

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15124

研究課題名(和文)脳梗塞巣に出現する新規ミクログリア：iSMGの機能と脳組織再生に与える影響の解明

研究課題名(英文)Analysis of new type of microglia appeared in the necrotic tissue after cerebral ischemia

研究代表者

澤野 俊憲 (Sawano, Toshinori)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60805597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞発症に伴い壊死巣が形成される。脳組織は再生能力が極めて低いとされるが、この壊死組織内に新たにミクログリアが出現することを見出し、その細胞の特性と機能を明らかにすることを目指した。解析の結果、これらの新規ミクログリアは健常組織や壊死巣周囲のミクログリア、新生仔ミクログリアと比較して血管系発達に關与する遺伝子群を豊富に発現することが判明した。さらに、新規ミクログリアは脳梗塞後の壊死巣内に出現し、血管系細胞に起源を持つ虚血誘導性幹細胞の発達を促進する可能性が示された。従って、これらの新規ミクログリアが脳梗塞後の組織修復に關与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の医療技術向上に伴い、脳梗塞患者の救命率は格段に向上している。しかし、その一方で後遺症に苦しむ患者数も増加しているが、それに対する有効な治療の選択肢は限られている。本研究では脳梗塞後にただ脱落を待つのみだと考えられていた壊死組織内に新たにミクログリアが出現しており、それらが壊死組織内に出現する幹細胞を支持する作用を持つことを示した。これらの知見は脳梗塞に対する幹細胞治療の確立に応用可能であり、新たな治療戦略の提示に貢献しうるものである。

研究成果の概要(英文)：Brain ischemia induces extensive cell death, and ischemic core tissue is considered as unsalvageable area. However, we previously demonstrated that microglia are induced in the ischemic core area. In this study, we investigated the function of these microglia. Ischemic core microglia strongly expressed vascular development-related genes. Pharmacological depletion of ischemic core microglia inhibited the development of ischemia-induced multipotent stem cells, which are derived from vascular lineage cells. These results suggest that novel microglia appearing in the ischemic core exert important roles in the maintenance of ischemia-induced multipotent stem cells and tissue repair after brain ischemia.

研究分野：神経病理学

キーワード：ミクログリア 虚血誘導性幹細胞 脳梗塞 血管 組織修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系組織の修復能力は極めて低いため、脳梗塞で形成される壊死巣(脳梗塞巣)はただ脱落を待つみの組織であると考えられてきた。実際に脳梗塞後に十分な組織修復が生じない事に起因して、多くの患者が麻痺等の後遺症に苦しんでいる。その一方で、我々のグループでは脳梗塞巣内にニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどに分化可能な虚血誘導性幹細胞(ischemia-induced multipotent stem cells: iSCs)が出現することを明らかにしている(Nakagomi et al., Eur J Neurosci., 2009. and Sakuma et al., J Neuroinflamm., 2016.)。さらに、申請者は脳梗塞巣内に新たにミクログリアが出現することを見出している。これらのミクログリアは一部が iSCs マーカーである Nestin を発現していたことから、iSCs に由来するミクログリアである可能性が高いと考え、虚血誘導性幹細胞由来ミクログリア(iSCs derived microglia: iSMG)と名付けた。これまでにミクログリアが様々な中枢神経疾患において組織傷害から組織修復に至るまで幅広い関与を示すことが明らかになっている。特に、脳梗塞巣という特殊な環境下に出現する iSMG は、他のミクログリアと比較して特徴的な機能を有している可能性が高い。iSMG の機能や、これらの細胞が脳梗塞巣内に出現する意義を明らかにすることで、脳梗塞後の組織修復が十分に生じない原因や、それを克服する戦略を見出すことが期待できる。また、iSCs はヒト脳梗塞患者の脳組織からも単離され存在が証明されているため、この研究で得られる知見はヒトに対しても応用が可能である(Tatebayashi et al., Stem Cell Dev., 2017.)。

