

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461134

研究課題名(和文)脳血管周皮細胞における活性酸素生成酵素Nox4に着目した脳虚血病態の研究

研究課題名(英文) Pathophysiology of brain ischemia focused on ROS-producing enzyme Nox4 expressed in brain microvascular pericytes

研究代表者

黒田 淳哉 (KURODA, JUNYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70614858

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)：脳血管周皮細胞は神経血管ユニット(Neurovascular Unit)の構成細胞の一つであり、脳虚血病態に重要な役割を果たす。我々は、脳血管周皮細胞には活性酸素生成酵素Nox4が発現しており、低酸素やアンジオテンシンIIによる刺激により発現が増加し、細胞増殖などに関与していること、脳虚血の際にはNox4が血液脳関門の破綻および脳梗塞巣の拡大に関連し、機序としてNF- $\kappa$ BとMMP9の活性化が重要であること、周皮細胞の機能を担う蛋白質であるPDGFR $\beta$ の脳梗塞後の発現増加にbasic FGFが関与している可能性などについて見いだした。Nox4は新しい脳梗塞治療のターゲットとなり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Brain microvascular pericyte, one of the cells constituting neurovascular unit, plays a pivotal role in pathophysiology of brain ischemia. We have found that Nox4, an enzyme producing reactive oxygen species (ROS), was expressed in brain microvascular pericyte and that Nox4 was upregulated by some stimuli such as hypoxic condition and angiotensin II and was involved in proliferation of the cells. In brain ischemia, Nox4 was associated with breakdown of blood-brain barrier and enlargement of the infarct, and activation of NF- $\kappa$ B and MMP9 was important as its mechanism. We also raised the possibility that in ischemic conditions, basic FGF could be involved in upregulation of PDGFR $\beta$ , a protein playing a role in pericyte function. Nox4 in brain pericytes could be a potential target for new therapies of cerebrovascular diseases.

研究分野：脳血管障害

キーワード：Nox4 脳血管周皮細胞 脳虚血 活性酸素 Neurovascular Unit 血液脳関門 PDGFR $\beta$  脳梗塞治療

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦においては、高齢化の進行に伴い、脳血管障害患者が増加している。脳血管障害を発症した場合に、できるだけ障害を少なくし、いかに神経機能の回復を誘導するかが重要な課題となっている。

(2) 脳血管には、物質の透過性が厳密に制限される血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が存在する。周皮細胞は毛細血管や細静脈において内皮細胞を取り囲んでいるが、内皮細胞に対する周皮細胞の存在比率は脳血管において特に高く、BBB の形成および維持に重要な役割を果たしている。

(3) 脳虚血急性期には、BBB の破綻による脳浮腫の発症が神経症候を増悪させるものとして問題になっている。また、脳梗塞発生後の神経機能回復には、秩序ある血管新生が不可欠である。内皮細胞周囲への周皮細胞の動員が血管新生の重要なステップとなるが、これには、内皮細胞から分泌される血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) および周皮細胞の PDGF 受容体が重要な役割を担っている。我々は、この PDGF 受容体を介したシグナル伝達が、Akt のリン酸化などにより周皮細胞自身の生存・増殖に関与するとともに、ニューロトロフィンの分泌を介して神経保護的に作用することを報告した (Arimura et al. *Curr Neurovasc Res* 2012)。

(4) 一方で、脳血管障害、特に脳梗塞は、活性酸素の発症に伴うレドックスが病態に関与する代表的疾患である。元来は好中球が微生物を貪食した際に殺菌のため活性酸素を生成する酵素「食細胞 NADPH オキシゲナーゼ」がよく研究されていたが、その酵素本体である gp91<sup>phox</sup> のホモログが次々に発見された。我々はそれらのうち Nox4 を発見し、当初腎に高発現する新たな活性酸素生成酵素として発表した (Shiose et al. *J Biol Chem* 2001)、Nox4 はまた、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞にも発現が見られ、重要な生理的役割を果たしていること (Ago et al. *Stroke* 2005, Kuroda et al. *Genes Cells* 2005)、心筋特異的 Nox4 過剰発現/ノックアウトマウスを用いて、心筋肥大や心臓の虚血再灌流障害においても重要であることを示した (Kuroda et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, Ago et al. *Circ Res* 2010)。

