

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860702

研究課題名(和文)新規慢性期脳梗塞治療戦略としてのグリア細胞による組織リモデリングの検討

研究課題名(英文) Tissue remodeling by microglia for a novel therapeutic strategy in chronic cerebral ischemia

研究代表者

金澤 雅人 (Kanazawa, Masato)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80645101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラット局所脳虚血モデルにて、虚血中心部でも分裂能を有する細胞が増加し、虚血1週間をピークとして血管内皮細胞と周皮細胞の増殖、増殖能を有するミクログリアの集簇を認めた。また、同部位では虚血7、14日後に血管新生を認めた。初代ミクログリアにOGD刺激を行うと、VEGFが分泌された。さらに、神経細胞、ミクログリアからは、保護因子progranulinが分泌されていた。虚血後1週間の時点でOGD刺激後のミクログリアを動脈から虚血側に投与することで、運動機能を対照のアストロサイト、無細胞群と比べて、改善させた。慢性期の脳梗塞治療として、ミクログリアによる組織リモデリングを誘導することは治療戦略となる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the cellular proliferation in rats subjected to focal cerebral ischemia. We observed proliferated endothelial cells and pericytes, and increased numbers of microglia even though in the ischemic core, and angiogenesis in the peripheral zone of the ischemic core at 7 and 14 days after cerebral ischemia. In vitro primary cells revealed that vascular endothelial growth factor was secreted from the microglia after oxygen-glucose deprivation (OGD). Protective growth factor progranulin was also secreted from the neuronal cells and microglia after OGD. Finally, we demonstrated the therapeutic potential of microglia against chronic focal cerebral ischemia. Seven days after ischemia, intraarterial injection of microglia stimulated OGD via carotid artery improved motor outcome compared to injections of astrocytes and phosphate buffer solution. Microglial transplantation may be a novel therapeutic strategy that provides tissue remodeling after chronic cerebral ischemia.

研究分野：脳虚血

キーワード：脳虚血 細胞療法 ミクログリア 組織リモデリング 血管リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1). 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

脳梗塞に対する治療として発症超急性期の組織型プラスミノゲン・アクチベーター (tissue-plasminogen activator; tPA) 投与による血栓溶解と機械的血栓除去術による血栓除去による再開通療法がある。しかし、発症数週間以後の**慢性期をターゲットとした内科的治療は再発予防しかこれまでない。脳梗塞後の慢性期には蛋白分解酵素による細胞外マトリックスの分解と血管新生・神経再生による組織リモデリングが生じ、機能回復につながる可能性**がいくつか報告されているが (Gliem, Ann Neurol 2012, Chopp, Stroke 2007), **その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。**

### (2). これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

応募者は、2007 年から'10 年まで新潟大学にて、脳梗塞の急性期新規治療法の開発 (脳梗塞後の血液脳関門破綻を抑制する研究) に従事し、t-PA 投与と同時に、血管内皮増殖因子 (VEGF) 抑制 (抗 VEGF 中和抗体) で tPA の治療可能時間を延長させ、予後を改善することを示した (JCBFM2011, 日本脳卒中学会・心臓財団**草野賞受賞**, 米国神経学会動物実験賞受賞, **国内外特許取得, 新聞報道**)。また、2010 年から 2 年間、ワシントン大学 (del Zoppo ラボ) において、脳血管障害における血液脳関門破綻、特に

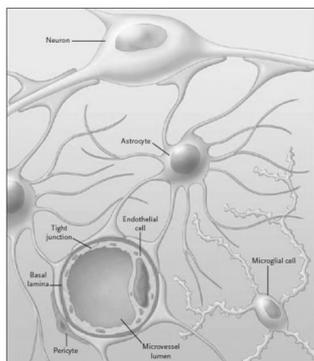
神経細胞に加え血管内皮細胞を含む neuro-vascular unit を、虚血から守る neuro-vascular protection (図) の分子機序の解明を明らかにする目的で、脳虚血後の接着分子修飾 (JCBFM2011) や蛋白分解酵素マトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) による血液脳関門破綻の機序を検討し、MMP が治療候補分子となることを明らかにした (JCBFM 2012)。

