

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710006

研究課題名(和文) 中枢神経傷害後の血管新生を制御する生体システムの抽出

研究課題名(英文) Investigation of angiogenesis mechanism after central nervous system injury

研究代表者

村松 里衣子 (Muramatsu, Rieko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90536880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：様々な原因で脳と脊髄から構成される中枢神経系が傷害されると、感覚機能障害、運動機能障害など、傷ついた部位に応じて様々な症状があらわれる。この症状は、疾患の種類や個体差はあるものの、時間がたつにつれて僅かに自然回復する。症状の自然回復には、病態で傷ついた神経組織の修復が必要であり、いかにして神経組織を自然修復させるか、そのメカニズムの解明が待ち望まれている。研究代表者らはこれまでに、神経組織の自然回復には、病巣での血管新生が関与することを見出している。本課題では、病態における血管新生のメカニズムについて、特に神経組織の傷害と修復との関連について着目し研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Injury and inflammation mediate disruption of neuronal network. Because disruption of neuronal network is involved in neuronal dysfunction, recovery from neuronal dysfunction is considered to require reconstruction of disrupted neuronal network after injury. Although the repair mechanism of neuronal network has been unknown, previous our study suggested that neovessels formed though inflammation promotes rewiring of neuronal network in damaged central nervous system (CNS). In the present study, we investigated the mechanism of neovessel formation which is crucial for rewiring of CNS network. We found that degeneration of neuronal network precedes angiogenesis after CNS inflammation. We tried to identify the factor which is released from degenerating neuron that promotes angiogenesis, and we succeeded to identify the key factor that promotes proliferation of vascular endothelial cells.

研究分野：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：軸索 血管 多発性硬化症

### 1. 研究開始当初の背景

様々な疾患により、脳と脊髄から成る中枢神経系の組織は傷害される。神経組織が傷ついた部位に応じて、運動機能障害、感覚機能障害、高次脳機能障害など様々な後遺症があらわれる。このような症状を緩和するには、傷ついた神経組織を修復させる必要がある。かつては、発生期や末梢神経と異なり、成体の中枢神経系の修復は期待できないと考えられていた。しかし近年の研究により、病態の種類や個体差があるものの、大人の脳脊髄の神経組織も、わずかではあるが自然に修復することがわかってきた。特に、傷害による細胞死を免れた神経細胞が、代償的に神経回路を構築することで、神経機能の再獲得に寄与することが着目されている。これまでに研究代表者らは、神経回路が自然に修復するメカニズムについて、病巣に認められる旺盛な血管新生が、神経回路修復のキーであること、また血管を構成する血管内皮細胞が産生する因子が、神経突起の伸長を促すことを報告してきた。このことから、血管新生が神経回路修復を促すことが示唆された。

### 2. 研究の目的

上記は、新たに形成した血管の構造物自体が周囲の神経細胞にプラスの作用をすることを示しているが、古くから、血管新生は虚血を解消したり栄養分の再供給を促すことなど、様々な機能を発揮することで、周囲の細胞の生存や成長に影響を与えることが知られている。このように血管の役割に関する研究が成熟している一方で、なぜ病態で血管新生が促されるかについては、不明な点が多い。これまでの研究の多くは、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) をはじめとする、末梢臓器で血管新生作用が知られる分子に着目し、その発現パターンの解明を行ったものであった。それらの知見により、中枢神経傷害後の血管新生の一部を理解することは出来ていた。しかし、生体内での細胞の挙動等に踏み込んだ知見は少なく、また病態の環境変化に着目し、血管新生を直接関連づけた知見も乏しかった。そこで本課題では、病態における血管新生のメカニズムについて、病巣環境のいかなる現象がかかわるか解明するとともにその分子メカニズムに関する探求を行った。得られる分子メカニズムの働きを促すことで、血管新生を促進させ、二次的に神経組織の修復を加速させることを目標とした。

