

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500411

研究課題名(和文)脳室周囲器官における血管新生の意義

研究課題名(英文)Functional significance of angiogenesis in the circumventricular organs

研究代表者

宮田 清司(Miyata, Seiji)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・准教授

研究者番号：30243124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳室周囲器官は、一般的な脳の血管系と異なり内皮細胞のタイトジャンクションを欠くので血液脳関門が存在せず、高い血管透過性がある。本研究においては、血液脳関門を欠く理由が、血管新生や神経新生による血管系と周囲実質組織の未熟性に起因しているが明らかになった。また、血液脳関門に代わりうるバリアーとして血管基底膜やGFAP陽性神経幹細胞が働いていることも分かった。血液由来分子の受容機構としてTRPV1やTLR4が、GFAP陽性神経幹細胞に発現し、情報を神経細胞へ伝えていることも判明した。以上、脳室周囲器官は血管や神経新生を活発に行っているダイナミックな脳部位であることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The circumventricular organs (CVOs) do not express tight junction proteins and hence lack blood-brain barrier (BBB) and possess high vascular permeability. The present study demonstrates the presence of continuous angiogenesis and neurogenesis in the CVOs of adult mice. Continuous angiogenesis and neurogenesis contributes to tissue reconstruction and plasticity. Moreover, the basement membrane and GFAP-positive neural stem cells function as barrier instead of usual BBB. GFAP-positive neural stem cells detect blood-derived information via sensory protein TRPV1 and TLR4 and thereafter send information to adjacent neurons. Thus, the CVOs the dynamic brain regions accompanied with angiogenesis and neurogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：血管新生 神経幹細胞 血液脳関門 血管透過性 血管基底膜 タイトジャンクション TRPV1 TLR4

1. 研究開始当初の背景

脳室周囲器官は、一般的な脳の血管系と異なり、内皮細胞のタイトジャンクションを欠くので血液脳関門が存在せず、脳実質と血管間の分子移動が可能である。脳室周囲器官は、血液脳関門を欠く特殊性から主に次の機能を持っている。1) **感知系脳室周囲器官**(終板器官、脳弓下器官、最後野): 血管透過性が高いので容易に、血液中の浸透圧、イオン、毒物、サイトカイン、細菌構成成分(LPS)を検知できる。検知された情報は、他の脳部位へ伝えられることで、発熱、悪心・嘔吐を誘起するとともに、浸透圧調節・飲水行動・ペプチドホルモン分泌などを制御している。2) **分泌系脳室周囲器官**(正中隆起・下垂体後葉): 正中隆起や下垂体後葉では、それぞれ前葉ホルモン分泌刺激因子や下垂体後葉ホルモンをペプチド性神経から血液中に直接放出する。このように、脳室周囲器官は、血液由来の末梢情報を感知するだけでなく、末梢への指令分子として血液中へペプチドホルモンを分泌し、血液脳関門を欠くというリスクを持ちながらも、血管の高い透過性を維持している。しかし、なぜ血液脳関門を欠くのかなど、脳室周囲器官の血管系を中心とした研究はほとんど進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

脳の血管系は、血液のイオン・ホルモン・アミノ酸などが透過して神経細胞などに影響を及ぼさないように、血液脳関門という特殊なバリアー機構を有している。一方、脳の中でも脳室周囲器官では、タイトジャンクションが存在せず血液脳関門がない。脳室周囲器官は、血液中の分子情報を認識する感知系(終板器官、脳弓下器官、最後野)と血中へのペプチド分泌を担う分泌系(正中隆起、下垂体後葉)に分類される。今まで、脳室周囲器官は抹消組織と同じく単にタイトジャンクションを欠くだけの部位であると考えら

れてきた。しかし、本研究においては、脳室周囲器官で血液脳関門を欠く理由が、血管新生など血管や実質組織の可塑性に起因していることを証明するのが目的である。

3. 研究の方法

実験材料:

成体マウス

実験方法:

(ア) 免疫組織化学

(イ) 電子顕微鏡

(ウ) 低分子型蛍光トレーサー

(エ) ウェスタンブロッティング

(オ) RT-PCR

4. 研究成果

血管新生

感知系脳室周囲器官である終板器官、脳弓下器官および最後野において、チミジンアナログである BrdU の取り込みが血管内皮細胞に観察された。また、Ki-67 発現が血管内皮細胞(Stalk cell)の核に認められた。さらに、既存血管から新規な血管が伸長している Tip cell も観察された。血管内皮細胞の周囲に存在するペリサイトは、NG2 プロテオグリカンや血小板由来成長因子を、神経やアストロサイトは血管内皮細胞増殖因子を高レベルで発現していた。これらの因子は、血管新生と関連するものである。以上の結果より、感知系脳室周囲器官では成体にもかかわらず新規な血管を形成していることが明らかになった(Morita et al. 2013, 2014; Furube et al. 2015)。