これまでは急性期を標的とした研究を遂行してきたが、tPA の治療可能時間の延長が 2012 年 9 月から治療ガイドラインでも受け入れられ、新世代の tPA も開発されており、適応患者が増える見通しがある。その一方、慢性期脳梗塞に対する治療やその病態はあまり検討されていない。

急性期に悪玉に働く **MMP などの蛋白分解酵素や VEGF などの細胞増殖因子は、慢性期には血管新生による組織リモデリングによる修復に関わる**と考えられている。**組織リモデリングは、蛋白分解酵素による細胞外マトリックス分解により、神経終末の伸展や新生血管増加、血管の伸展が促進されることである。リモデリングのメディエーターとして、ミクログリアやアストロサイトの関与が考えられ、概念は提唱されているが (del Zoppo, JCBFM2003), その詳細なメカニズムは明らかとなっていない (Fukuda, Stroke 2004)。**また、最近の治療可能域ペナンプラの考えとして、組織損傷と修復がどちらに傾くかという 2 面性が提唱されている。慢性期においても修復に関わる蛋白分解酵素や細胞増殖因子の効果を高めることが新規の治療戦略となる。脳梗塞の慢性期に、蛋白分解酵素と細胞増殖因子共に有効に作用する治療法があれば、血管新生・進展を促進し、さらに神経軸索再進展、組織リモデリングに理想的といえる。

近年再生治療として、iPS 細胞や幹細胞の検討がされている。いずれの細胞の検討

Neurovascular protection



Neurovascular protection は、これまでの神経細胞のみを標的とした治療法ではなく、神経細胞、血管内皮細胞、アストロサイトを含めた neuro-vascular unit (右図) 全体を虚血から保護しようという新しい考え。

も、どのような細胞に分化させるか、分化するのを見極めたうえでの効果検討が、基礎・臨床に必要であるが、その前段階として、我々はグリア細胞（特にミクログリア）に注目した。

以上より慢性期の新規治療法の開発を目指し、以下の研究を立案した。慢性期の病態を明らかにするため、**神経細胞に加え血管新生・進展を誘導するグリア細胞の関与を明らかことである。**

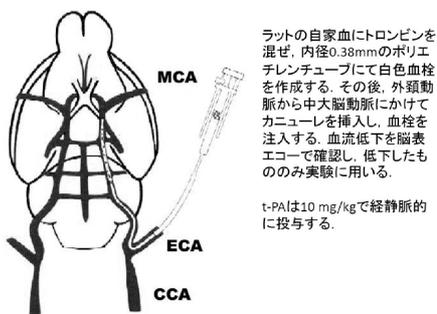
## 2. 研究の目的

慢性期のリモデリングを促進させるグリア細胞の関与を検討する手段として、NVUを構成するミクログリアとアストロサイトに注目した。これに関連し、以下の点について明らかにする。

- (a) 脳虚血巣で、細胞外マトリックス分解と新生血管増加といった組織リモデリングが生じているのかを明らかにする。
- (b) グリア細胞から分泌されるMMPと細胞増殖因子による血管新生や慢性期の神経修復に及ぼす影響を評価する(ミクログリアとアストロサイトの効果比較)。

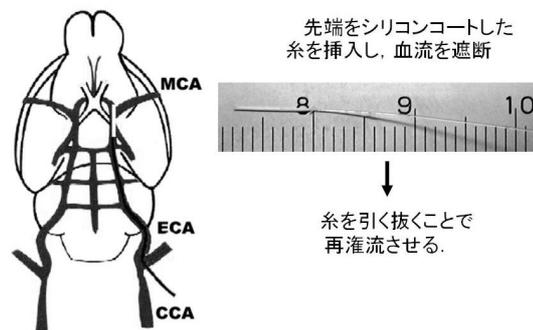
## 3. 研究の方法

すでに確立した「ラット局所脳塞栓モデル(図)」(tPA再還流モデル)と初代培養グリア細胞を用いて、亜急性期から慢性期にかけての組織リモデリングの病態を検討する。



具体的には in vivo で経時的に脳梗塞後に、細胞外マトリックスが分解され、血管新生や伸展が生じるのかを明らかにし、さらにMMPと細胞増殖因子分泌源のグリア細胞を脳梗塞後に移植することで、リモデリングが促進され、機能回復に関与するかを明らかにする。

