

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590244

研究課題名（和文）血管内皮細胞に発現したウロキナーゼレセプターの脳梗塞増悪メカニズムの解明

研究課題名（英文）Roles of urokinase plasminogen activator receptor expressed in endothelial cells on deterioration of ischemic stroke

研究代表者

永井信夫（NAGAI NOBUO）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90260281

研究成果の概要（和文）：

本研究では、uPAR 欠損マウスでの脳梗塞に伴う血管透過性亢進の抑制を認め、uPAR が血管透過性の亢進を介して脳梗塞の増悪をきたす可能性を示唆した。さらに、脳傷害に伴う血管透過性の亢進メカニズムとして、脳傷害直後に誘導される傷害周囲部での血管透過性亢進は既存の脳血管の透過性亢進に起因するが、傷害後1週間後に認められる傷害内部の血管透過性亢進は傷害内部にアストロサイトと接していない血管の新生に起因することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the present study we observed that mice with gene deficient of uPAR had lower blood-brain barrier (BBB) permeability increase after ischemic stroke than their wild type control, suggesting that uPAR deteriorates ischemic brain damage via increase in BBB permeability. In addition, as mechanisms, we found that the increase in the BBB permeability just after ischemic damage was associated with the increase in the permeability of preexisting vessels but the increase in the permeability observed inside of damage at 1 week was associated with newly generated vessels which did not interact with astrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：病態生理

1. 研究開始当初の背景

我々は、マウス中大脳動脈閉塞モデルにてウロキナーゼレセプター（uPAR）の遺伝子欠損(KO)マウスでは野生型対照（WT）マウスに比べて脳梗塞が縮小すること、uPARの結合因子であるuPAの遺伝子欠損マウスではWTの間に脳構想の大きさの差が認められないこと、

さらに脳梗塞に伴い脳梗塞周囲部に局在する血管内皮細胞でuPARの発現が亢進することを明らかにし、uPARはuPAを介さずに血管機能への影響を介して脳梗塞を増悪することを示唆した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では脳梗塞増悪におけるuPARの寄与のメカニズムの解明を目的に研究を開始した。これまでに、脳虚血増悪に対する血管の影響として、脳傷害周囲部での血管透過性の亢進が脳梗塞を増悪する可能性が報告されていたことから、脳梗塞後の血管透過性に対するuPARの寄与を検討した。

(2) 本課題の初期の研究により、uPARが血管透過性の亢進を介して脳梗塞を増悪する可能性が認められた。しかしながら、脳梗塞後の傷害周囲での血管透過性の亢進のメカニズムについては不明な点が多かったため、脳梗塞に伴う血管透過性亢進のメカニズムの解明も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 中大脳動脈閉塞モデルを用いて uPAR KO マウスおよび対照野生型 (WT) マウスに脳梗塞を誘導後、血管内にトレーサー (エバンスブルーあるいはラット IgG) を投与し、その漏出量を指標に血管透過性亢進を定量的に検討した。

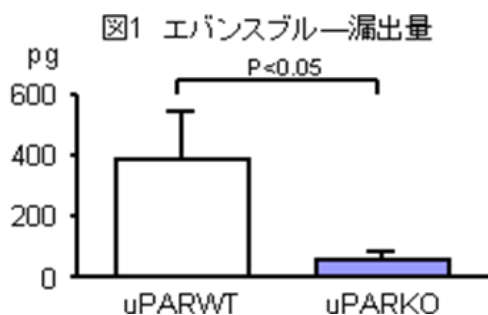
(2) 新たに確立した定量脳傷害モデルを用いて uPARKO マウスおよび WT マウスに脳梗塞を誘導し、慢性期の病態生理学的反応 (傷害部位の縮小) を組織学的手法により検討した。

(3) 上記の定量脳傷害モデルを用いて、マウス由来 ES 細胞の移植が脳梗塞の大きさと血管新生へ及ぼす影響を組織学的手法により検討した。

(4) 上記の定量脳傷害モデルを用いて、脳傷害後に認められる血管透過性の亢進の時間的・空間的差異と血管新生との関連を組織学的手法により検討した。

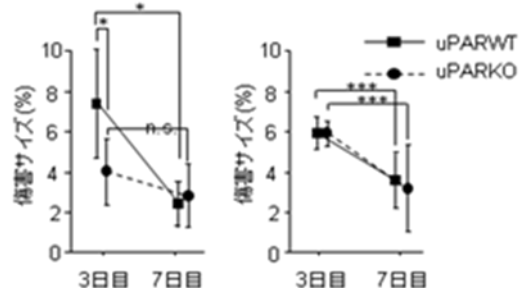
4. 研究成果

(1) uPARKO マウスと WT マウスを比較したところ、脳梗塞 24 時間後に認められる血管透過性の亢進が KO マウスで有意に抑制されていた (図 1)。このことから、uPAR は脳梗塞の急性期に認められる血管透過性亢進を促進し