感知系脳室周囲器官と同様に分泌系脳室周囲器官である正中隆起および下垂体後葉においても、血管新生の有無を調べたところ感知系とほぼ同じ現象が観察された。よって、感知系だけでなく脳室周囲器官すべての5部位で共通して血管新生が生じていることが証明された(Morita et al. 2012; Furube et al. 2014)。

脳室周囲器官における血管新生の制御因子として血管内皮細胞増殖因子に着目して

さらに検討を行った。その結果、血管内皮細胞増殖因子受容体シグナル阻害剤 AZD2171 は、血管内皮細胞の増殖を顕著に阻害したが、阻害を中止すると顕著な増殖が観察された。また、AZD2171 投与により血管密度の顕著な減少が認められた。このことより、脳室周囲器官における血管新生は、血管内皮細胞増殖因子を介したシグナル伝達機構に強く依存していることが示唆された (Morita et al. 2012, 2014; Furube et al. 2014)。

血管透過性

感知系および分泌系脳室周囲器官における血管透過性について蛍光トレーサーを用いて調べた。低分子量トレーサーとして、エバンスブルー及びFluorescein isothiocyanate (FITC)を用いた。また、高分子量トレーサーとして、FITC 標識されたデキストランや牛血清アルブミンを用いた。その結果、従来、脳室周囲器官には血液脳関門が存在しないので自由に分子の移動があると考えられてきたが、分子量依存的な制限的血管透過性があることが明らかになった。さらに、分泌系脳室周囲器官は視床下部ペプチドを分泌するために高い低分子分子の血管透過性があるのに対し、感知系脳室周囲器官では血管透過性が極めて低いことが明らかになった (Morita et al. 2013, 2015; Morita and Miyata, 2012)。

脳室周囲器官には血液脳関門が存在しないのになぜ、制限的血管透過性があるのか？また、血液由来の神経毒性がある分子がなぜ神経細胞死を誘起しないのか？これらの問題を解決するために、血液脳関門に代わり得るバリアーの存在を調べた。まず、脳室周囲器官の血管は、他の脳部位の血管と異なり内皮細胞の内側基底膜と実質側に存在する外側基底膜が顕著に離れており、広いスペースがあることがわかった。高分子量トレーサーは内側基底膜を透過するが、外側基底膜は透過できないが、内側基底膜にはコラゲン IV

外側基底膜にはラミニンが多く存在し、基底膜の種類が高分子トレーサーの透過性を制限していることが示唆された。さらに、外側基底膜を透過した低分子トレーサーは、実質に侵入しても、多くは密な GFAP 陽性のアストロサイト陽神経幹細胞でとどまること、また神経細胞周辺にはこれらの細胞突起が取り巻き保護作用を持っていると推測された。以上の結果は、脳室周囲器官では内皮細胞にあるタイトジャンクションに代わり、基底膜の特殊性と密な GFAP 陽性神経幹細胞が血液脳関門に代替しうるバリアーであると考えられる (Morita et al. 2015)。

血液由来分子の直接的受容

脳室周囲器官では、血液脳関門が存在しないので血管透過性があり、血液由来分子を直接的に感知することができる。しかし、そのメカニズムについてはほとんど不明である。TRPV1 は、温度、酸、機械/浸透圧などを受容するセンサー分子である。TRPV1 は、GFAP 陽性の神経幹細胞や神経の細胞質突起に特異的に存在するが、細胞体には存在していなかった。また、TRPV1 agonist の抹消ならびに中枢投与は、GFAP 陽性の神経幹細胞特異的に Fos 発現を誘起した。しかし、TRPV1-KO マウスではそのような変化は認められなかった (Mannari et al. 2013)。

TLR4 は、細菌細胞壁の構成成分である LPS の受容体である。TLR4 は、TRPV1 と同様に GFAP 陽性の神経幹細胞特異的に発現していることが明らかになった (Nakano et al. 2015)。以上の結果は、脳室周囲器官では、血液由来分子の神経毒性を回避するために、GFAP 陽性の神経幹細胞が、センサー分子である TRPV1 や TLR4 を発現し直接的に血液由来分子を感知し、その後情報を神経へ伝えていると考えられる。

神経幹細胞細胞

脳室周囲器官には、神経幹細胞が存在していることが報告されているが、その報告は極

めて少ない。我々は、BrdU で標識した神経幹細胞を追跡し成熟した神経細胞へ分化していることを明らかにした。また、神経前駆細胞は、血管周辺に局在し細胞外マトリクス分解酵素の Plasminogen を発現していることが多かった(Hourai and Miyata 2013)。