2. 研究の目的

これまでに iSMG の脳梗塞巣内での動態、機能については全く明らかにされていない。本研究では iSMG の特徴抽出を行うことでこれらを予測し、さらに実験的に実証することで iSMG が脳梗塞巣内で周囲に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。脱落するのみと考えられている脳梗塞巣におけるこれらの細胞の活動を明らかにすることで、中枢神経系における組織修復能についての概念に再考を促すことを目指した。

3. 研究の方法

すべての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」その他関係法令に基づき、立命館大学びわこ・くさつキャンパス動物実験委員会で承認された動物実験計画書に従って実施した。遺伝子組換え実験は遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令、その他の関係法令に基づく立命館大学遺伝子組換え実験安全管理規程を遵守し、遺伝子組換え実験安全委員会で承認された遺伝子組換え実験計画申請書に従って実施した。実験に動物を供する際には、その数を最小限にとどめると共に、実験動物に苦痛を与えることの無いよう、動物実験計画書を提出したうえ、認められたものに限って実施した。

(1) 脳梗塞巣内における iSMG 動態の解析

脳梗塞モデルマウスは脳血管走行の個体差が小さい C.B-17/Icr-+/+Jcl マウスを使用し、再現性の高い脳梗塞を誘導可能な田口らの手法に従って作製した(Taguchi et al., J. exp. Stroke & transl. med, 2010.)。iSMG が脳内に起源を持つ細胞であることを実証するために、GFP 陽性細胞の末梢循環への移植実験を行った。移植は全身性に GFP を発現する GFP ヘテロ型マウスと同腹から得られた野生型マウスの皮膚を一定期間接合することによって実施した。組織内における細胞やタンパク質発現の可視化は各種免疫組織学的手法を用いて実施した。

(2) iSMG の機能的特徴抽出

iSMG、脳梗塞巣周囲のミクログリア、健常組織ミクログリア、新生仔ミクログリアを単離し、マイクロアレイによって、それぞれにおける網羅的遺伝子発現解析を行った。iSMG と各ミクログリアを比較することで、iSMG における特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにし、そこから iSMG 機能を予測した。また、特に特徴的であった遺伝子については qPCR 解析を行ってマイクロアレイによって得られた結果を確認した。iSMG 及び、各種ミクログリアは磁気ビーズ標識された抗 CD11b 抗体を使用し、磁気分離法を用いて単離した。

(3) iSMG 機能の解析

iSMG が iSCs に与える影響を検討するために、iSMG を除去することによる iSCs sphere 形成能の比較を行った。iSMG の除去はミクログリア生存に必要な CSF1R シグナルに対する阻害剤である PLX3397 を投与することによって実施した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞巣内における iSMG 動態の解析

脳梗塞発症後 1 日目、2 日目、3 日目の脳梗塞巣内における Iba1 (ミクログリアマーカー)陽

性細胞を組織学的手法によって可視化した。脳梗塞発症後 1 日目の脳梗塞巣内には小さな細胞体に突起を持つ形態のミクログリアが数多く存在していたが、突起が途切れるように染色されるなど、ほとんどのミクログリアが不完全な形態を示していた。また、ほぼすべてのミクログリアが TUNEL 陽性であり、細胞死を起こしていることが明らかになった。実際に 2 日目に脳梗塞巣内のミクログリア数は減少していた。しかし、iSCs が効率的に単離できる時期でもある 3 日目には再びミクログリアが増加していた。これらのミクログリアはアメーバ様形態を示しており、一部は iSCs マーカーを発現していた。脳梗塞後に出現し、iSCs マーカーを発現することから、これらのミクログリアは iSCs に由来する iSMG であると考えられる。しかし、脳梗塞後には末梢血細胞の浸潤が生じ、それらが分化したマクロファージも Iba1 を発現してミクログリア様に振舞うことが知られている。そこで、脳梗塞発症後 3 日目に脳梗塞巣内に出現したミクログリアが、脳内固有の細胞である iSCs に由来した iSMG であることを立証するため、全身性に GFP を発現するマウスと野生型マウスの皮膚接合によって GFP 陽性細胞の末梢循環への移植を行った後、野生型マウスに脳梗塞を発症させ、3 日目における脳梗塞巣内への末梢血細胞の浸潤を検証した。その結果、脳梗塞巣内に GFP を発現する Iba1 陽性細胞は確認されなかったことから、脳梗塞巣内に出現する Iba1 陽性細胞は脳内に起源をもつ iSMG である可能性が高いと考えられる。

