

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06406

研究課題名（和文）脳梗塞病態における血管リモデリング機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of vascular remodeling after ischemic stroke

研究代表者

宝田 美佳（Takarada-Iemata, Mika）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40565412

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）：脳梗塞後には血液脳関門の破綻や血管新生などの血管リモデリングがおこるが、その制御メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、マウス脳梗塞モデルを用いて、血管に発現する受容体やストレス応答の可視化、遺伝子発現解析を組み合わせることで、脳梗塞後の時空間的な血管特性の変化や、虚血誘導性の新規細胞集団の出現を捉えた。また、特定のシグナル経路や細胞集団への介入により、脳梗塞後病態を制御できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害は、死亡、要介護の主要な原因の1つであり、この脳血管障害の大半が脳梗塞である。現状の脳梗塞の治療は、急性期に限られごく一部の患者にしか適用されておらず、新たな治療法の開発が待ち望まれている。本研究では、脳梗塞後の血管特性の変化、および脳梗塞病態を制御する分子機構の一端を明らかにすることができた。本研究が、脳梗塞の新たな治療戦略の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ischemic stroke triggers vascular remodeling, including blood-brain barrier breakdown and angiogenesis, but the regulatory mechanisms remain unclear. In this study, we revealed spatiotemporal changes in vascular properties and the emergence of novel ischemia-inducible cell population after stroke by gene expression analysis and visualization of vascular receptors and stress response in a mouse model of cerebral ischemia. The study also showed the potential to control stroke pathology by intervening in specific signaling pathways and cell populations.

研究分野：神経解剖学

キーワード：脳梗塞 血管 中大脳動脈閉塞 虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、日本人の死亡原因と重度要介護の原因の上位に位置している。脳卒中の大半をしめる脳梗塞は、高齢化社会において早急に新規治療法の開発が望まれる疾患の一つである。現在の脳梗塞治療は、薬理学的な血栓溶解、あるいは機械的血栓回収により血流を再開する治療法が用いられている。薬理学に唯一有効な tissue plasminogen activator (t-PA)による血栓溶解療法は、適用は発症後 4.5 時間以内の患者に限られており対象患者は少なく、また、亜急性期以降に有効な治療薬の開発には至っていない。

血液供給が途絶えた脳組織では、血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) の機能が障害され、血管透過性亢進による浮腫や、免疫細胞浸潤による二次的な神経障害に寄与し、予後悪化に深く関わっている。神経障害を緩和するためにはこの過程を抑制する必要があるが、BBB 破綻の過程で細胞外基質リモデリングを担う酵素群は発生やがん病態で血管新生に関わることが知られる。虚血周辺部の血管新生は、脳虚血後の神経障害の回復に関与することが報告されている。血管新生や BBB 機能変化といった血管のリモデリングは、共通するシグナル伝達によって駆動されることが知られており、適切な制御を欠けば症状の回復ではなく病態悪化をもたらす。脳梗塞の病態を適切に制御する治療戦略を開発するためには、未だ完全に理解されていない血管の制御メカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

血管のリモデリングは、血管内皮細胞、壁細胞、神経細胞、グリア細胞、免疫細胞などの多様な細胞の存在下で制御されると考えられ、これらの細胞間相互作用を考慮する必要がある。また、in vitro の解析ではすべての細胞種を包括できず、虚血中心部や虚血周辺部という空間的位置関係も失われてしまう。このため、in vivo の適切な脳梗塞モデルを用いて、脳虚血後の病態の時空間変化を捉えることが重要である。本研究の目的は血管リモデリングの制御機構と役割を明らかにすることである。以下 3 つの計画を実施することで、脳梗塞後の時期や部位に特徴的な血管の特性変化を探索し、脳梗塞病態の改善につながる分子機構の解明を目指す。

- (1) 脳梗塞後の血管特性の時空間的变化
- (2) 脳梗塞後の血管リモデリングの制御メカニズム
- (3) 血管リモデリングの機能的意義

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞後の血管特性の時空間的变化

本研究では、マウス脳梗塞モデルとして、中大脳動脈永久閉塞モデルを用いた。同モデルは顕微鏡下で開頭後に中大脳動脈遠位部を電気焼灼により永久閉塞させることで作製し、大脳皮質に限局した安定したサイズの梗塞巣を作ることが可能である。血管新生や BBB の破綻には、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) が関与する。主要な血管新生因子 VEGF-A の受容体の VEGFR2 (Flk1) を介して血管内皮の増殖・遊走が促進され、VEGFR1 (Flt1) は VEGF-A/VEGFR2 の制御系として寄与すると考えられている。脳梗塞モデルを作製し、VEGFR の発現の経時的変化を Western blot で解析するとともに、Flk1-GFP::Flt1-tDsRed BAC Tg マウス (Ishitobi et al, *Exp Anim* 2010) を用いて経時的、空間的な VEGF 受容体発現パターンを検討した。また、脳梗塞後には種々のストレスが誘導される。ストレス負荷細胞と梗塞巣の空間的位置関係を明らかにするために、小胞体ストレスを可視化できる ERAI マウス (Iwawaki et al, *Nat Med* 2004) を用いて同様の解析を行った。