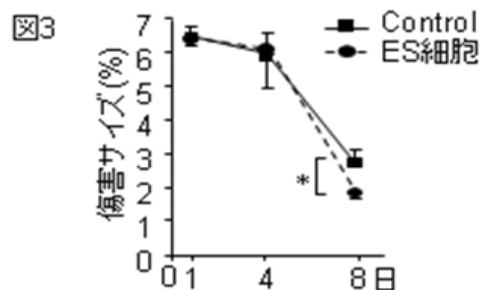
て脳梗塞を増悪する可能性が示唆された。
 (2) 中大脳動脈閉塞モデルと定量脳傷害モデルを用いて uPARKO マウスおよび WT マウスの傷害後の傷害組織の縮小を比較した。その結果、中大脳動脈閉塞モデルでは、傷害後 3 日目で KO マウスの脳梗塞が有意に小さかったものの傷害後 7 日までに認められる傷害組織の縮小が WT マウスに比べて緩慢であった。これに対して、定量脳傷害モデルでは傷害後 3 日目の傷害サイズは KO および WT マウスの傷害サイズは同等であり、傷害後 7 日目までの傷害の縮小も同等に認められた (図 2)。

図2 中大脳動脈閉塞モデル 定量脳傷害モデル



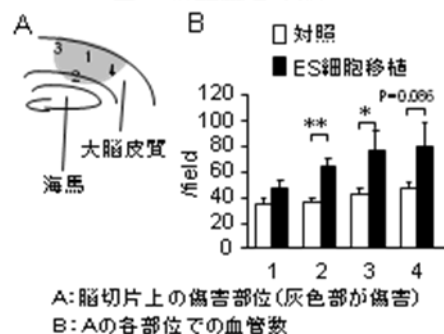
この結果より、中大脳動脈閉塞において認められた傷害縮小の差異は初期の脳梗塞の大きさの違いに起因し、uPAR 遺伝子欠損には起因しないことが明らかとなった。

(3) 1×10^6 個の ES 細胞を脳傷害誘導直後に静脈投与により移植したところ、傷害後 8 日目までの脳傷害の縮小は有意に促進された (図 3)。



この時、傷害周囲には宿主由来の新生血管の形成が有意に亢進していた (図 4)。

図4 新生血管の数



これらの結果より、ES 細胞は宿主の内因性

の血管新生を促進して、傷害の縮小を促進することが明らかとなった。

(4) 定量脳傷害モデルを用いて、脳傷害後の血管透過性の亢進と血管新生の関係を検討した。その結果、傷害1日後には新生血管の存在は認められなかったものの、静脈内投与したラット IgG の漏出が傷害周囲部に認められた。傷害7日後には新生血管は傷害内部および傷害周囲部に認められ、ラット IgG の漏出は傷害部位内部の新生血管周囲にのみ認められた。このことから、脳梗塞急性期の血管透過性亢進は既存の血管に起因するが、傷害後7日後の血管透過性の亢進は、新生血管に起因することが明らかとなった。また新生血管が存在するものの、透過性の亢進が認められなかった傷害周囲には活性型アストロサイトの集積が認められたことから、アストロサイトと相互作用する新生血管は透過性が亢進しない可能性が示唆された。

これらの結果を踏まえて、今後は uPAR 遺伝子の欠損が傷害後の血管新生に及ぼす影響の検討を行う予定である。

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3件)

- ① Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Ueshima S, Nagai N, Matsuo O. Spatiotemporal differences in vascular permeability after ischaemic brain damage. *Neuroreport*. 2011; 22: 424-7. 査読有
DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283462dd9
- ② Nagai N, Kawao N, Okada K, Okumoto K, Teramura T, Ueshima S, Uemura K, Matsuo O. Systemic transplantation of embryonic stem cells accelerates brain lesion decrease and angiogenesis. *Neuroreport*. 2010; 21: 575-9. 査読有
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32833a7d2c
- ③ Nagai N, Kawao N, Okada K, Ishida C, Okumoto K, Ueshima S, Suzuki Y, Uemura K, Matsuo O. Initial brain lesion size affects the extent of subsequent pathophysiological responses. *Brain Res*. 2010; 1322: 109-117. 査読有
DOI:10.1016/j.brainres.2010.01.077

[学会発表] (計6件)

- ① 永井信夫、矢野昌人、河尾直之、田村行識、岡田清孝、上嶋繁、鈴木康裕、梅村和夫、松尾理 虚血性脳傷害後に伴う血管透過性亢進の時間的および空間的な差異に関する

検討 第89回日本生理学会(2012年、松本)

- ② Nagai N, Suzuki Y, Uemura K, Lijnen HR. t-PA mediated brain injury: MMP-dependent and -independent mechanisms. 23rd Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis. (2011 Kyoto, Japan)
- ③ 永井信夫、河尾直之、寺村岳士、奥本勝美、福田寛二、鈴木康裕、梅村和夫、松尾理 胚性幹細胞の移植による血管の増加と脳傷害の縮小の促進 第84回日本生化学会大会(2011年、京都)
- ④ 永井信夫、河尾直之、岡田清孝、鈴木康裕、奥本勝美、梅村和夫、松尾理 傷害サイズがその後の病態生理学的プロセスに及ぼす影響 第88回日本生理学会(2011年、横浜)
- ⑤ Nagai N, Okada K, Kawao N, Ishida C, Ueshima S, Matsuo O. Roles of urokinase receptor (uPAR) on ischemic stroke. 20th International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis (Amsterdam, The Netherland, 2010)
- ⑥ 永井信夫、河尾直之、岡田清孝、上嶋繁、鈴木康裕、梅村和夫、松尾理 脳傷害の大きさが傷害後の病態生理的反応及ぼす影響 第10回日本抗加齢医学会(2010年、京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/guide/kyoin/detail/post-2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 信夫 (NAGAI NOBUO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90260281

(2) 研究分担者 (平成21年度のみ)

河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70388510

岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20185432

松尾 理 (MATSUO OSAMU)

近畿大学・医学部・名誉教授

研究者番号：40030879