(5) 我々は、予備的実験により、脳血管周皮細胞にも Nox4 が発現して活性酸素を生成していること、低酸素環境下にて Nox4 mRNA の発現が増加することを見いだしているが、脳血管周皮細胞における Nox4 の役割は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 脳血管周皮細胞における Nox4 の発現・活性の調節機構および細胞機能に Nox4 がどのように作用しているか明らかにする。

(2) 脳血管周皮細胞に Nox4 を過剰発現するマウスに脳梗塞を作成し、Nox4 過剰発現によりどのような影響があるか、明らかにする。

(3) 脳血管周皮細胞の Nox4 が実際の生体における脳虚血病態にどのように関与しているか、またそのメカニズムを探究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト脳微小血管周皮細胞やラット脳微小血管周皮細胞株、ヒト脳微小血管内皮細胞を培養して実験に供した。低酸素環境下での培養には、酸素濃度を設定できるマルチガスインキュベーターを用いた。

(2) 脳血管周皮細胞および脳組織における Nox4 および関連の遺伝子発現や蛋白質局在について、免疫組織染色を用いて評価した。また、定量評価のためには、定量的 PCR やウェスタンブロットを行った。

### (3) 活性酸素生成活性の測定

スーパーオキシド生成活性の測定は、スーパーオキシドジスムターゼによって抑制される、ルミノールを用いた化学発光法を利用した。過酸化水素の測定は、Amplex Red を用いて吸光度を測定することにより行った。

### (4) 細胞増殖の評価

細胞をカウントする方法、および生細胞を MTS 法により比色定量する方法を用いて評価した。

### (5) マウス脳梗塞モデルの作製

マウスを用いて脳梗塞を次の方法で作成した。ローズベンガル色素を静脈内に注入した後、クリプトンレーザーで中大脳動脈を照射することにより血液凝固させ、血管を閉塞する中大脳動脈永久閉塞モデル。塞栓糸を総頸動脈から挿入して中大脳動脈まで到達させ、目的とする時間、一過性に閉塞させる虚血再灌流モデル。これらのモデルを用いて、脳梗塞サイズや BBB 障害の程度などを評価した。免疫組織染色を用いた組織学的評価や組織ホモジネートを用いた mRNA や蛋白質発現の変化についても検討した。

### (6) BBB 破綻の評価

梗塞巣における BBB 破綻の程度は、FITC-デキストランまたはエバンス・ブルーの血管外への漏洩を観察することにより評価した。

### (7) MMP の活性評価

脳ホモジネートをゼラチンゲルで泳動分離

した後、ゲルを蛋白染色して酵素活性によって消化されたゼラチンをバンドとして検出することにより評価した(ゼラチン・ザイモグラフィ)。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト脳血管周皮細胞には活性酸素生成酵素である NADPH オキシダーゼ(Nox)ファミリーのうち、Nox4 が優勢に発現していた。同細胞の膜画分は NADH または NADPH 存在下で活性酸素の一種であるスーパーオキシドの生成を認めた。スーパーオキシドの生成は Nox の阻害剤(diphenileneiodonium)で抑制されたが、他のスーパーオキシド生成源の阻害剤では抑制されなかった。周皮細胞はアンジオテンシン(Ang II)受容体を発現しており、Ang II の添加により Nox4 の発現が増加した。低酸素刺激でも同様に Nox4 の発現が増加した。RNAi により Nox4 の発現を抑制すると活性酸素の生成と細胞増殖が著明に減少した。以上より、Nox4 はヒト脳血管周皮細胞の主要なスーパーオキシド生成酵素であり、Ang II や低酸素により Nox4 の発現が調節されており、細胞増殖などに関与していることが示唆された。