### 3. 研究の方法

脊髄で血管新生が生じるモデルマウスである実験的脳脊髄炎モデル(多発性硬化症の動物実験モデル)を用いて、血管新生部位周囲で生じる組織学的な変化を検討した。

得られた知見(後述)に基づき、脱落した

神経細胞から放出する分子が血管新生を促すか、in vitro で検討した。関連分子の同定には、生化学的手法を用いた。

In vitro の実験で得られた分子メカニズムが in vivo の血管新生に関わるか検討するため、同定した分子の発現を抑制させたマウスに実験的脳脊髄炎を誘導し、血管新生に対する影響を観察した。

### 4. 研究成果

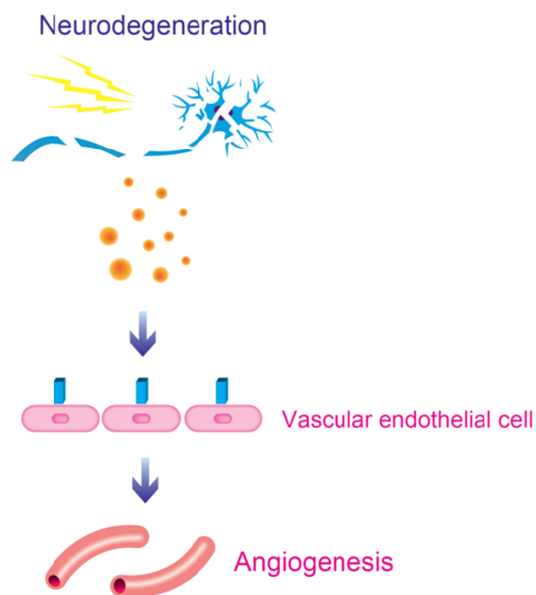
マウスの脊髄に実験的脳脊髄炎を誘導し、誘導後に脊髄組織を採取し、脊髄切片を作成した。免疫染色法を用いて、血管新生および神経組織の脱落について経時的に観察した。脳脊髄炎を誘導すると、誘導1週間後に新生血管が豊富に検出され、またそれらは増殖中の(Ki67 陽性の)血管内皮細胞であった。同期での詳細な組織解析を行ったところ、血管内皮細胞の増殖が盛んな部位に周囲では、傷害神経細胞マーカーのシグナルも多く検出された。神経回路のマーカーの染色も行い、同部位で神経回路が消失していることを確認した。

神経細胞の傷害が血管内皮細胞にいかなる影響を与えるか検討するため、マウス脳組織の抽出液を作成し、脱落する神経細胞から放出される細胞内成分を模擬する溶液を作成した。作成した脳抽出液を、マウス脳血管内皮細胞株に添加し培養し、培養細胞へのBrdUの取り込みを評価した。その結果、脳抽出液の添加量依存的に、血管内皮細胞の増殖が促進することがわかった。そこで、血管内皮細胞の増殖を促す、脳抽出液中の成分を同定するため、あらかじめ脳抽出液を種々の酵素処理、熱処理などした上で、血管内皮細胞に添加して、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)への取り込みを評価した。その結果、脳抽出液に含まれる熱耐性のないタンパク室が、血管内皮細胞の増殖促進に寄与することがわかった。そこで、脳抽出液をシヨ糖密度勾配法およびHPLCを用いて分画し、血管内皮細胞の増殖促進作用をもつフラクションを見つけ出し、そのフラクションに含まれる分子を質量分析によって解析し、同定された分子を血管内皮細胞の増殖を促進させる候補分子として、それぞれの分子の精製物を血管内皮細胞に暴露し、増殖活性の有無を評価した。その結果、通常神経細胞内にあるが、細胞が傷つくと細胞外に放出される分子のひとつに、血管内皮細胞の増殖を促す作用があることを見出した。

