

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09373

研究課題名（和文）脳虚血病態におけるペリサイトの細胞死にフェロトーシスは関与するか？

研究課題名（英文）Ferroptosis of pericyte during brain ischemia

研究代表者

吾郷 哲朗（Ago, Tetsuro）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30514202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：鉄は生体応答を支える種々のタンパク質の必須成分である。同時に酸化ストレスの原因となる元素でもある。虚血再灌流など酸素濃度が急激に変化する環境下では、細胞内鉄代謝が攪乱され、鉄依存性細胞死（フェロトーシス）が生じることがあり注目されている。脳梗塞では超急性期再灌流療法が確立した。血栓除去にもかかわらず、有効な再灌流が生じないno-reflowや傷害悪化を認める症例が存在しフェロトーシスの関与が示唆される。本研究結果により、脳虚血再灌流の病態では神経系細胞よりも細小血管ペリサイトがフェロトーシスを生じやすいこと、機能回復促進の側面からペリサイトのフェロトーシス抑制が治療標的となることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は日本人の代表的国民病である。超急性期における血栓溶解薬投与やカテーテル治療による再灌流療法が確立したが、その恩恵を受ける患者は10%に満たない。他方、リハビリテーション治療を除き神経機能回復を促進する治療は未だ存在しない。脳梗塞直後の神経保護療法は再灌流療法抜きに無効であることが証明されたが、治療開始に時間的余裕のある機能回復促進療法は、種々の臨床疫学研究、基礎研究の成果からも有望であると考えられる。疾病重症度やその頻度を考えると機能回復促進療法の開発は急務である。脳梗塞後に生じる内因性機能回復機構を明らかにするとともに、その標的細胞を明確にした点で本成果は意義あるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Iron is an essential element requiring various biological responses and causing oxidative stress. Under conditions that oxygen concentrations are rapidly changed, such as ischemia-reperfusion, disturbed intracellular metabolism of iron can cause ferroptosis, an iron-dependent cell death, in some cell types. Reperfusion therapy is established in acute ischemic stroke in human. Nevertheless, no-reflow phenomenon or worsening of damages can occasionally be found even following successful reperfusion. In this study, we have demonstrated that microvascular pericytes, rather than neuronal cells, are more susceptible for ferroptosis in acute ischemic stroke accompanied by reperfusion and that inhibition of pericyte ferroptosis can be a therapeutic target in terms of post-stroke functional recovery.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳梗塞 虚血再灌流 ペリサイト フェロトーシス 組織修復 神経機能回復 鉄

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は日本人における代表的国民病の一つである。rt-PA 静注や血管内カテーテル血栓除去による再灌流療法の確立により急性期脳梗塞治療は近年飛躍的な進歩を遂げたが、その恩恵を受けることができる患者は全脳梗塞患者の 10%に満たない。加えて、閉塞血管に対する再開通療法が成功したにもかかわらず、末梢領域までの再灌流が生じない「No-reflow 現象」を認める症例や、再灌流が生じたにもかかわらず「虚血再灌流障害」によって脳梗塞発生を抑制できない症例が少なからず存在する。再灌流療法をより有効なものとするためには「虚血再灌流障害」を熟知し、最小限度にとどめる術を知る必要がある。「虚血再灌流障害」を生じる原因として「酸化ストレス」が知られる。しかし「酸化ストレス」に対する脆弱性は細胞ごとに異なっており、脳における再灌流障害においても、どの細胞がどのような機序で「酸化ストレス」によって傷害を受けるか、については不明な点が多い。