(2) マウス脳梗塞モデル(中大脳動脈永久閉塞モデル)において、3-7 日目に梗塞周辺領域の血管細胞において PDGFR の発現がみられ、7 日目以後には梗塞周辺領域から虚血中心域に向かって PDGFR 陽性細胞が広がり、同時にフィブロネクチンとコラーゲンⅠ型を生成しているのが観察された。一方で、周皮細胞のマーカーであるデスミンと平滑筋アクチンは血管細胞においてのみ発現を認めた。PDGFR ヘテロノックアウトマウスにおいては、対照マウスと比較して、梗塞巣におけるフィブロネクチンとコラーゲンⅠ型の発現が低下し、梗塞巣サイズの拡大を認めた。培養脳血管周皮細胞においては、血清除去により PDGF-B、PDGFR、フィブロネクチン、コラーゲンⅠ型の発現が有意に増加したが、デスミンの発現は増加しなかった。血清除去によるフィブロネクチンとコラーゲンⅠ型の発現増加は、PDGFR の阻害剤である SU11652 により抑制され、PDGF-B によりさらに増強された。以上より、PDGFR の発現が脳梗塞後の線維化応答を担っており、PDGFR を介したシグナルが梗塞後のフィブロネクチンとコラーゲンⅠ型の発現に関与していると考えられた。

(3) ヒト脳血管周皮細胞において、bFGF によって PDGFR の発現が増加し、FGF 受容体(FGFR)の阻害剤である SU5402、その下流の Akt および Erk の阻害剤により抑制された。一方で、酸性化により bFGF の発現が増加し、低酸素刺激により FGFR1 の発現が増加した。bFGF と FGFR1 の発現はマウス脳梗塞モデル(中大脳動脈永久閉塞モデル)において、虚

血側大脳半球において著明に誘導された。免疫蛍光二重染色にて、bFGF と FGFR1 は梗塞周辺領域において、PDGFR 陽性細胞と共局在することが示された。さらに、bFGF は培養血管周皮細胞において、細胞増殖や PDGF-BB により誘導される細胞移動活性を増強することを明らかにした。この作用は PDGFR の阻害剤で抑制された。以上より、脳虚血後の bFGF の増加が PDGFR の発現を増強し、PDGFR を介した周皮細胞機能を強化する可能性が示唆された。

(4) マウス脳梗塞モデルにおいて、梗塞周辺領域の血管周皮細胞を含む微小血管細胞には Nox4 の発現が著明に増強されていた。Nox4 の発現増加は、中大脳動脈の虚血再灌流モデルよりも永久閉塞モデルにおいて顕著であった。微小血管において周皮細胞に Nox4 を過剰発現するマウス(Tg-Nox4)を用いて中大脳動脈永久閉塞モデルを作製したところ、対照マウスと比較して、梗塞サイズの増大および活性酸素生成・BBB 破綻の増強がみられた。培養脳血管周皮細胞では、低酸素刺激で Nox4 の発現は有意に増加したが、再酸素化ですぐに発現は減少した。Nox4 を過剰発現させた培養周皮細胞および Tg-Nox4 の梗塞周辺領域の両者で、NF B のリン酸化および MMP9 の発現が増加していた。以上より、脳虚血後に梗塞周辺領域の血管周皮細胞において Nox4 の発現が増加することにより、NF B および MMP9 の活性化を介して BBB の破綻を増強して梗塞サイズの拡大につながる可能性が示唆された。

(5) 上記の研究成果より、脳梗塞病態において、脳血管周皮細胞が血管新生や梗塞巣の線維化応答といった過程で重要な役割を担っていること、脳血管周皮細胞の機能を担う PDGF-PDGFR のシグナリングは虚血やサイトカインなどにより巧みに調節されていること、脳血管周皮細胞には活性酸素生成酵素 Nox4 が発現しており、虚血により発現が増加すること、脳血管周皮細胞の Nox4 は脳虚血時には BBB の破綻に関与し、梗塞の生成に大きな役割を果たしていることが見いだされた。Nox4 は新しい脳梗塞治療のターゲットになり得ると考えられる。

#### 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4件)

Nishimura A, Ago T, Kuroda J, Arimura K, Tachibana M, Nakamura K, Wakisaka Y, Sadoshima J, Iihara K, Kitazono T: Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 36(6): 1143-1554, 2016 (査読有)