(2) iSMG の機能的特徴抽出

iSMG 機能を推測することを目指し、iSMG と脳梗塞巣周囲ミクログリア、健常組織ミクログリア、新生仔ミクログリアの網羅的遺伝子変動解析とそれに基づく遺伝子オントロジー解析を実施した。その結果、脳梗塞巣周囲ミクログリアでは免疫応答に関与する遺伝子群が、健常組織ミクログリアでは恒常性維持に関与する遺伝子群が、新生仔ミクログリアでは神経発達に関与する遺伝子群が強く発現していた。そして、iSMG では免疫応答に関与する遺伝子に加えて血管系発達に関与する遺伝子群が他のミクログリアに比べて特徴的に発現していることが判明した。実際に qPCR 解析によって各種コラーゲン遺伝子や血管内皮細胞増殖因子遺伝子の発現が iSMG では他のミクログリアと比較して有意に高いことを確認した。

(3) iSMG 機能の解析

網羅的遺伝子発現解析の結果、iSMG が血管系発達を促進する作用を有する可能性が示唆された。iSMG の起源でもある iSCs は血管系細胞であるペリサイト由来することが既に明らかになっている(Sakuma et al., J Neuroinflam., 2016.)。そこで、iSMG が iSCs の発達を促進しているのではないかと予想した。これを検証するためにミクログリア除去剤である PLX3397 を投与して iSMG を除去した脳梗塞モデルマウスと、通常脳梗塞モデルマウスから脳梗塞巣を回収した後、幹細胞培地にて浮遊培養を行い形成される iSCs sphere 数を比較した。その結果、iSMG を除去することで、形成される iSCs sphere 数が有意に減少したことから、iSMG が脳梗塞巣内において iSCs の出現や維持に関与している可能性が示された(図)。

