

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15448

研究課題名(和文)放射線全脳照射後のマウス大脳における血管消失・血管新生のライブイメージング

研究課題名(英文)Imaging of blood vessels in the normal mouse brain after X-ray irradiation

研究代表者

倉知 正 (KURACHI, Masashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20271546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：成体マウス全脳にX線照射することで急性に血管透過性の亢進が誘導された。血管透過性の亢進とは反対に脳内の血管内皮細胞成長因子VEGFの量は低下した。また、大脳皮質において活性化ミクログリアが顕著に増加し、血管内皮細胞特異的に発現する密着結合タンパク質claudin-5の発現が低下した。遺伝子改変マウス(Flk1-GFP/Flt1-tdsRed BAC Tg)へのX線照射は、脳微小血管におけるGFP陽性の血管内皮細胞の割合を増加させた。二光子顕微鏡を用いたTgマウス大脳のライブ観察により、血管内皮細胞のFlt1およびFlk1の発現度合を反映した明瞭な脳血管像が得られた。

研究成果の概要(英文)：In the normal mouse brain tissue after X-ray irradiation, acute increase of vascular permeability was induced. The amount of vascular endothelial cell growth factor VEGF in the brain decreased. In the X-ray irradiated cerebral cortex, the activated microglia remarkably increased, and the expression of the tight junction protein, claudin-5, which is expressed specifically in vascular endothelial cells, was decreased. X-ray irradiation on Flk1-GFP/Flt1-tdsRed BAC transgenic mice increased the proportion of GFP-positive vascular endothelial cells in brain microvessels. The cerebrovascular images in Tg mouse brain reflecting the expression levels of Flt1 and Flk1 in vascular endothelial cells were obtained using two-photon microscopy.

研究分野：神経科学

キーワード：血管内皮細胞 医学放射線生物学 神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は脳腫瘍に対する重要な治療法の一つであるが、長期的には脱髄や軸索変性による白質障害(白質脳症)や血管閉塞による脳壊死などの重篤な副作用が生じる可能性がある。放射線照射後、脳血管は血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の障害と血管透過性の亢進により特徴づけられる病的状態となる。このような脳血管の病理学的変化は局所虚血や微小出血の原因と考えられ、長期的には患者に神経症状の悪化をもたらす原因となる脳浮腫を伴った進行性の虚血性病変を形成させる。したがって、この病的血管を早期に改善できれば、脳壊死などの重篤な状態に陥ることを抑制できる可能性が高い。しかしながら、放射線照射後の脳における血管の詳細な解析はこれまでなされておらず、有効な治療法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

X線照射による正常脳組織における脳血管の病的変化を解析して放射線障害のメカニズムを明らかにする。また、血管内皮細胞成長因子受容体、VEGF受容体-1(Flt1, VEGFR1)およびVEGF受容体-2(Flk1, VEGFR2)についての遺伝子改変マウス(*Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BACトランスジェニックマウス)を用いて、放射線照射後の血管内皮細胞におけるFlt1とFlk1の発現変化をライブ観察し、病的血管の性質を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

動物実験については群馬大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

遺伝子改変マウス(*Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BACトランスジェニックマウス)および野生型ICRマウス(日本SLC)の8週齢のオスを実験に用いた。

#### (2) X線照射法

麻酔下にてマウスのBregmaより尾側で小脳を除外した脳の局所(図1)に、X線60 Gy(200 kV、14.3 mA、0.5 mm Al +0.5 mm Cu filter、2.54 Gy/min)を上方から照射した。

#### (3) Evans blue 漏出試験

マウスに4% Evans blue 溶液を腹腔内投与(4  $\mu$ l/g)した。投与6時間後、ヘパリンを含むPBSで灌流したのち、脳を摘出、湿重量の2倍容のジメチルホルムアミドに浸して室温で16時間処理した。脳組織をホモジナイズして18,000 $\times$ gで30分間遠心後、上清の吸光度を測定し、検量線からEvans blueの漏出量を算出した。

