

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791507

研究課題名(和文) 脳梗塞巣辺縁部に存在するNG2陽性マイクログリアの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF-beta1

研究代表者

杉本 香奈 (SUGIMOTO, KANA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00581034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、虚血病巣の周辺領域にNG2陽性マイクログリアの存在を明らかにした。この細胞は、内在性マクローファージ由来であり、梗塞巣に集積する骨髄由来のNG2陽性細胞とは異なっていた。貪食細胞のマーカーであるCD68やTREM-2を発現しており、実際に神経細胞片を細胞内に取り込んでいる像が観察された。梗塞巣で発現量が多いTGF-beta1をマイクログリアに添加すると、NG2タンパクやTREM-2 mRNAの発現量を増加させ、更に遊走能を亢進させた。従ってNG2がマイクログリアによる貪食作用のいずれかのプロセスに関与し、NG2発現誘導因子としてTGF-beta1が関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated activated microglia in ischemic brain lesions. Activated microglia expressing NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) were found only in the narrow zone (demarcation zone) that demarcated the peri-infarct tissue and ischemic core. NG2(+) microglia expressed both CD68 and a TREM-2, suggesting that NG2(+) microglia eliminated apoptotic neurons. In fact, NG2(+) microglia often attached to degenerating neurons and sometimes internalized NeuN(+) or neurofilament protein(+) material. Kinetic studies revealed that expression of transforming growth factor (TGF)-beta1 was most evident in the ischemic core. In response to TGF-beta1, primary microglia enhanced the expression of NG2 protein and TREM-2 mRNA as well as migratory activity. A TGF-beta1 inhibitor, SB525334, abolished these effects. The present results suggest that TGF-beta1 produced in the ischemic core diffused toward the peri-infarct tissue, driving activated microglial cells to eliminate degenerating neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞 NG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカン マイクログリア TGF- 1

1. 研究開始当初の背景

ラット一過性中大脳動脈閉塞による脳梗塞巣核心部には、Iba1 と NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2)の両方を発現する BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells)が多数集積する。BINCs は単球由来のマクロファージであり、Iba1 はマクロファージのマーカーである。BINCs は、IGF-1 や HGF 等の神経保護的ペプチドの発現レベルが高く、実際に重症ラット脳梗塞モデルの病巣に BINCs を移植すると予後が大きく改善することが分かってきた。

正常脳において、NG2 は NG2 グリア (オリゴデンドロサイト前駆細胞) にのみ発現が認められ、このような二重陽性細胞は病的脳にしか存在しない。我々は、虚血病巣核心部を取り囲む周辺領域に、BINCs とは異なる NG2 陽性マイクログリアの存在を明らかにした。この細胞はペナンプラ領域の変性神経細胞を食食するが、その病態生理学的意義は不明である。

2. 研究の目的

脳梗塞巣辺縁部 (ペナンプラ) 領域の神経細胞の生存は、脳梗塞の予後と深く関連する。このペナンプラ領域に存在する NG2 陽性マイクログリアの役割について分子細胞生理学的な検討により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 一過性中大脳動脈閉塞術 (MCAO) と骨髄移植

動物実験は愛媛大学医学部動物実験のガイドラインに沿って実施した。8 週齢の雄 Wistar ラットの中大脳動脈を 90 分間遮断し、その後再灌流することにより、脳梗塞モデルラットを作成した。骨髄移植ラットは移植の 2 ヶ月後に閉塞術を施行した。

(2) 細胞培養

BINCs は MCAO 後 7 日目に梗塞巣から単離、マイクログリアは生後 1 日目の新生仔ラットの脳から単離し、培養した。

(3) 灌流固定と凍結切片

脳梗塞モデルラットの左心室から 4% パラフォルムアルデヒドを注入し、10 分間灌流した。その後、凍結切片を作成した。

(4) 蛍光免疫染色

一次抗体 (NG2, Iba1, CD68, TREM-2, NeuN) 反応後、二次抗体 (DyLight 488, DyLight 549, DyLight 649) を用いて染色した。その後、オールインワン蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(5) リアルタイム PCR