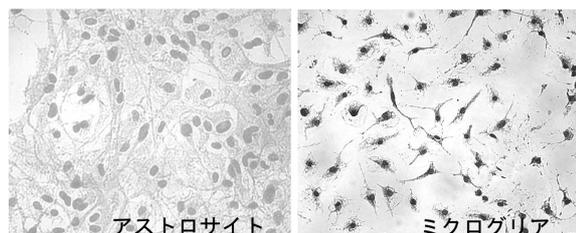
- ラット塞栓系再還流モデルを使用する(我々はすでにこの動物モデルを修得し、安定した実験が可能になっている、



J Neurochem 2011).

また、tPA 併用のラット脳塞栓梗塞再還流モデルも使用する(我々はすでにこの動物モデルを修得し、安定した実験が可能になっている、JCBFM 2011).

- 脳虚血の慢性期のリモデリングの評価を行うため、虚血後 1,3,7, 14 日後の新生血管数を定量化するため、新生血管内皮のマーカーCD31 で免疫染色し、Imaris による 3D 解析を行う。さらに、新生細胞の増殖マーカーKi67 と血管内皮細胞、神経細胞、アストロサイト、周皮細胞、ミクログリアマーカーでの二重染色を行い、局在を明らかにする。
- 初代培養グリア細胞(ミクログリアと



アストロサイト)を準備し, in vitro の虚血実験 oxygen-glucose deprivation (OGD)実験を実施し, OGD18 時間後の培養上清を回収し, 血管新生に関わる各種成長因子, 炎症性サイトカインの定量を行う.

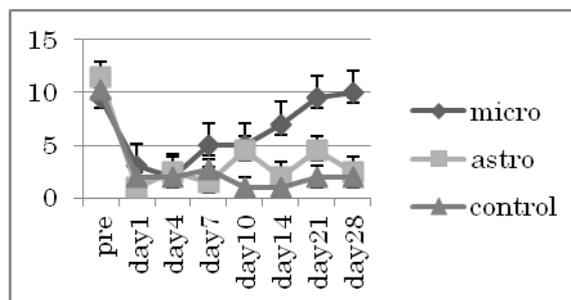
- 初代培養グリア細胞(ミクログリアとアストロサイト)を虚血7日後に経動脈投与による移植を行い, 脳梗塞後28日後まで, 運動機能(corner test と haning wire test)を評価する. ミクログリアとアストロサイトの慢性虚血期の効果の比較をする.
- ミクログリア, 神経細胞が分泌していると考えられる保護的成長因子 progranulin の神経保護, 血管保護, 炎症抑制の機序も明らかにし, 将来的なミクログリアの修飾を検討する.

#### 4. 研究成果

- ラット脳塞栓 tPA モデルと塞栓系モデルにおいて, 虚血中心部でも分裂能を有する(Ki67 陽性)細胞が増加し, 虚血1週間をピークとしてKi67陽性血管内皮細胞, Ki67 陽性周皮細胞と Ki67 陽性ミクログリアを認めること.
- 塞栓系モデルにおいて, CD31 の免疫染色で, 虚血中心部の辺縁部において, 虚血3日目まで染色性は低下するが, その後7, 14日後に血管の新生を認める. 虚血辺縁部は経時的には有意な変化を認めなかった. これまで回復の可能性がないと考えられていた虚血中心部でもその辺縁は回復する可能性があることが示唆された.
- 初代細胞培養のミクログリアやアストロサイトで, 脳虚血に類似した OGDを行うと, VEGF が誘導分泌されること. BDNF に関しては, OGD 前後では有意な違いはなかった. ミクログリアは, OGD 刺激で炎症性サイトカイン

TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  を誘導分泌すること.