(2) 脳梗塞後の血管リモデリングの制御メカニズム

研究代表者は、脳梗塞後の BBB 機能破綻がアストロサイトにより制御されることを報告した (Takarada-Iemata et al, *Glia* 2018)。このメカニズムとして、N-myc downstream-regulated gene 2 を介した Matrix metalloproteinases の発現制御を見出した。これらの酵素群は細胞外基質リモデリングを担い、血管新生などへの寄与が報告されている。このことから、脳虚血後の亜急性期の血管変化もアストロサイトにより制御されるのではないかと着想し、アストロサイトのストレス応答因子の欠損マウスと Flk1-GFP マウスを交配し解析を行った。また、脳虚血による種々の細胞の特性変化と、細胞間の相互作用を明らかにする目的で、FACS で虚血脳より細胞を分取し、1 細胞レベルの遺伝子プロファイル解析を行った。

(3) 血管リモデリングの機能的意義

血管のリモデリングに関わる遺伝子の flox マウスを、血管内皮やアストロサイト、線維芽細胞を標的できる薬剤誘導性 Cre ドライバーマウス (Cdh5-CreERT2, Aldh111-CreERT2, Col1a2-CreERT) と交配し Tamoxifen 誘導性に細胞特異的な conditional knockout (cKO) マウスを作製した。また、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターを用いて Cre を脳の特定部位に発現させ、部位特異的な cKO を作製した。これらのマウスを用いて、組織学的解析、遺伝子発現解析、神経症状の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞後の血管特性の時空間的变化

これまで、一過性脳虚血モデルや白質梗塞モデルにおいて血管新生と VEGFR2 の関与が示唆されている。本研究では、中大脳動脈永久閉塞(permanent middle cerebral artery occlusion: pMCAO)モデルを作製し、VEGF 受容体発現の時空間変化を解析した。Western blot 解析の結果、VEGFR2 は梗塞周辺部を含む非虚血領域や対側皮質領域に比べて、梗塞領域において高発現し、亜急性期にかけて経時的な発現増加を示した。Flk1-GFP::Flt1-tDsRed BAC Tg マウスを用いて組織学的解析を行った結果、Flt1-tDsRed シグナルは脳全体の血管に認められた一方、Flk1-GFP シグナルは同側非虚血領域や対側皮質領域と比較して梗塞領域において高く発現していた(図1)。また、脳虚血後の早期には Flk1-GFP 陽性細胞は滑らかな管状の形態を保っていたが、亜急性期にはそれらに加えて長い突起を持った管状構造から離れた細胞が観察された。組織学的解析だけでなく、Flow cytometry でも、Flk1-GFP 陽性であり、対側皮質や虚血早期には認められない細胞集団が存在することが確認された。これらのことから、虚血誘導性の新規細胞集団が虚血中心部に出現することが示唆された。

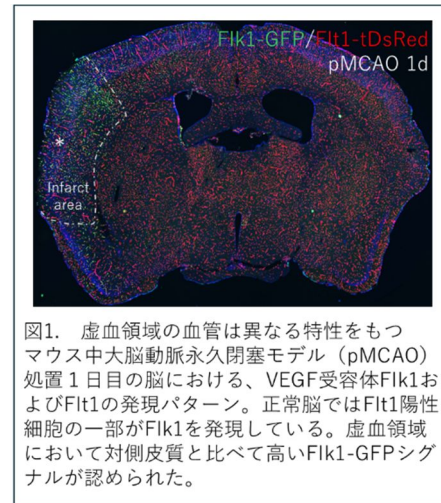


図1. 虚血領域の血管は異なる特性をもつマウス中大脳動脈永久閉塞モデル(pMCAO)処置1日目の脳における、VEGF受容体Flk1およびFlt1の発現パターン。正常脳ではFlt1陽性細胞の一部がFlk1を発現している。虚血領域において対側皮質と比べて高いFlk1-GFPシグナルが認められた。