MCAO 後 1-14 日目に脳を摘出し、triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を用いて梗塞巣・梗塞巣周辺・反対側の正常領域を判別した。各領域を採取し、cDNA 合成を行った。その後、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現量を測定した。内在性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。

(6) Western blotting

5-12.5 % SDS-PAGE を用いてタンパクを分画し、PVDF メンブレンに転写した。Canget signal solution を用いて一次抗体、二次抗体を反応させた。その後、ImageJ 1.43u を用いて解析した。内在性コントロールとして β -actin を用いた。

(7) 免疫沈降

BINCs を 24 時間培養した液に抗 TGF- β 1 抗体と protein A/G agarose slurry を 4°C で一晩反応させた。その後、遠心し、上清を回収した。

(8) Wound healing assay

マイクログリアをカバースリップの上にコンフルエントになるように播いた。200- μ L ピペットチップを用い細胞を引っ掻き、TGF- β 1 を添加した。24 時間培養後に細胞を固定し、観察した。その後、ImageJ 1.43u を用いて遊走範囲を解析した。

(9) 統計処理

統計処理は InStat3 ソフトウェアを用いて、one-way analysis of variance (ANOVA) と Tukey's post hoc test で評価した。

4. 研究成果

(1) NG2 陽性マイクログリアの神経保護/神経傷害効果の検討

① NG2 陽性マイクログリアの出現分布

ラット一過性中大脳動脈閉塞後、7 日目に灌流固定し凍結切片を作成、蛍光免疫染色を行い、NG2 陽性マイクログリアの分布領域および形態を観察した。その結果、NG2 陽性マイクログリアは脳梗塞巣から 100 μ m の範囲内のペナンプラ領域にのみ存在していた。NG2 陽性マイクログリアは、大きな細胞体と短い突起を持つ活性化マイクログリアに似た形態を示していた (図 1)。

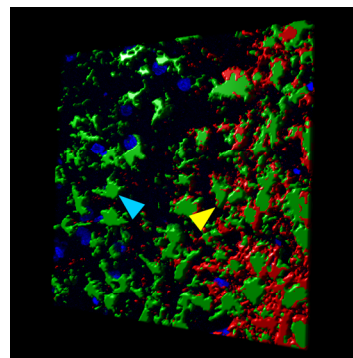


図 1. 脳梗塞モデルラットのペナンプラ領域に存在する NG2 陽性マイクログリア (緑: Iba1、赤: NG2、青: Hoechst 33258) 黄色の矢印は NG2 陽性マイクログリア、水色の矢印は NG2 陰性マイクログリアを示す。

② NG2 陽性マイクログリアの由来

NG2 陽性マイクログリアの由来を調べるために GFP 陽性ラットの骨髄を移植したラットの梗塞巣およびその周辺領域を観察した。その結果、梗塞巣に集積している NG2

陽性細胞は GFP を発現しているのに対し、ペナンプラ領域の NG2 陽性細胞は GFP を発現していなかった。従って、NG2 陽性マイクログリアは骨髄由来ではない、内在性のマイクログリア由来であることが示唆された。

③ NG2 陽性マイクログリアの役割

NG2 陽性マイクログリアのペナンプラ領域での役割を検討した。その結果、NG2 陽性マイクログリアは食食細胞のマーカーである CD68、アポトーシス細胞を認識する受容体である TREM-2 の発現が認められた。更に、神経細胞のマーカーである NeuN 陽性の神経細胞片を NG2 陽性細胞が取り込んでいる染色像が観察された。梗塞巣から距離を経るにつれ、NG2 の発現は失われ、NeuN を取り込んでいる細胞も見られなくなった。

(2) NG2 陽性マイクログリアの出現誘導物質の検討

NG2 陽性マイクログリアが梗塞巣から 100 μ m の狭い範囲内に局限していた。従って、NG2 陽性マイクログリアの出現誘導には、梗塞巣核心部から放出される生理活性物質の濃度勾配が関与しているのではないかと考え、以下の実験を行った。