#### (4) ELISA

マウスを頸椎脱臼で安楽死後、直ちに大脳を摘出した。大脳の湿重量の1.5倍容の溶解バッファーを加えてホモジナイズし、

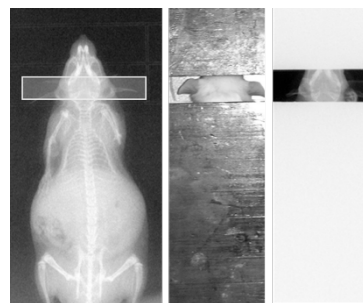


図1. X線照射法

(左)マウス全体のX線透視画像(白枠内が照射野)、(中央)鉛で遮蔽した様子、(右)遮蔽した際の透視画像。

18,000 $\times$ gで15分間遠心分離後、上清を回収して脳サンプルとした。ブラッドフォード法により脳サンプルのタンパク濃度を測定し、各脳サンプルを溶解バッファーで5 mg/mlに調製して実験に用いた。Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit(R&D systems)を推奨プロトコルに従って使用し、各脳サンプルについてVEGF量を定量した。

#### (5) 免疫組織染色

マウスを4%パラホルムアルデヒド(4% PFA)溶液で灌流固定後、脳を摘出、4% PFAで後固定(4 $^{\circ}$ C、1時間)、30%スクロース溶液に置換して4 $^{\circ}$ Cで保管した。OCTコンパウンドに包埋し、クライオスタットで凍結切片(厚さ20  $\mu$ m)を作製、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

凍結切片をPBSで洗浄した後、ブロッキング液により室温で30分間処理した。一次抗体を反応(4 $^{\circ}$ C、一晚)後、二次抗体で処理(室温、90分間)した。

### 4. 研究成果

#### (1) X線照射による血管透過性の亢進

Evans blue 漏出試験により、成体マウスの脳にX線照射(単回、60 Gy)することで血管透過性が亢進し、血中成分が脳実質へ漏出することが確認された(図2)。照射1日後のEvans blue 漏出量は、非照射の漏出量と比較して有

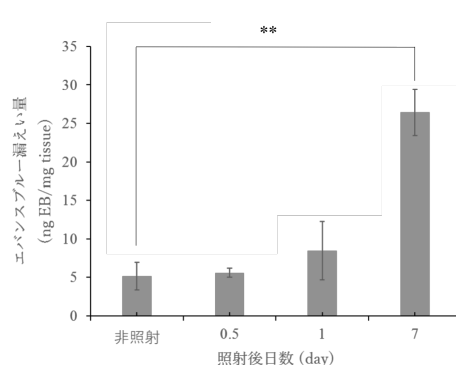


図2. X線照射後のマウス大脳におけるEvans blue 漏出量の変化. \*\* $p < 0.01$ .

意な差は認められなかった。しかしながら、照射後の時間経過にもなって Evans blue 漏出量が増加し、照射 7 日後の漏出量は非照射に比べて約 5 倍に増加した。これらの結果から、X 線照射により急性に血管透過性が亢進した状態が誘導されることが明らかとなった。

(2) X 線全脳照射による脳内 VEGF の発現変化  
血管内皮細胞増殖因子 VEGF (vascular endothelial growth factor) は主に血管内皮細胞の細胞分裂や遊走、分化に関与するが、微小血管の血管透過性を亢進させる作用もつ。X 線照射後の急性期にマウス大脳に認められた血管透過性の亢進に VEGF が関与しているかを調べるために、ELISA により脳内 VEGF を定量した (図 3)。

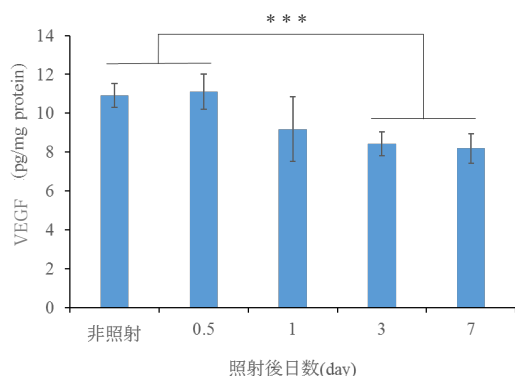


図 3. ELISA 法による X 線照射後のマウス大脳における血管内皮細胞成長因子 VEGF の定量. \*\*\* $p < 0.001$ .