DOI: 10.1177/0271678X15606456  
Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, Tachibana M, Yoshikawa Y, Makihara N, Wakisaka Y, Kuroda J, Kamouchi M, Ooboshi H, Kitazono T, Ago T: Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR in pericytes after ischemic stroke. Brain Res 1630: 98-108, 2016 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.003  
Makihara N, Arimura K, Ago T, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kuroda J, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T: Involvement of platelet-derived growth factor receptor in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. Exp Neurol 264: 127-134, 2015 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.12.007  
Kuroda J, Ago T, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kamouchi M, Kitazono T: Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes. J Vasc Res 51(2): 429-438, 2014 (査読有)  
DOI: 10.1159/000369930

〔学会発表〕(計 11 件)

立花正輝、吾郷哲朗、黒田淳哉、脇坂義信、吉川容司、古森元浩、芝原友也、北園孝成. 脳虚血後の早期再灌流は線維性応答およびアストログリオシスを介した組織修復を促進する. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会. 大阪. 2017 年 3 月  
吾郷哲朗、立花正輝、吉川容司、古森元浩、芝原友也、牧原典子、脇坂義信、黒田淳哉、北園孝成. 脳梗塞後の組織修復における再灌流治療の有用性に関する基礎的研究. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会. 大阪. 2017 年 3 月  
立花正輝、吾郷哲朗、黒田淳哉、脇坂義信、牧原典子、西村中、吉川容司、古森元浩、中村晋之、北園孝成. 再灌流が脳梗塞後の組織修復に与える影響の検討. 第 27 回日本脳循環代謝学会. 富山. 2015 年 10 月  
西村中、吾郷哲朗、立花正輝、脇坂義信、黒田淳哉、飯原弘二、北園孝成. 急性脳虚血病態におけるペリサイト NADPH oxidase 4 の役割について. 第 27 回日本脳循環代謝学会. 富山. 2015 年 10 月  
西村中、吾郷哲朗、吉川容司、立花正輝、松尾龍、脇坂義信、黒田淳哉、北園孝成. 脳虚血病態におけるペリサイト NADPH oxidase 4 の炎症促進作用についての検討. 第 26 回日本脳循環代謝学会総会. 岡山. 2014 年 11 月  
Nishimura A, Ago T, Yoshikawa Y, Tachibana M, Matsuo R, Wakisaka Y,

Kuroda J, Kitazono T. Roles of pericyte NADPH oxidase 4 in acute brain ischemia. Neuroscience 2014. ワシントン DC (アメリカ). 2014 年 11 月  
西村中、吾郷哲朗、松尾龍、脇坂義信、黒田淳哉、北園孝成、飯原弘二. 脳虚血病態におけるペリサイト NADPH oxidase の炎症促進作用についての検討. 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会. 東京. 2014 年 10 月  
西村中、吾郷哲朗、黒田淳哉、脇坂義信、松尾龍、杉森宏、飯原弘二、北園孝成. 脳虚血病態におけるペリサイト NADPH オキシダーゼの炎症促進作用についての検討. 第 39 回日本脳卒中学会. 大阪. 2014 年 3 月  
Nishimura A, Ago T, Tachibana M, Makihara N, Matsuo R, Wakisaka Y, Kuroda J, Kitazono T: Roles of pericyte NADPH oxidase 4 in acute brain ischemia. International Stroke Conference 2014. サンディエゴ (アメリカ). 2014 年 2 月  
西村中、吾郷哲朗、黒田淳哉、杉森宏、鴨打正浩、北園孝成、佐々木富男. 急性期脳虚血病態におけるペリサイト NADPH oxidase 4 の役割. 第 25 回日本脳循環代謝学会総会. 札幌. 2013 年 11 月  
西村中、吾郷哲朗、脇坂義信、黒田淳哉、杉森宏、北園孝成. ペリサイト NADPH oxidase 4 の過剰発現は脳虚血を増悪させる. 日本脳神経外科学会第 72 回学術総会. 横浜. 2013 年 10 月

〔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.stroke.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 淳哉 (KURODA, Junya)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号: 70614858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吾郷 哲朗 (AGO, Tetsuro)

西村 中 (NISHIMURA, Ataru)  
立花 正輝 (TACHIBANA, Masaki)