久
2. 発表標題 Effect of extracellular vesicles from X-ray irradiated glioblastoma cells on survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 The 8th Conference of International Society of Radiation Neurobiology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田由香里, 瀬下幸彦, 倉知 正, 石崎泰樹, 中野 隆史, 高橋昭久
2. 発表標題 X-ray irradiation induces disruption of the blood-brain barrier with localized changes in claudin-5 and activation of microglia in the mouse brain
3. 学会等名 The 8th Conference of International Society of Radiation Neurobiology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本華子, 倉知 正, 成瀬雅衣, 柴崎貢志, 石崎泰樹
2. 発表標題 FGF-2とBMP4シグナルによるBaxを介したアポトーシスの制御
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤 祥, 倉知 正, 山本華子, 好本裕平, 石崎泰樹
2. 発表標題 Fibronectin on the surface of microvascular endothelial cell-derived extracellular vesicles mediates their uptake into oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤 祥, 倉知 正, 山本華子, 好本裕平, 石崎泰樹
2. 発表標題 Fibronectin on extracellular vesicles from microvascular endothelial cells mediates vesicle uptake into oligodendrocyte precurs
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田由香里, 瀬下幸彦, 倉知 正, 石崎泰樹, 中野隆史, 高橋昭久
2. 発表標題 正常脳組織における放射線急性障害の解析
3. 学会等名 第55回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----