我々はマウスを用いて、脳梗塞の発生と機能回復に至る分子細胞機序について継続的に検討を行っている。健常状態において脳軟膜動脈を介した側副血行のほとんど存在しない CB17 系統マウスを用いて、中大脳動脈の永久閉塞もしくは虚血(=血管閉塞)時間を違えた一過性閉塞・再灌流を行うことによって、脳梗塞発生過程やその病理について検討してきた¹⁾。この系統のマウスでは、60 分以上中大脳動脈を閉塞させると再灌流を行っても 24 時間後には永久閉塞と同等に灌流域全体に脳梗塞が発生した。梗塞内部組織を詳細に観察すると、60 分の中大脳動脈閉塞では梗塞内部の血管構築はほぼ正常であったが、虚血時間が 90 分、150 分、240 分と長くなるに従い、内皮細胞周囲のペリサイトが脱落し、永久閉塞の場合にはペリサイトはほぼ消失していた。内皮細胞周囲におけるペリサイトの存在は、血液脳関門の構造維持のみならず、有効な脳血流発生に不可欠である。つまり、血栓除去による再灌流が成功した時点においてペリサイトが傷害を受けていると有効な脳血流が生じず No-reflow 現象の原因となる場合がある。また、脳梗塞が発生した際に、内皮細胞周囲におけるペリサイトの残存が、亜急性期以降の組織修復や機能回復に重要な役割を果たすことを我々は報告してきた¹⁻³⁾。つまり、虚血再灌流時に生じうるペリサイトの機能障害・細胞死を抑制することができれば、脳梗塞の縮小化させるのみならず、機能回復を促進できる可能性がある。

脳虚血により細胞死が生じた際、死細胞から周囲の細胞にとって傷害の原因となりうる様々な物質が放出される。例えば、神経系細胞のうち虚血に最も脆弱な細胞はオリゴデンドロサイトであるが、オリゴデンドロサイトからは酸化ストレスの原因となるコレステロールや鉄(Fe^{2+})が放出される。通常これらはミクログリアやマクロファージによって除去されるが、梗塞深部ではその処理に時間を要するため、除去されるまでの間に生じうる傷害を最小限に留めることが重要になる^{3,4)}。

細胞死の生じ方に、アポトーシス・ネクローシスのみならず様々な形態があることが近年明らかになってきた。また生体内における種々の鉄代謝制御タンパク質が明らかになるに従い、鉄による脂質過酸化によって細胞膜が破綻し細胞死を生じるフェロトーシスに注目が集まっている。脳虚血再灌流時、梗塞巣内においては一部の細胞が生存しながら、その近傍では死細胞からコレステロールや鉄が放出されるといった現象が生じるため、フェロトーシスによる二次組織傷害が生じる可能性があり、治療標的となりうるのではないかと作業仮説を構築した。

2. 研究の目的

脳虚血再灌流時に生じうる組織傷害にフェロトーシスが関与しうるか？関与するのであればどの細胞の傷害が主体となるか？脳虚血再灌流に伴い生じる脳傷害やその後の組織修復をフェロトーシス阻害によって軽減・促進することはできないか？という点について明らかにする。

(1) フェロトーシス阻害により虚血再灌流に伴う脳梗塞の発生はそもそも軽減・抑制できるのか？脳梗塞が生じる際、血管系細胞よりも先に神経系細胞の細胞死が生じる。仮に神経系細胞死を抑制することができなくとも、神経系細胞から逸脱する鉄によって、血管系細胞のフェロトーシスが生じることはないだろうか？脳梗塞発生時、血管系細胞の中ではペリサイトが細胞死に陥りやすく、その生存は組織修復・機能回復の重要な規定因子となる¹⁾。フェロトーシス阻害によってペリサイトの生存を促し、組織修復・機能回復を促進することはできないだろうか？

(2) 内皮細胞よりもペリサイトにおいてフェロトーシスが生じやすいのであれば、その原因は何か？両者における鉄代謝関連分子の発現やフェロトーシス感受性に差はないか？について検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス脳梗塞モデル

CB17 系統マウスを用いて中大脳動脈一過性閉塞による脳梗塞を作製する。CB17 系統マウスは軟膜動脈間吻合が極めて脆弱なマウス系統であり、中大脳動脈閉塞時に側副血行による血流供給が生じないため虚血再灌流障害の評価に適したマウスである。CB17 系統マウスでは 60 分以上の中大脳動脈閉塞により灌流全域に永久閉塞した場合と同等の脳梗塞が生じる¹⁾。血管閉塞時間が