脳虚血後には種々のストレスが惹起されることが知られるが、その空間的な位置情報については明らかになっていない。そこで ERAI マウスを用いて pMCAO 後の小胞体ストレス応答の分布を検証した。その結果、虚血周囲部遠位では神経細胞に、虚血周辺の境界領域ではアストロサイトに、虚血中心の梗塞巣では血管内皮細胞に ERAI シグナルが誘導されることを見出した(図2, Fan et al, *Glia* 2023)。血管内皮細胞について、虚血周囲部や境界部では ERAI シグナルは認められず、梗塞領域の血管の一部にのみ ERAI シグナルが観察され、この誘導は亜急性期には減弱した。血管内皮細胞を含む複数の細胞種の小胞体ストレス応答の誘導時期と、ストレス負荷の細胞毎の異質性が示唆された。

(2) 脳梗塞後の血管リモデリングの制御メカニズム

上記で観察された、脳梗塞亜急性期の血管特性の変化の制御メカニズムを検証した。アストロサイトのストレス応答因子の欠損マウスでは、梗塞領域における Flk1-GFP シグナルの増強と、陽性細胞の増加が観察された。これらの結果から、梗塞領域における亜急性期の血管リモデリングはアストロサイトにより制御される可能性が示唆された。

また、脳虚血による種々の細胞の特性変化と、細胞間の相互作用を明らかにする目的で、1細胞レベルでの解析を試みた。まず虚血脳から細胞を分散する酵素処理条件を検討し、FACS で目的細胞を分取できる条件を確立した。複数の細胞種を分取し、バルクの qPCR により確かに目的細胞マーカーを発現することを確認した。この条件を用いて正常脳組織と虚血脳組織から FACS で細胞を単離し、cDNA ライブラリを作製し single cell RNA-sequence 解析を行った。虚血による細胞クラスター分布の変化と各細胞集団に特徴的な遺伝子発現プロファイルデータが得られた。

(3) 血管リモデリングの機能的意義

血管リモデリングに関わる遺伝子について細胞特異的な cKO マウスや、時期・部位特異的な cKO マウスを作製し、同遺伝子の機能欠損による脳梗塞病態の表現型を解析した。組織学的解析および遺伝子発現解析から、一部の cKO マウスでは梗塞サイズの拡大や免疫細胞の浸潤亢進を示唆する結果が得られた。Foot fault test を用いて運動機能障害の回復への影響についても解析を進めている。これらの結果から、特定のシグナル経路や特定細胞への介入により、脳梗塞の病態を制御できる可能性が示唆された。