① 脳梗塞発症後における遺伝子発現の空間的・経時変化

MCAO 施行後、1-14 日目の脳を摘出し、TTC 染色を用いて梗塞巣・梗塞巣周辺・反対側の正常領域をそれぞれ採取し、遺伝子発現の変動を測定した。その結果、MCAO 施行後 5-7 日目の梗塞巣で TGF- β 1 の発現量が増加することがわかった (図 2)。更に、ペナンプラでは TGF- β 1 受容体の発現も認められた。また、培養 BINCs や培養マイクログリアにおいても TGF- β 1、TGF- β 1 受容体の高い発現が認められた。従って、梗塞巣で BINCs が TGF- β 1 を産生し、その受容体をペナンプラ領域にいるマイクログリアが発現している可能性が示唆された。

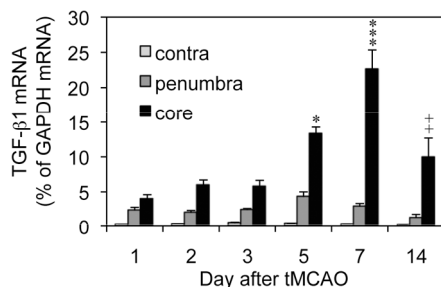


図 2. 脳梗塞発症後 1-14 日目における遺伝子発現変動

core は梗塞巣、penumbra は梗塞巣周辺領域、contra は反対側の正常領域を示す。TGF- β 1 mRNA が脳梗塞発症後、5-7 日目の梗塞巣で増加していた。

*, *** p <0.05, 0.001 vs. 1 dpr, ++ p <0.01 vs. 7 dpr.

② NG2 の発現誘導に及ぼす TGF- β 1 の作用

培養マイクログリアに TGF- β 1 を添加し、

NG2 タンパクの発現量に及ぼす影響を検討した。TGF- β 1 を添加後 24 時間で NG2 タンパクの発現量増加が認められた。これらの効果は TGF- β 1 阻害剤により明らかに抑制された (図 3)。

更に、BINCs を 24 時間培養した培養液をマイクログリアに添加すると、NG2 タンパクの発現誘導が認められた。また、BINCs の培養液から免疫沈降を用いて TGF- β 1 を除去すると NG2 タンパクの発現誘導は抑制された。

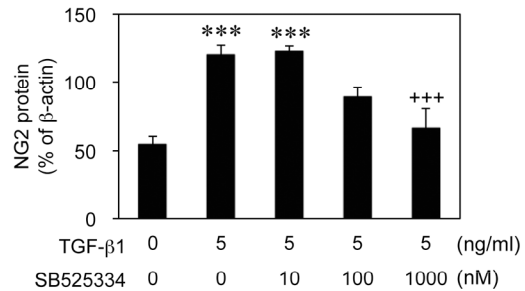


図 3. 培養マイクログリアの NG2 タンパク発現量に及ぼす TGF- β 1 と TGF- β 1 阻害剤の影響

TGF- β 1 添加後、24 時間で培養マイクログリアの NG2 タンパク発現量の増加が認められた。これらの作用は、TGF- β 1 阻害剤である SB525334 (1 μ M) により明らかに抑制された。*** p <0.001 vs. control, +++ p <0.001 vs. TGF- β 1 alone.

③ マイクログリアの機能に及ぼす TGF- β 1 の作用

TGF- β 1 がマイクログリアの機能に及ぼす影響を検討した。培養マイクログリアに TGF- β 1 を添加すると、24 時間後に TREM-2 mRNA の発現量が増加した。TGF- β 1 による作用は TGF- β 1 阻害剤により明らかに抑制された。しかしながら、CD68 mRNA の発現量には影響を及ぼさなかった。さらに wound healing assay を用いて、TGF- β 1 が遊走能に及ぼす影響について検討した。その結果、TGF- β 1 により明らかに遊走能の亢進が認められ、これらの作用は TGF- β 1 阻害剤により抑制された。

以上の結果から、NG2 がマイクログリア/マクローファージによる食食作用のいずれかのプロセスに関与し、NG2 発現誘導因子として TGF- β 1 が関与していると考えられる。

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 2 件)

- ① Nari Tei, Junya Tanaka, Kana Sugimoto, Tasuku Nishihara, Ryutarō Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Shirabe Matsumoto, Shiro Ohue, Hideaki Watanabe, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, Expression of MCP-1 and Fractalkine on Endothelial Cells and Astrocytes May Contribute to the Invasion and Migration of