同定した分子は、通常は細胞内に留まっている分子で、細胞外に放出した際の役割は不明だった。そこで、まず同定した分子がいかなる機序で血管内皮細胞の増殖を促すか解明するため、同定分子が結合する血管内皮細胞側の分子の探索を行った。同定分子にHisタグを結合させたものを、培養血管内皮細胞に添加し、抗His抗体で同定因子の分布を精

査した。すると、同定因子は血管内皮細胞の細胞膜に集積する傾向があることがわかった。そこで、同定因子を添加した血管内皮細胞の細胞膜画分を回収し、さらにその中から His 結合分子を採取して、採取したサンプル内に含まれる分子を質量分析によって検出した。検出された分子を、神経細胞から放出される血管新生促進分子に対する結合分子の候補とした。それらの候補分子の siRNA を血管内皮細胞に遺伝子導入し、その細胞に対して上述で同定した分子を添加し、結合への影響および同定分子による血管内皮細胞への BrdU 取り込みを評価することで、神経細胞から放出される同定分子に対する、血管内皮細胞側の結合分子の同定に至った。

同定した血管内皮細胞側に発現する分子の in vivo での作用を検証するため、マウス脊髄血管における同定分子の発現を検出した。さらに、同定分子の発現を抑制する処置を施したマウスに対して、脳脊髄炎を誘導し、血管新生への影響を評価し、in vitro で得られた成果を支持する結果が得られた。以上の結果を論文としてまとめ、現在投稿を進めている。



#### 【本研究で得られた概念図】

中枢神経傷害後、神経細胞からは、通常は細胞内に留まっている分子が細胞外へ放出される。放出された分子の一部は、血管内皮細胞に作用して、血管内皮細胞の増殖を促し、血管新生が促進される。

#### 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3件)

Muramatsu, R. and Yamashita, T. (2014)

Pericyte function in the physiological central nervous system. *Neurosci. Res.* 81-82, 38-41.

Muramatsu, R. and Yamashita, T. (2014) Concept and molecular basis of axonal regeneration after central nervous system injury. *Neurosci Res.* 78, 45-49.

Miyake, S., Muramatsu, R., Hamaguchi, M. and Yamashita, T. (2015) Prolyl hydroxylase regulates axonal rewiring and motor recovery after traumatic brain injury. *Cell Death Dis.* 6, e1638

#### 〔学会発表〕(計6件)

村松里衣子: Neurodegeneration promotes angiogenesis in the adult CNS、第58回日本神経化学会大会 シンポジウム、大宮 (2015.9.11)

村松里衣子: 中枢神経系の修復研究における生化学的なアプローチ、はじめてのライフサイエンス基礎講座 2015 講演、大阪 (2015.5.20)

村松里衣子、山下俊英: 中枢神経傷害後の神経 - 血管相互依存性の分子実体の解明、第88回日本薬理学会 シンポジウム、名古屋 (2015.3.19)

村松里衣子、山下俊英: 中枢神経系の傷害と修復を制御する分子機構、自然科学研究機構生理学研究所 部門公開セミナー 招待講演、岡崎 (2015.3.19)

尾崎友彦、村松里衣子、藤中俊之、吉峰俊樹、山下俊英: 脳虚血時の虚血耐性獲得に関連する血管内皮細胞に発現する分子の探索 第26回日本脳循環代謝学会総会・ポスター、岡山 (2014.11.21)

尾崎友彦、村松里衣子、藤中俊之、吉峰俊樹、山下俊英: P2X4 受容体を介した虚血耐性獲得のメカニズム、第27回日本脳循環代謝学会総会、口演、富山 (2015.10.31)

#### 〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

#### ○出願状況(計1件)

名称: 血管透過性亢進抑制剤

発明者: 池田里衣子、山下俊英

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 用途

番号: 特願 2014-006530

出願年月日: 平成 26 年 01 月 17 日

国内外の別: 国内

#### ○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.hs.ura.osaka-u.ac.jp/muramatsurieko/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

村松 里衣子 (Muramatsu Rieko)

大阪大学 / 医学系研究科 准教授

研究者番号：90536880