長くなれば、脳梗塞内部における細小血管ペリサイトの生存率が低下すること、梗塞内部のペリサイト生存率はその後の血流回復および組織修復と正の相関を示し良好な機能回復につながることを明らかにしている¹⁾。本研究課題では脳梗塞内部にペリサイト細胞死が観察される90分の脳虚血再灌流を脳梗塞のモデルとして選択した。フェロトシス阻害薬であるUAMC-3203を脳梗塞作製1日前より腹腔内に連日投与(2.5 μmol/体重(kg))して、day 1-3-7における梗塞サイズや梗塞内部の病理組織変化を免疫染色にて検討した。脳梗塞サイズはMAP2染色、内皮細胞の残存はコラーゲン type IV、ペリサイトの残存はCD13による免疫組織染色により評価した。梗塞内部における分子の発現は、梗塞組織から調整したホモジネートを用いてImmunoblotやmRNAのqPCRで定量評価した。またマウスの運動機能は、rotarod test、cylinder testにより評価した。

(2)培養脳血管ペリサイトおよび内皮細胞を用いて、SYTOX greenの取り込みにより細胞膜障害による細胞死(フェロトシス)を評価した。代表的なフェロトシス誘導物質であるRSL3により、内皮細胞ならびにペリサイトのフェロトシスが誘導されるか、また、その阻害薬UAMC-3203(1 μM)により細胞死が抑制されるかを検討した。またアポトシス阻害薬Z-VAD FMK(50 μM)、ネクロプトシス阻害薬necrostatin(10 μM)を対照コントロールとして用いた。梗塞巣内における鉄の流出を想定して、二価鉄(Fe²⁺)、三価鉄(Fe³⁺)、ならびにtransferrinを培養細胞に投与しそれらの直接効果についても検討した。脳虚血を模倣する細胞環境として短時間の無酸素・無グルコース(oxygen-glucose depletion, OGD)処理を行った。また、鉄代謝に関わる分子群(Transferrin receptor(TfR)、Divalent metal transporter-1(DMT1)、Ferroportin、Ferritin HおよびL、ならびにGPX4)の発現量をreal-time PCRで評価した。

4. 研究成果

(1)CB17系統マウスにフェロトシス阻害薬UAMC-3203を腹腔内前投与した後、中大脳動脈閉塞(90分)・再灌流により脳梗塞を作製した。MAP2染色で評価した梗塞サイズは、UAMC-3203非投与群に比しday 1, 3では有意差を認めず、フェロトシス阻害では虚血再灌流による脳梗塞の発生を抑制できない可能性が示唆された。一方、day 7においてはUAMC-3203投与群において梗塞サイズの有意な縮小化を認めた。COL IVで評価した残存内皮細胞・基底膜に両者間で有意差を認めなかったが、CD13陽性細胞数および脳梗塞ホモジネートで評価した梗塞内部におけるペリサイト残存数はday 1, 3ともにUAMC-3203投与群で有意に多く、UAMC-3203によるペリサイト細胞死の抑制が示唆された。つまり虚血再灌流によって生じる脳梗塞の内部において、ペリサイトのフェロトシスが生じていることが示唆されるとともに、フェロトシス阻害によりペリサイトの生存率が上昇し、その後の組織修復(=day 7での梗塞巣の縮小化)が促進されている可能性が示唆された。

(2)脳梗塞を伴う虚血再灌流病態において、ペリサイト特異的なフェロトシスの発生が示唆されたため、培養内皮細胞およびペリサイトを用いてフェロトシス感受性に関する検討を行った。抗酸化タンパク質GPX4の阻害剤であるRSL3(0.1-10 μM)を培養ペリサイトに投与すると用量依存性に細胞死が生じ、この細胞死はUAMC-3203(1 μM)によってほぼ完全に抑制された。またRSL3投与はペリサイトにおけるマロンジアルデヒド(脂質過酸化物質)の細胞内蓄積を誘導した。一方RSL3によって誘導されるペリサイトの細胞死は、アポトシス阻害剤やネクロプトシス阻害剤では抑制されなかった。他方、RSL3投与では内皮細胞の細胞死は生じなかったことから、ペリサイトは内皮細胞に比しフェロトシスを生じやすい細胞である可能性が示唆された。次に、培養ペリサイト対して、二価鉄、三価鉄、もしくは、トランスフェリンを細胞外から投与しフェロトシス発生の有無を検討した。二価鉄投与を行った場合にのみ、ペリサイトにおける細胞内遊離二価鉄の蓄積、細胞死が観察された。さらにペリサイトに一過性OGD処置を行うとGPX4の発現が減少し、二価鉄投与による遊離二価鉄の蓄積、細胞死がより高度となった。