照射 1 日後までの脳内 VEGF 量は、非照射と比較して有意な差を示さなかった。しかし、照射 3 日後以降の脳内 VEGF 量は非照射に比べて約 25% の減少が認められた。

これまでに、正常脳組織において低線量 X 線 (6 Gy) 照射後の急性期に脳内 VEGF 量が増加することが報告されている。しかしながら、本研究で実施された高線量 X 線 (60 Gy) 照射では照射後の急性期において脳内 VEGF 量が減少することから、照射線量に依存して脳内における VEGF 産生が変化することが明らかになった。また、高線量 X 線照射においては血管透過性の亢進に対する VEGF の関与は低いと考えられた。

(3) X 線照射後の脳血管内皮細胞における密着結合タンパク質 claudin-5 の発現変化

X 線照射後のマウス大脳において血管透過性が亢進することから、脳血管内皮細胞特異的に発現する密着結合タンパク質 claudin-5 の局在について免疫組織学的手法を用いて検討した (図 4)。非照射脳において claudin-5 の発現は血管内皮細胞 (CD31+) と一致した局在を示した。しかしながら、X 照射後のマウス大脳においては claudin-5 のシグナルが顕著に低下した。この結果から、X 線照射により脳血管内皮細胞における claudin-5 の発現が低下して密着結合が維持できなくなり、血管透

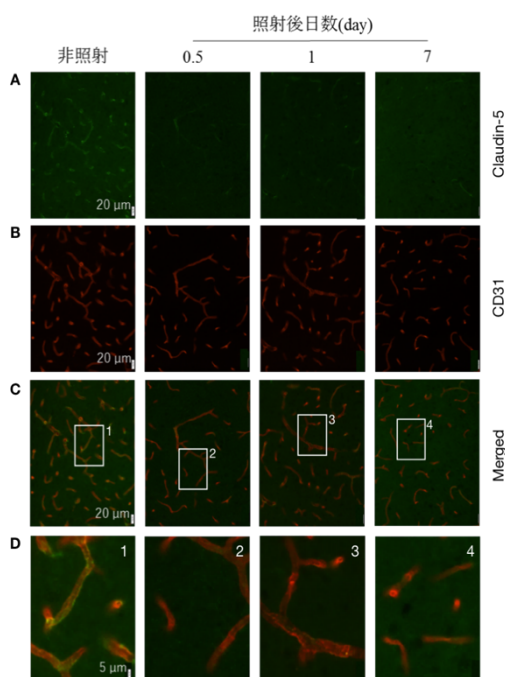


図 4. X 線照射後のマウス大脳血管内皮細胞における claudin-5 の発現変化。

(A) claudin-5, (B) CD31, (C) claudin-5 (green)/CD31 (red), (D) 上段 (C) の ROI 部を拡大。

過性が亢進したと推察された。

(4) X 線照射によるミクログリアの活性化

X 線照射後の血管透過性の亢進にもなって惹起される炎症反応について検討するため、免疫組織学的手法を用いて大脳皮質におけるミクログリアの形態変化と活性化を調べた。ミクログリアのマーカーとして Iba1 を、活性化ミクログリアのマーカーとして CD68 を用いた (図 5)。

非照射マウス大脳皮質に認められるミクログリア (Iba1+) の形態は Ramified 型 (休止状態) であり、CD68 の発現もほとんど認められなかった。一方、X 線照射マウスの大脳皮質においては照射 0.5 日後以降、活性化ミクログリアの典型的な形態である Amoeboid 型を示すミクログリア (Iba1+) が多く認められる

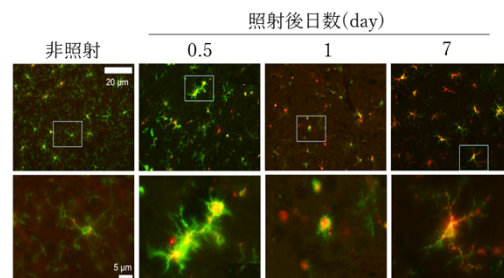


図 5. X 線照射後のマウス大脳におけるミクログリアの形態変化。

Iba1 (緑) と CD68 (赤). 下段は上段の ROI 部を拡大。

ようになった。

形態変化とともに、ミクログリア (Iba1+) における CD68 の発現量は照射 0.5 日後から 7 日後にかけて顕著に増加した。大脳皮質の全ミクログリアに占める活性化ミクログリアの割合は、非照射に比べて、照射 0.5 日後に約 5 倍に増加し、65% 程度であった。照射 7 日後までこの高い割合が維持された (図 6)。