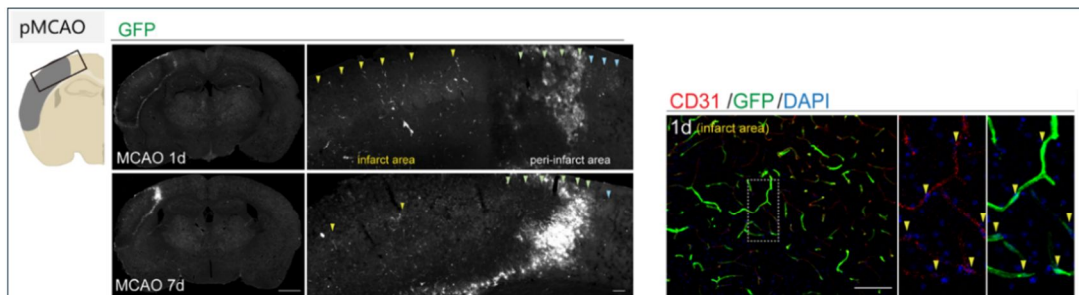


図2. 脳虚血後の血管に誘導されるストレス応答
マウス中大脳動脈永久閉塞モデル(pMCAO)における小胞体ストレス応答の活性化を ERAI マウスを用いて可視化した。神経細胞(青矢頭)は虚血周囲部遠位で、アストロサイト(緑矢頭)は虚血境界で、血管内皮細胞(黄色矢頭)は梗塞領域で ERAI シグナルが認められる。梗塞領域内の血管内皮細胞において、小胞体ストレス応答の活性化は不均一に誘導される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hattori Tsuyoshi, Cherepanov Stanislav M, Sakaga Ryo, Roboon Jureepon, Nguyen Dinh Thi, Ishii Hiroshi, Takarada Iemata Mika, Nishiuchi Takumi, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Yamamoto Yasuhiko, Okamoto Hiroshi, Sugawara Akira, Higashida Haruhiro, Hori Osamu	4. 巻 42
2. 論文標題 Postnatal expression of CD38 in astrocytes regulates synapse formation and adult social memory	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e111247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111247	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 Melnikova Anastasiia, Ishii Hiroshi, Tamatani Takashi, Hattori Tsuyoshi, Takarada-Iemata Mika, Hori Osamu	4. 巻 195
2. 論文標題 Neuroprotective role of calreticulin after spinal cord injury in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 29 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.05.005	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 Fan Qiyan, Takarada Iemata Mika, Okitani Nahoko, Tamatani Takashi, Ishii Hiroshi, Hattori Tsuyoshi, Kiryu Seo Sumiko, Kiyama Hiroshi, Hori Osamu	4. 巻 71
2. 論文標題 Brain injury triggers cell type specific and time dependent endoplasmic reticulum stress responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 667 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24303	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 Takashi, Nguyen Dinh Thi, Kwankaew Nichakarn, Sumizono Megumi, Shinoda Reika, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Hattori Tsuyoshi, Oyadomari Seiichi, Kato Nobuo, Mori Kazutoshi, Hori Osamu	4. 巻 48
2. 論文標題 ATF6 Deficiency Elicits Anxiety-like Behavior and Hyperactivity Under Stress Conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2175-2186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-023-03900-4	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 Munehiro Demura, Hiroshi Ishii, Mika Takarada-Iemata, Tomoya Kamide, Akifumi Yoshikawa, Mitsutoshi Nakada, Osamu Hori	4. 巻 54
2. 論文標題 Sympathetic Nervous Hyperactivity Impairs Microcirculation Leading to Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 1645-1655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.123.042799	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 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Nguyen Dinh Thi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Maejima Takashi, Saito Kengo, Shinmyo Yohei, Mieda Michihiro, Tajima Atsushi, Kawasaki Hiroshi, Hori Osamu	4. 巻 16
2. 論文標題 Isolation of ferret astrocytes reveals their morphological, transcriptional, and functional differences from mouse astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	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) 10.3389/fncel.2022.877131	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 該当する

1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Ishii Hiroshi, Takarada Iemata Mika, Nguyen Dinh Thi, Heer Collin D., O'Meally Denis, Brenner Charles, Yamamoto Yasuhiko, Okamoto Hiroshi, Higashida Haruhiro, Hori Osamu	4. 巻 158
2. 論文標題 Inhibition of CD38 and supplementation of nicotinamide riboside ameliorate lipopolysaccharide induced microglial and astrocytic neuroinflammation by increasing NAD+	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 311 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15367	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 該当する

1. 著者名 Nguyen Dinh Thi, Le Thuong Manh, Hattori Tsuyoshi, Takarada-Iemata Mika, Ishii Hiroshi, Roboon Jureepon, Tamatani Takashi, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Taniuchi Shusuke, Miyake Masato, Oyadomari Seiichi, Tanaka Takashi, Kato Nobuo, Saito Shunsuke, Mori Kazutoshi, Hori Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 The ATF6 -calreticulin axis promotes neuronal survival under endoplasmic reticulum stress and excitotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92529-w	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 Takarada-Iemata Mika, Hori Osamu	4. 巻 156
2. 論文標題 Astrocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 230 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.21030	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宝田 美佳、堀 修
2. 発表標題 神経傷害が誘導する小胞体ストレス応答とグリア細胞活性化
3. 学会等名 第53回 日本神経精神薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Qiyang Fan, Nahoko Okitani, Osamu Hori
2. 発表標題 Brain injury triggers cell-type-specific and time-dependent endoplasmic reticulum stress responses
3. 学会等名 第66回 日本神経化学学会大会 第64回 日本神経病理学会総会学術研究会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Qiyang Fan, Nahoko Okitani, Osamu Hori
2. 発表標題 Cell type-specific spatiotemporal induction of endoplasmic reticulum stress responses after acute brain injury.
3. 学会等名 THE 50th Naito Conference on Glia World - Glial Cells Governing Brain Functions (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Osamu Hori
2. 発表標題 Glial endoplasmic stress response in CNS pathologies
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mika Takarada-Iemata, Osamu Hori
2. 発表標題 The role of vascular response in tissue remodeling after brain ischemia
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takarada-Iemata M., Okitani N., Koriyama Y., Hori O.
2. 発表標題 Endoplasmic reticulum stress response of glial cells contributes to neuronal survival after optic nerve injury
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takarada-Iemata M., Quiyan Fan, Osamu Hori
2. 発表標題 脳損傷後の小胞体ストレス応答細胞の変遷
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fan Q., Takarada-Iemata M., Hori O
2. 発表標題 Brain damage triggers endoplasmic reticulum stress response in various cells over different time courses
3. 学会等名 第81回 日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takarada-Iemata M., Hori O
2. 発表標題 Cerebrovascular response and regulation in the ischemic brain
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021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
---------	---------