内皮細胞よりもペリサイトにおいてフェロトシスを生じやすい理由を明らかにするために、両細胞間の鉄代謝関連分子の発現差について検討した。ペリサイトは内皮細胞に比し、二価鉄を取り込むトランスポーターであるDMT1の発現が有意に高く、細胞内からの鉄排出に関わるferroportinの発現が有意に低いことが明らかになった。さらにOGDによりペリサイトにおけるDMT1の発現は増加、Ferroportinの発現は有意に減少した。このことより脳梗塞内において二価鉄の蓄積が生じると、ペリサイトは二価鉄を細胞内に取り込みフェロトシスを生じやすい状態となりやすいことが示唆された。

(3)90分の脳虚血再灌流により脳梗塞を作製しFerroOrange(二価鉄検出試薬)で免疫染色を行うと、梗塞領域に一致して二価鉄の蓄積が観察された。脳より作製したミエリンデブリスに二価鉄が豊富に含まれていることを確認し、ミエリンデブリスをペリサイトに投与すると細胞死が観察され、UAMC-3203を前投与しておくことこの細胞死が抑制されることを確認した。

(4)フェロトシス阻害薬により組織修復改善が期待されたこともあり、並行した運動機能改善効果を期待したが、本研究課題では残念ながら有意な機能改善を示すことはできなかった。90分脳虚血再灌流マウスの運動機能回復は比較的良好であるため、今回用いた運動機能評価法では機能回復の是非を識別するのに十分ではなかったと判断した。

・成果のまとめ

脳虚血再灌流においてひとたび脳梗塞が発生すると、梗塞内部では神経系細胞(とくにオリゴデンドロサイト)から流失した二価鉄によりペリサイトのフェロトーシスが誘発される可能性が示唆された。ペリサイトは内皮細胞に比べて細胞内に鉄を蓄積させやすい性質を有しており、虚血刺激によりさらに鉄の取り込みを増加させる可能性が示唆された。このため再灌流が生じた際、細胞内過剰鉄によって酸化ストレス・フェロトーシスを発生させ易くなるものと判断した。脳梗塞内部におけるペリサイト残存は血流回復を介した組織修復および機能回復に重要な役割を果たすため、ペリサイトにおけるフェロトーシスの回避は虚血再灌流傷害における脳機能回復を促進できる可能性があると考えられた。

引用文献

1. Tachibana M, Ago T, et al. Early reperfusion after brain ischemia has beneficial effects beyond rescuing neurons. *Stroke* 2017; 48: 2222-2230.
2. Shibahara T, Ago T, et al. Pericyte-mediated tissue repair through PDGFR β promotes peri-infarct astrogliosis, oligodendrogenesis, and functional recovery after acute ischemic stroke. *eNeuro* 2020; 7: ENEURO.0474-0419.2020.
3. Shibahara T, Ago T, et al. Reciprocal interaction between pericytes and macrophage in poststroke tissue repair and functional recovery. *Stroke* 2020; 51: 3095-3106.
4. Yamanaka K, Ago T, et al. Deletion of Nox4 enhances remyelination following cuprizone-induced demyelination by increasing phagocytic capacity of microglia and macrophages in mice. *Glia* 2023; 71: 541-559.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 0件）

