

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830029

研究課題名(和文) 生体恒常性維持のための感知系脳室周囲器官における血管リモデリングメカニズム

研究課題名(英文) Cellular mechanisms of vascular remodeling for homeostasis in the sensory circumventricular organs

研究代表者

森田 晶子 (Morita, Shoko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70647049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：終板器官、脳弓下器官、最後野からなる感知系脳室周囲器官は、典型的な血液脳関門を欠き、血液由来の情報を直接モニターして体液ホメオスタシス、炎症、摂餌、悪心嘔吐を調節している。今のところ、感知系脳室周囲器官の血管の特徴については血管内皮細胞が有窓性であることを除けばほとんど知見がない。申請者は成体マウスの感知系脳室周囲器官において持続的血管新生が起きていることを明らかにした。また、この持続的血管新生が血管内皮成長因子VEGF依存的に起き、血管の構造や透過性のダイナミックな可塑性にとって重要であることを示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：The sensory circumventricular organs (CVOs), which comprise the organum vasculosum of the lamina terminalis, the subfornical organ and the area postrema, lack a typical blood-brain barrier and monitor directly blood-derived information to regulate body fluid homeostasis, inflammation, feeding, nausea and vomiting. Until now, almost nothing has been documented about vascular features of the sensory CVOs except fenestration of vascular endothelial cells. I demonstrated that continuous angiogenesis occurs in the adult sensory CVOs. My data indicate that continuous angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor signaling and responsible for the dynamic plasticity of vascular structure and permeability.

研究分野：神経科学

キーワード：血液脳関門 ホメオスタシス 血管新生 炎症

1. 研究開始当初の背景

脳では血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) が循環血液と脳内の物質輸送を厳密に制御しており、そのバリア機能は神経細胞保護機構として必須である。一方で、生体恒常

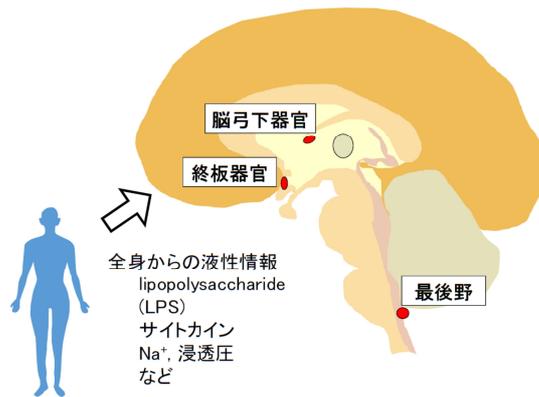


図 1 sensory CVOs は全身からの液性情報を感知する

性を保つためには脳と全身で効果的に液性情報を交換することが必要となる。脳の中でも脳室周囲器官 (circumventricular organs; CVOs) と総称される部位は一般的な BBB を持たず、血管は有窓性で高い透過性を示す。また CVOs の血管構築は他の脳部位と比べて非常に複雑で、網状またはループ状構造を持つ。このような血管構築を持つことで、CVOs は血液中の情報を感知したり脳で産生したペプチドホルモンを血中へ分泌したりして、全身との液性情報を交換する「脳の窓」としての役割を果たしている。しかし、脳においてこのような特殊な血管構造を持つ仕組みは不明であった。

申請者は、CVOs の中でも血中の液性情報を感知する感知性脳室周囲器官 (sensory circumventricular organs; sensory CVOs) に注目した。sensory CVOs である終板器官、脳弓下器官、最後野は、中枢における免疫応答の起点であり、悪心・嘔吐といった生命維持に重要な機能を持つが、それらの機能を果たすために必要不可欠である高い透過性を保つ特殊な血管構築の構築機序は不明であった。申請者は、CVOs の一つでありペプチドホルモン分泌機能を持つ正中隆起で活発な血管新生が起きていることを見出した (Morita et al., *Eur. J. Neurosci.*, 2013)。

申請者はすでに sensory CVOs において血管新生が起きていることを示唆する予備データを得ている。正中隆起と sensory CVOs の血管構造には共通点があることから、sensory CVOs の血管構築を構築する仕組みの解明の糸口として血管新生に着目した。

2. 研究の目的

まず、sensory CVOs の血管でも血管新生が起きていることを証明し、sensory CVOs における血管新生と血管透過性の関係を明らかにすることを第一の目的とする。そして、sensory CVOs において血管新生が起きることの生理学的意義にせまる。全身が炎症状態にあるとき、sensory CVOs は血液中からの炎症シグナルが脳に入る入り口である。このことから、本研究では全身が炎症状態にあるときの sensory CVOs の血管構築と透過性の可塑性を調べることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