脳室周囲器官の神経幹細胞の特徴を詳細に調べた。神経幹細胞には、タニサイト様とアストログリア様の2種類が存在していた。また、神経幹細胞は海馬や側脳下帯とほぼ同じマーカータンパク質を発現していたが、普通成熟アストロサイトにのみ発現があるS100Bを発現していた。神経幹細胞の多くはオリゴデンドロサイト前駆細胞に分化し、一部は神経やアストロサイトへ分化していた。さらに、脳室周囲器官だけでなく周辺の脳部位へも細胞を供給していることが明らかになった(Furube et al. 2015)。

以上の結果は、脳室周囲器官が血管新生だけでなく、神経やグリアなどの新しい実質細胞も供給していることがわかり、著しい組織再構築が起きている極めてダイナミックな脳部位であることが明らかになった。

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 22 件)

Nakano, Y, Furube, E, Morita, S, Wanaka, A, Nakashima, T, Miyata, S (2015) Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Journal of Neuroimmunology 278, 144-158. (査読あり)

Morita, S, Furube, E, Mannari, T, Okuda, H, Tatsumi, K, Wanaka, A, Miyata, S (2015) Vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis and dynamic vascular plasticity in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Cell and Tissue Research 359, 865-884. (査読あり)

Fukushima, S, Furube, E, Itoh, M., Nakashima, T, Miyata, S (2015) Robust increase of microglia proliferation in the fornix of hippocampal axonal pathway after a single LPS stimulation.

Journal of Neuroimmunology 285, 31-46. (査読あり)

Furube, E, Morita, M., Miyata, S (2015) Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse.

Cell and Tissue Research (in press)

doi: 10.1007/s00441-015-2201-0

Morita, S, Furube, E, Mannari, T, Okuda, H, Tatsumi, K, Wanaka, A, Miyata, S (2015) Heterogenous vascular permeability and alternative diffusion barrier in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Cell and Tissue Research (in press)

doi: 10.1007/s00441-015-2207-7(査読あり)

Taguchi, K, Watanabe, Y, Tsujimura, A, Tatebe, H, Miyata, S, Tokuda, T, Mizuno, T, Tanaka, M (2014) Different expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons.

PLoS One 9, e89327(査読あり)

Mannari, T, Miyata, S (2014)

Activity-dependent Notch signaling in the hypothalamo-neurohypophysial system of adult mouse brains.

Journal of Neuroendocrinology 26, 497-509. (査読あり)

Tho Huu, N, Yoshida, Umegawachi, T, Miyata, S, Yamaguchi, M (2014)

Structural characterization and subcellular localization of Drosophila organic solute carrier partner 1.

BMC Biochemistry 15, e11. (査読あり)

Mannari, T, Sawa, H, Furube, E, Fukushima, S, Nishikawa, K, Nakashima, T, Miyata, S (2014) Antidepressant-induced vascular dynamics in the hippocampus of adult mouse brain.

Cell and Tissue Research 358, 43-55. (査読あり)

Furube, E, Tetsuya, M, Morita, S, Nishikawa, K, Yoshida, A, Miyata, S (2014) VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice.

Journal of Endocrinology 221, 161-179. (査読あり)