- 神経細胞, ミクログリアの培養上清に progranulin が分泌されていること, 特に OGD 後に増加していることを明らかにした.
- 虚血後1週間の時点で OGD 刺激後のミクログリアを動脈から虚血側に投与することで, 運動機能を対照のアストロサイト, 無細胞群と比べて, 改善させること(図, corner test, 10 が基準で,



数が少ない方が症状が強い).

#### 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)

1. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke.

Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. *Brain*. 2015 published online Apr 2. (査読あり)

2. Ikeda T, Takahashi T, Tsujita M, Kanazawa M, Toriyabe M, Koyama M, Itoh K, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. Effects of Alda-1, an aldehyde dehydrogenase-2 agonist, on hypoglycemic neuronal death. *PLoS One* 2015 in press (査読あり)

3. Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue

plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. *PLoS One* 2014; 9: e98639. (査読あり)

4. Shimohata T, Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Nishizawa M. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2013;1:201-208. (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

1. プログラニューリンは実験虚血モデルにおいて、多面的治療効果をもつ。 金澤雅人, 川村邦雄, 高橋哲哉, 三浦南, 田中良法, 小山美咲, 鳥谷部真史, 五十嵐博中, 中田力, 西原眞杉, 西澤正豊, 下畑享良. 第40回日本脳卒中学会総会 「リーガロイヤルホテル広島(広島県, 広島市)」2015年3月28日

2. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischemic stroke. Masato Kanazawa, Kunio Kawamura, Tetsuya Takahashi, Minami Miura, Yoshinori Tanaka, Misaki Koyama, Masafumi Toriyabe, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada, Masugi Nishihara, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. *International Stroke Conference*, 「Nashville (USA)」2015年2月11日

3. プログラニューリンは神経細胞保護効果・抗炎症作用をもつ。三浦南, 金澤雅人, 川村邦雄, 高橋哲哉, 田中良法, 小山美咲, 鳥谷部真史, 五十嵐博中, 中田力, 西原眞杉, 西澤正豊, 下畑享良. 第26回日本脳循環代謝学会総会 岡山 「岡山コンベンションセンター(岡山県, 岡山市)」2014年11月21日

4. 脳虚血におけるヘパラーゼによるヘパラン硫酸プロテオグリカンの修飾。

金澤雅人, Yu-Huan Gu, 長田高志, Brian T. Hawkins, 福田俊一, 中島元夫, 下畑享良, 西澤正豊, Gregory J. del Zoppo. 第19回日本病態プロテアーゼ学術集会 「千里ライフサイエンスセンター(大阪府, 豊中市)」2014年8月8日

5. アンギオポエチン1による血栓溶解療法に伴う脳出血合併症の予防効果。

金澤雅人, 川村邦雄, 高橋哲哉, 五十嵐博中, 中田力, 西澤正豊, 下畑享良. 第55回日本神経学会学術大会 「福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)」2014年5月22日

6. Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke. Masato Kanazawa, Kunio Kawamura, Tetsuya Takahashi, Hironaka Igarashi, Tsutomu Nakada, Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata. *Annual Meeting of American Academy of Neurology*, 「Philadelphia (USA)」2014年4月30日

7. 脳虚血におけるヘパラーゼによるヘパラン硫酸プロテオグリカンの修飾。

金澤雅人, Yu-Huan Gu, 長田高志, Brian T. Hawkins, 福田俊一, 中島元夫, 下畑享良, 西澤正豊, Gregory J. del Zoppo. 第25回日本脳循環代謝学会総会 「京王プラザホテル札幌(北海道, 札幌市)」2013年11月2日

〔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〕

以下のホームページ成果を公表している。  
<https://ja-jp.facebook.com/NiigataCBFM>  
<http://neuroweb.sblog.jp/page/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者 金澤 雅人 ( Kanazawa, Masato) 新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：80645101
- (2)研究分担者 なし
- (3)連携研究者 下畑 享良 ( Shimohata, Takayoshi) 新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号：60361911  
連携研究者 高橋 哲哉 ( Takahashi, Tetsuya) 新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：20515663