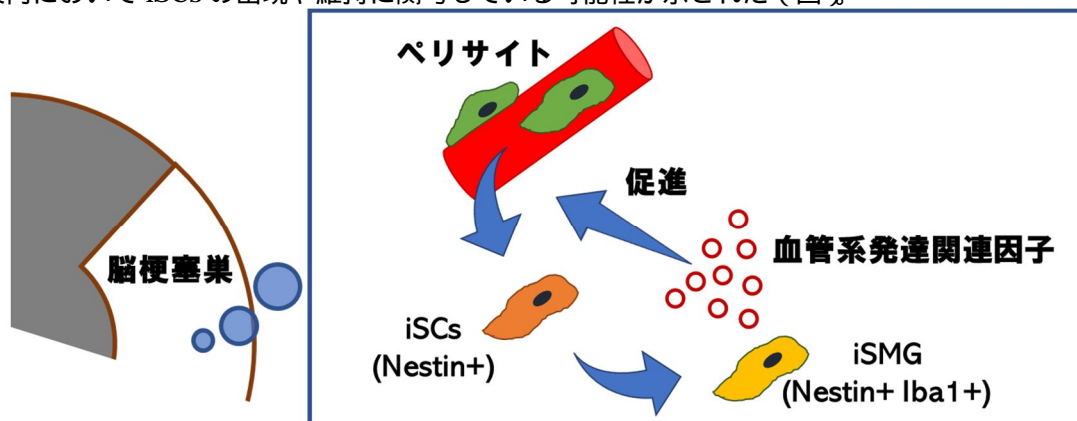


図. iSMG は血管系発達関連因子の放出によって iSCs を支持している可能性がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sawano Toshinori, Tsuchihashi Ryo, Watanabe Fumiya, Niimi Kenta, Yamaguchi Wataru, Yamaguchi Natsumi, Furuyama Tatsuo, Tanaka Hidekazu, Matsuyama Tomohiro, Inagaki Shinobu | 4. 巻 406 |
| 2. 論文標題 Changes in L-arginine metabolism by Sema4D deficiency induce promotion of microglial proliferation in ischemic cortex | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 420 ~ 431 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.03.037 | 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 Tsuchihashi Ryo, Sawano Toshinori, Watanabe Fumiya, Yamaguchi Natsumi, Yamaguchi Wataru, Niimi Kenta, Shibata Satoshi, Furuyama Tatsuo, Tanaka Hidekazu, Inagaki Shinobu | 4. 巻 521 |
| 2. 論文標題 Upregulation of IFN- induced by Sema4D-dependent partial Erk1/2 inhibition promotes NO production in microglia | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 827 ~ 832 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.201 | 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 Tanaka Hidekazu, Sawano Toshinori, Konishi Naoko, Harada Risako, Takeuchi Chiaki, Shin Yuki, Sugiura Hiroko, Nakatani Jin, Fujimoto Takahiro, Yamagata Kanato | 4. 巻 721 |
| 2. 論文標題 Serotonin induces Arcadlin in hippocampal neurons | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Letters | 6. 最初と最後の頁 134783 ~ 134783 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.134783 | 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 Niimi Kenta, Kohara Misaki, Sedoh Eriko, Fukumoto Moe, Shibata Satoshi, Sawano Toshinori, Tashiro Fumi, Miyazaki Satsuki, Kubota Yoshiaki, Miyazaki Jun-ichi, Inagaki Shinobu, Furuyama Tatsuo | 4. 巻 147 |
| 2. 論文標題 FOXO1 regulates developmental lymphangiogenesis by upregulating CXCR4 in the mouse-tail dermis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Development | 6. 最初と最後の頁 dev.181545. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.181545 | 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 Tanaka Yasue, Nakagomi Nami, Doe Nobutaka, Nakano-Doi Akiko, Sawano Toshinori, Takagi Toshinori, Matsuyama Tomohiro, Yoshimura Shinichi, Nakagomi Takayuki | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Early Reperfusion Following Ischemic Stroke Provides Beneficial Effects, Even After Lethal Ischemia with Mature Neural Cell Death | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 1374 ~ 1374 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9061374 | 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 Takeuchi Chiaki, Ishikawa Miho, Sawano Toshinori, Shin Yuki, Mizuta Nanano, Hasegawa Saki, Tanaka Rina, Tsuboi Yuma, Nakatani Jin, Sugiura Hiroko, Yamagata Kanato, Tanaka Hidekazu | 4. 巻 442 |
| 2. 論文標題 Dendritic Spine Density is Increased in Arcadlin-deleted Mouse Hippocampus | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 296 ~ 310 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.06.037 | 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 Ozawa Kei, Mori Daichi, Hatanaka Ayumu, Sawano Toshinori, Nakatani Jin, Ikeya Yukinobu, Nishizawa Mikio, Tanaka Hidekazu | 4. 巻 142 |
| 2. 論文標題 Comparison of the anti-colitis activities of Qing Dai/Indigo Naturalis constituents in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 148 ~ 156 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.01.003 | 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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口菜摘、福本佳永、澤野俊憲、中谷仁、柳沢大治郎、遠山育夫、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞後の自発運動が機能回復と脳組織に与える影響 |
| 3. 学会等名 第96回日本解剖学会近畿支部学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口菜摘、福本佳永、澤野俊憲、中谷仁、柳沢大治郎、遠山育夫、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞後の自発運動による機能回復と脳組織への影響 |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和 |
| 2. 発表標題 Function of novel Iba1-positive cells appearing in the ischemic core |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口菜摘、福本佳永、澤野俊憲、中谷仁、柳沢大治郎、遠山育夫、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞後の自発運動による機能回復効果と脳組織における変化 |
| 3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞巣内における新規ミクログリアの機能解明 |
| 3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、井上耀介、西良太郎、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞巣内に出現する新規マイクログリアの解析 |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、井上耀介、西良太郎、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞巣内に出現した非浸潤性Iba1陽性細胞の解析 |
| 3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澤野俊憲、土橋遼、渡邉文也、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳梗塞後マイクログリアのL-arginine代謝と増殖能にSema4Dが与える影響の解析 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 井上耀介、山口菜摘、西川善貴、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和 |
| 2. 発表標題 脳虚血後のArcadlin発現の解析 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|