Brain Macrophages in Ischemic Rat Brain Lesions, Journal of Neuroscience Research, 査読あり, vol. 91, 2013, 681-693

- ② Kana Sugimoto, Ryutaro Nishioka, Airi Ikeda, Ayano Mise, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Yoshiaki Kumon, Takanori Ohnishi, Junya Tanaka, Activated Microglia in a Rat Stroke Model Express NG2 Proteoglycan in Peri-Infarct Tissue Through the Involvement of TGF- β 1, GLIA, 査読あり, vol. 62, No.2, 2014, 185-198

[学会発表] (計 12 件)

- ① Ayano Mise, Kana Sugimoto, Ryutaro Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Response of glial cells to IL18 produced in the ischemic rat brains, 第 91 回日本生理学, 2014
- ② Ryutaro Nishioka, Kana Sugimoto, Ayano Mise, Katsura Kojyo, Choudhury E Mohammed, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Treadmill exercise as rehabilitation for stroke model; its effects through increased serum corticosterone level, 第 91 回日本生理学, 2014
- ③ Katsura Kojyo, Ryutaro Nishioka, Kana Sugimoto, Hitomi Aono, Choudhury E Mohammed, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, The light treadmill exercise after the cerebral infarction controls cellular edema: the involvement of aquaporin 4 and sodium/ hydrogen exchanger 1, 第 91 回日本生理学, 2014
- ④ 杉本香奈、田中潤也、片田竜一、松本博志、脳梗塞巣周辺領域に存在する NG2 陽性マイクログリアの意義、第 60 回日本法医学会 学術近畿地方集会、2013
- ⑤ 西岡龍太郎、杉本香奈、三瀬綾乃、湖城桂、青野仁美、高橋寿明、矢野元、田中潤也、実験的ラット脳梗塞に対する急性期運動療法の影響抑制効果:副腎皮質ステロイドの関与、第 65 回日本生理学会中国四国地方会、2013
- ⑥ 三瀬綾乃、杉本香奈、西岡龍太郎、高橋寿明、矢野元、久門良明、大西丘倫、田中潤也、ラット実験的脳梗塞巣における TGF- β 1 および IL-18 の発現とその病態生理学的意義、第 65 回日本生理学会中国四国地方会、2013
- ⑦ Kana Sugimoto, Ryutaro Nishioka, Ayano Mise, Yudai Ohara, Kohei Shiota, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Effects of TGF- β 1 on microglia in the penumbra of ischemic rat brain, 第 90 回日本生理学, 2013
- ⑧ Ayano Mise, Kana Sugimoto, Ryutaro Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Response of glial cells in and around ischemic lesion of rats that were subjected to transient middle cerebral artery

occlusion: the involvement of IL-18, 第 90 回日本生理学, 2013

- ⑨ Yudai Ohara, Kana Sugimoto, Ryutaro Nishioka, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Invasion of monocytes/macrophages into the ischemic lesion of rat brain: involvement of chemokines and their receptors, 第 90 回日本生理学, 2013
- ⑩ Ryutaro Nishioka, Kana Sugimoto, Ayano Mise, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano, Junya Tanaka, Treadmill exercise as rehabilitation for stroke model; its effects on brain edema and glial reactions, 第 90 回日本生理学, 2013
- ⑪ 三瀬綾乃、西岡龍太郎、杉本香奈、高橋寿明、矢野元、田中潤也、脳梗塞巣核心部のマクロファージと周辺グリア細胞の相互作用、第 64 回日本生理学会中国四国地方会、2012
- ⑫ 西岡龍太郎、杉本香奈、高橋寿明、矢野元、田中潤也、脳梗塞モデルラットに対するトレッドミル運動の予後改善効果と脳梗塞巣におけるグリア細胞の反応について、第 64 回日本生理学会中国四国地方会、2012

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/kisogp/contents/laboratories/classroom01>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 香奈 (SUGIMOTO, Kana)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00581034

(2) 連携研究者

田中 潤也 (TANAKA, Junya)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70217040