- Morita, S, Miyata, S (2013) Synaptic localization of GAP-43 in cultured hippocampal neurons during synaptogenesis. *Cell Biochemistry and Function* 31, 400-411. (査読あり)
- Morita, S, Miyata, S (2013) Accessibility of low-molecular-mass molecules to the median eminence and arcuate hypothalamic nucleus of adult mouse. *Cell Biochemistry and Function* 31, 668-670. (査読あり)
- Hourai, A, Miyata S (2013) Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *Journal of Neuroscience Research* 91, 757-770. (査読あり)
- Mannari, T, Morita, S, Furube, E, Tominaga, M, Miyata, S (2013) Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. *Glia* 6, 957-971. (査読あり)
- Morita, S, Hourai, A, Miyata, S (2013) Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation. *Cell Biochemistry and Function* 3, 51-61. (査読あり)
- Eguchi, K, Yoshioka, Y, Yoshida, H, Morishita, K, Miyata, S, Hiai, H, Yamaguchi, M (2013) The drosophila DOCK family protein sponge is involved in differentiation of R7 photoreceptor cells. *Experimental Cell Research* 319, 2179-2195. (査読あり)
- Crevel, G, Vo, N, Crevel, I, Hamid, S, Hoa, L, Miyata, S, Cotterill, S (2013) Drosophila RecQ4 is directly involved in both DNA replication and the response to UV damage in S2 cells. *PLoS One* 7, e49505. (査読あり)
- Okada, K, Ueshima, S, Kawao, N, Yan, o M, Tamura, Y, Tanaka, M, Sakamoto, A, Hatano M, Arima M, Miyata, S, Nagai, N, Tokuhisa, T, Matsuo, O (2013) Lack of both α 2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Science* 93, 89-95.
- Morita, S, Ukai, S, Miyata, S (2013) VEGF-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mice. *European Journal of Neuroscience* 3, 508-518. (査読あり)
- Sugimoto, C, Morita, S, Miyata, S (2012) Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes. *Cell Biochemistry and Function* 3, 400-405. (査読あり)
- 21 Morita, S, Miyata, S (2012) Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell and Tissue Research* 34, 589-603. (査読あり)
- 22 Sogame Y, Kojima K, Takeshita T, Fujiwara S, Miyata, S, Kinoshita, E, Matsuoka, T. (2012) Protein phosphorylation in encystment-induced *Colpoda cucullus*: localization and identification of phosphoproteins. *FEMS Microbiol. Letters* 33, 128-135. (査読あり)
- [学会発表](計 17 件)
- 宮田清司、福島翔平、小野勝彦、竹林浩秀、中島敏博(2015)海馬神経繊維が走行する脳弓におけるオリゴデンドロジェネシス、第 120 回日本解剖学会総会(神戸国際会議場・神戸市・2015.3.21)
- 古部瑛莉子、萬成哲也、森田晶子、中島敏博、宮田清司 (2015) 血管新生による下垂体後葉血管ネットワーク構築変化の神経内分泌における意義、第 120 回日本解剖学会総会(神戸国際会議場・神戸市・2015.3.21)
- 古部瑛莉子、萬成哲也、森田晶子、宮田清司 (2014) VEGF と PDGF に依存した下垂体後葉の血管新生と終末血管ダイナミックス、第 41 回日本神経内分泌学会学術集会(都道府県会館・東京都・2014.10.31)
- 古部瑛莉子、森田光博、宮田清司 (2014)LPS 刺激による脳室周囲器官神経幹細胞とミクログリアの増殖変化、第 37 回日本神経科学大会(パシフィコ横浜・横浜・2014.9.11)
- 西川和範、宮田清司 (2014)PDF シグナルによる血管系のペリサイトと神経分泌制御、第 37 回日本神経科学大会(パシフィコ横浜・横浜・2014.9.11)
- 古部瑛莉子、萬成哲也、森田晶子、宮田清司 (2014) 成体マウスの下垂体後葉における血管新生、第 90 回日本解剖学会近畿支部学術集会(大阪大学・大阪市・2014.11.29)
- 萬成哲也、森田晶子、富永真琴、宮田清司(2013) 脳室周囲器官のアストロサイ

トによる血液情報感知機構、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

福島翔平、西川和範、小野勝彦、竹林浩秀、宮田清司(2013)成体マウス脳弓におけるオリゴデンドロジェネシス；海馬神経交連・投射繊維のミエリン化、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

鶴飼真璃、森田晶子、宮田清司(2013)成体マウスの脳室周囲器官における血管新生因子 VEGF と Notch シグナリング、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

森田晶子、鶴飼真璃、奥田洋明、辰巳晃子、和中明生、宮田清司(2013) 感知系脳室周囲器官のダイナミックな血管構造変化とアストロサイトバリア：血中情報感知システムにおける役割、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

中野洋輔、宮田清司 (2013) Lipopolysaccharide 刺激による脳室周囲器官の astrocyte 活性化、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

宮田清司、森田晶子(2013) 神経分泌における血管系ダイナミックスの意義、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

古部瑛莉子、蓬萊敦、宮田清司 (2013) 成体マウスの脳室周囲器官における神経幹前駆細胞、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

澤速人、萬成哲也、宮田清司(2013)成体マウス海馬における血管新生、第 36 回日本神経科学大会（国立京都国際会館・京都市・2013.6.20）

中野洋輔、宮田清司(2013) LPS 刺激による脳室周囲器官アストロサイトの STAT3 核内移行、第 89 回日本解剖学会近畿支部学術集会（奈良先端科学技術大学院大学・生駒市・2013.11.30）

福島翔平、宮田清司(2013) 成体マウスの脳弓におけるオリゴデンドロジェネシス、第 89 回日本解剖学会近畿支部学術集会（奈良先端科学技術大学院大学・生駒市・2013.11.30）

萬成哲也、宮田清司(2013) 脳室周囲器官におけるアストロサイト TRPV1 を介した血液由来情報の受容機構、第 89 回日本解剖学会近畿支部学術集会（奈良先端科学技術大学院大学・生駒市・2013.11.30）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 清司 (MIYATA, Seiji)

京都工芸繊維大学大学院・工学科学研究科・応用生物学系・准教授

研究者番号：30243124

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：