1. sensory CVOs における血管新生

まず、血管新生促進因子である血管内皮成長因子-A (VEGF-A) と VEGF-A を調節する転写因子である低酸素誘導因子-1、ペリサイト調節因子血小板由来成長因子 B の発現と局在を、in situ hybridization 法、RT-PCR 法、免疫組織化学法を用いて明らかにした。そして、血管内皮細胞の増殖の有無を明らかにするのに増殖細胞マーカー BrdU と Ki67 を用いた。アポトーシスマーカーとして Caspase-3 を用いた。

2. 血管新生阻害

VEGF 受容体および PDGF 受容体の阻害剤である、SU11248、AZD2171、STI-571 を 1 日 2 回、5 日間マウスに経口投与した。

3. 細胞増殖阻害

細胞増殖阻害剤である AraC を 10 日間マウス頭蓋骨下に浸透圧ポンプを用いて慢性投与した。

4. 血管透過性評価

低分子量蛍光色素 FITC を麻酔下のマウス心臓内より灌流した。

5. LPS 投与後 sCVOs の血管構築及び血管透過性変化の解析

成体マウスに LPS (055:B5, 1 mg/kg) を腹腔内投与し、血管構築変化を細胞増殖マーカー BrdU 及び有窓性マーカー PV-1 を用いて明ら

かにした。また、血管透過性変化は FITC を用いて明らかにした。

4. 研究成果

sensory CVOs では、VEGF-A と低酸素誘導因子-1 は終板器官と脳弓下器官のニューロン及び最後野のニューロンとアストロサイトに高い発現を示した。血小板由来成長因子 B の発現は感知系脳室周囲器官のアストロサイトで高かった。BrdU と Ki-67 の免疫染色により、内皮細胞の活発な増殖が明らかになった。さらに、caspase-3 と基底膜マーカーラ

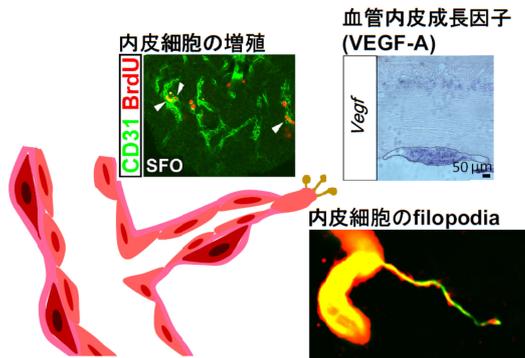


図2 sensory CVOs では血管新生が起きていた

ミニンの免疫染色により内皮細胞のアポトーシスと増殖が明らかになった。血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の発現が特異的に高く、盛んに血管内皮細胞が増殖し、血管新生を示すフィロポディアも多数認められた (図2)。これらの結果は sensory CVOs では成体でも持続的に血管新生が起きていることを示すものである。一般的に新生血管は高い透過性を示すことから、この新生血管の構造的な未成熟が sCVOs における血液脳関門の不全の主たる要因であると考えている。

VEGF 受容体関連チロシンキナーゼ阻害剤 AZD2171 の処理により、内皮細胞の増殖とフィロポディア数が微小血管の面積と直径とともに有意に減少した。細胞増殖阻害剤であるシトシン-b-D-アラビノフラノシドは血管面積や直径の変化をもたらすことなく内皮細胞の増殖と血液由来低分子量分子の血管透過性を減少させた (図3)。よって持続的血管新生は VEGF シグナリングに依存的に起き、血管の構造や透過性のダイナミックな可塑性にとって重要であることを示唆する。

炎症反応を引き起こすリポ多糖 (LPS) を投与すると、その情報は sensory CVOs を介して脳へ入るといわれている。本研究では、sensory CVOs のひとつ脳弓下器官の血管が LPS 投与により可塑性を示すか調べた。脳弓下器官では、正常状態で細胞増殖マーカー