1. 著者名 吾郷哲朗	4. 巻 80(増刊号1)
2. 論文標題 脳微小循環とNeurovascular Unit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 118-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 吾郷哲朗	4. 巻 80(増刊号2)
2. 論文標題 脳虚血病態におけるペリサイト機能の重要性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 644-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 吾郷哲朗	4. 巻 280
2. 論文標題 Neurovascular unit - 脳梗塞発症から機能回復まで	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1020-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kiyohara Takuya, Matsuo R, Hata J, Nakamura K, Wakisaka Y, Kamouchi M, Kitazono T, Ago T.	4. 巻 52
2. 論文標題 -Cell Function and Clinical Outcome in Nondiabetic Patients With Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 2621 ~ 2628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.120.031392	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 Shibahara Tomoya, Ago Tetsuro, Tachibana Masaki, Nakamura Kuniyuki, Yamanaka Kei, Kuroda Junya, Wakisaka Yoshinobu, Kitazono Takanari	4. 巻 51
2. 論文標題 Reciprocal Interaction Between Pericytes and Macrophage in Poststroke Tissue Repair and Functional Recovery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 3095 ~ 3106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.120.029827	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 Takashima Masamitsu, Nakamura Kuniyuki, Kiyohara Takuya, Wakisaka Yoshinobu, Hidaka Masaoki, Takaki Hayato, Yamanaka Kei, Shibahara Tomoya, Wakisaka Masanori, Ago Tetsuro, Kitazono Takanari	4. 巻 5
2. 論文標題 Low-dose sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor ameliorates ischemic brain injury in mice through pericyte protection without glucose-lowering effects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03605-4	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 Shibahara Tomoya, Nakamura Kuniyuki, Wakisaka Yoshinobu, Shijo Masahiro, Yamanaka Kei, Takashima Masamitsu, Takaki Hayato, Hidaka Masaoki, Kitazono Takanari, Ago Tetsuro	4. 巻 43
2. 論文標題 PDGFR -positive cell-mediated post-stroke remodeling of fibronectin and laminin 2 for tissue repair and functional recovery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 518 ~ 530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221145092	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 Yamanaka Kei, Nakamura Kuniyuki, Shibahara Tomoya, Takashima Masamitsu, Takaki Hayato, Hidaka Masaoki, Komori Motohiro, Yoshikawa Yoji, Wakisaka Yoshinobu, Ago Tetsuro, Kitazono Takanari	4. 巻 71
2. 論文標題 Deletion of Nox4 enhances remyelination following cuprizone induced demyelination by increasing phagocytic capacity of microglia and macrophages in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 541 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24292	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 日高壮意, 吾郷哲朗	4. 巻 40
2. 論文標題 単なる壁細胞ではない 脳機能遂行の鍵を握るペリサイト	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1522 ~ 1525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吾郷哲朗
2. 発表標題 脳虚血病態における細胞間連関と臓器連関- 新たな治療標的は何か? -
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吾郷哲朗
2. 発表標題 脳血管障害ハイリスク患者再発予防のキモ .
3. 学会等名 第43回日本高血圧学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ago Tetsuro
2. 発表標題 Reciprocal Interaction Between Pericytes and Macrophage in Poststroke Tissue Repair and Functional Recovery
3. 学会等名 International Stroke Conference 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木勇人, 吾郷哲朗, 日高壮意, 高島正光, 中村晋之, 脇坂義信, 北園孝成
2. 発表標題 脳虚血再灌流病態におけるペリサイトのFerroptosisに関する検討
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吾郷哲朗
2. 発表標題 「脳虚血におけるペリサイトの役割」
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木勇人, 吾郷哲朗, 吉野文隆, 日高壮意, 清原卓也, 中村晋之, 脇坂義信, 北園孝成
2. 発表標題 脳虚血再灌流病態におけるペリサイトのFerroptosisに関する検討
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ago Tetsuro
2. 発表標題 Roles of Pericyte in brain health and cerebrovascular diseases.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会. (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吾郷哲朗, 中村晋之, 清原卓也, 脇坂義信, 北園孝成
2. 発表標題 「どうすれば脳梗塞後機能回復を向上させることができるか？」
3. 学会等名 第48回日本脳卒中学会学術総会. (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学第二内科 脳循環代謝研究室
<https://www.intmed2.med.kyushu-u.ac.jp/stroke/>

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
研究分担者	中村 晋之 (Nakamura Kuniyuki) (80713742)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

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
---------	---------