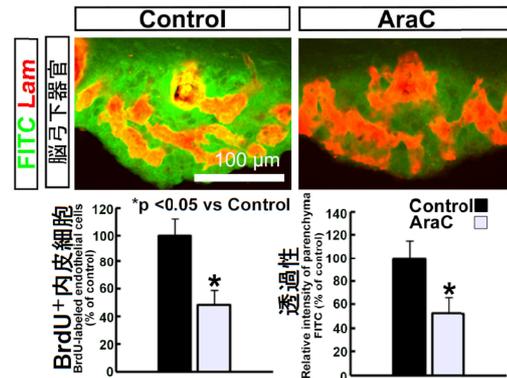


図3 細胞増殖阻害剤の投与は内皮細胞の増殖と血管透過性を減少させた

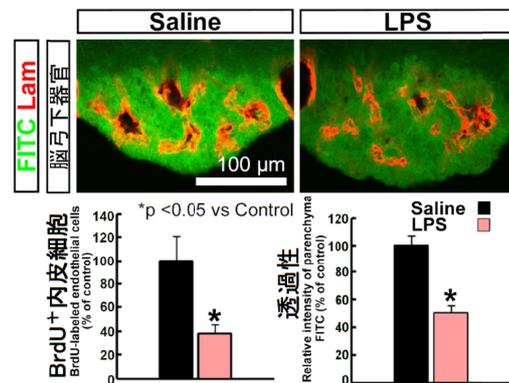


図4 LPS の投与は内皮細胞の増殖と血管透過性を減少させた

BrdU 陽性の血管内皮細胞が多数認められ血管は高い透過性を示す。しかし、成体マウスに LPS を腹腔内投与すると、BrdU 陽性の内皮細胞数が有意に減少し、血管の物質透過性は LPS 投与後著しく低下した (図4)。原形質小胞 1 タンパク質 (PV-1) は有窓性血管の隔膜に特異的に発現し、血管の物質透過性の指標にもされている。脳弓下器官では PV-1 の発現が高いが、LPS 投与後有意に低下した。以上のことから、LPS を投与すると脳弓下器官では血管のリモデリングが生じ、物質透過性が低下することが明らかになった。この結果

は脳弓下器官の血管リモデリングが過度の炎症反応に対する防御機構において役割を持つことを示唆した(図5)。

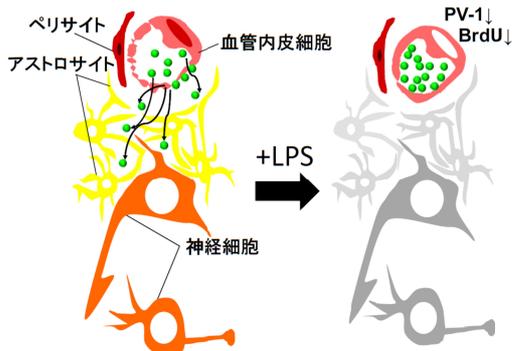


図5 模式図

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6件)

Okuda H, Tatsumi K, Morita-Takemura S, Nakahara K, Nochioka K, Shinjo T, Terada Y, Wanaka A.

Hedgehog Signaling Modulates the Release of Gliotransmitters from Cultured Cerebellar Astrocytes.

Neurochemical Research, 41, 278-289 (2016) doi: 10.1007/s11064-015-1791-y. 査読有

Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S.

Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain.

Cell and Tissue Research, 363, 497-511 (2016) doi: 10.1007/s00441-015-2207-7 査読有

Nakano Y, Furube E, Morita S, Wanaka A, Nakashima T, Miyata S.

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 (2015) doi:

10.1016/j.jneuroim.2014.12.013. 査読有 Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S.

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 (2015) doi: 10.1007/s00441-014-2080-9 査読有

Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, Miyata S. VEGF- and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice.

Journal of Endocrinology, 222, 161-179 (2014) doi:10.1530/JOE-14-0075. 査読有

Okuda H, Tatsumi K, Horii-Hayashi N, Morita S, Okuda-Yamamoto A, Imaizumi K, Wanaka A.

OASIS regulates chondroitin 6-O-sulfotransferase 1 gene transcription in the injured adult mouse cerebral cortex.

Journal of Neurochemistry, 13, 612-625 (2014) doi: 10.1111/jnc.12736. 査読有

[学会発表](計11件)

森田-竹村晶子 他

感知系脳室周囲器官の血管周囲環境と炎症情報伝達

第121回日本解剖学会、2016年3月28-30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

森田-竹村晶子 他

感知系脳室周囲器官における炎症情報伝達機構について

第91回近畿支部学術集会、2015年11月28日、京都工芸繊維大学(京都府京都市)

Morita-Takemura S 他

Dynamic vascular remodeling evoked by circulating inflammatory signals in the sensory circumventricular organs Neuroscience 2015 (Society for Neuroscience)、2015年10月17-21日、シ

カゴ (アメリカ合衆国)

森田-竹村晶子 他

Entry of circulating molecules is restricted by alternative barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain

第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月 11-13 日、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

森田 晶子 他

末梢からの炎症因子によって引き起こされる脳弓下器官の血管再構築

第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

森田 晶子 他

脳弓下器官が持つ有窓性血管の脳-免疫系相互作用における役割

第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第 92 回 日本生理学会大会、2015 年 3 月 21-23 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

森田晶子 他

脳弓下器官の血管リモデリング：炎症反応における役割

第 41 回日本神経内分泌学会学術集会 (内分泌学ウィーク 2014)、2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日、都道府県会館 (東京都千代田区)

森田 晶子 他

脳弓下器官の血管による免疫応答時の物質透過制限

第 36 回日本生物学的精神医学会 第 57 回日本神経化学会大会 合同年会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

森田 晶子 他

「脳の窓」感知系脳室周囲器官には血液脳関門の代わりにバリア機構が存在する

第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日-9 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 晶子 (MORITA, Shoko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70647049