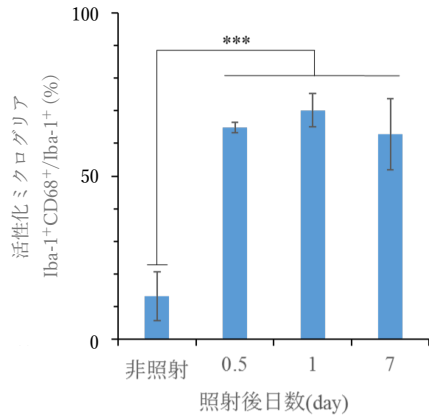


図 6. X 線照射後のマウス大脳におけるミクログリアの活性化。

(5) X 線照射によるマウス大脳皮質における脳微小血管の変化

遺伝子改変マウス (*Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BAC トランスジェニックマウス) を用いて X 線照射後のマウス大脳における脳微小血管の血管密度について検討した (図 7)。

*Flt1-tdsRed* 陽性の血管は血管内皮マーカー-CD31 の局在と完全に一致したことから、全

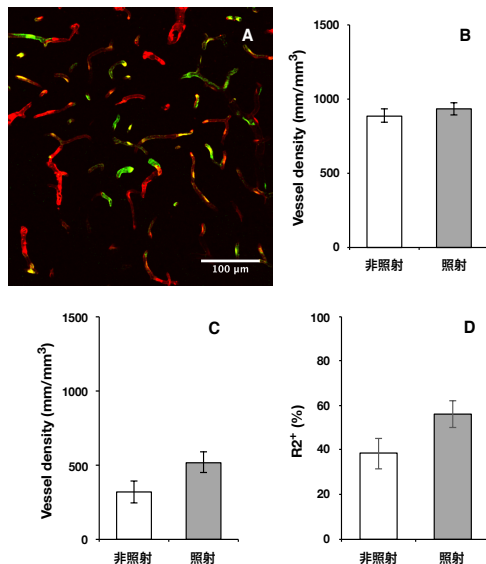


図 7. X 線照射後のマウス大脳皮質における微小血管の変化 (照射後 14 日目)。

(A) *Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BACTg マウス大脳皮質の血管像, (B) *Flt1-tdsRed* (VEGFR1+) 血管密度, (C) *Flk1-GFP* (VEGFR2+) 血管密度, (D) *Flk1-GFP* (VEGFR2+) 陽性の血管内皮細胞の割合。

血管は *Flt1-tdsRed* 陽性であるとした。血管の一部は *Flk1-GFP* を共発現する血管内皮細胞により構成されていた。*Flt1-tdsRed* 陽性の血管を計測することにより血管密度を解析した。X 線照射 14 日後の血管密度は、非照射群と差はなかった。しかしながら、*Flk1-GFP* 陽性の血管内皮細胞により構成される血管の密度は、非照射群と比較して X 線照射群において高くなる傾向を示した。

(6) 二光子顕微鏡を用いた遺伝子改変マウス (*Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BAC トランスジェニックマウス) 大脳皮質における血管の観察

慢性頭窓法により *Flk1-GFP/Flt1-tdsRed* BAC トランスジェニックマウスの大脳をライブ観察することで、血管内皮細胞における *Flt1* (VEGFR1) および *Flk1* (VEGFR2) の発現度を反映した明瞭な脳血管像が得られることを確認した (図 8)。

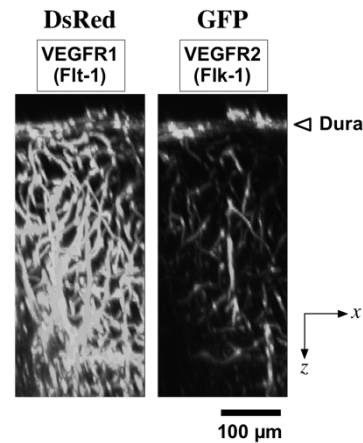


図 8. 二光子顕微鏡による脳血管像。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- Osawa, S., Kurachi, M., Yamamoto, H., Yoshimoto, Y., Ishizaki, Y., Fibronectin on extracellular vesicles from microvascular endothelial cells is involved in the vesicle uptake into oligodendrocyte precursor cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 査読有, 488, 2017, 232-238. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.049
- Kurachi, M., Mikuni, M., Ishizaki, Y., Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells. *PLoS ONE*, 査読有, 11, 2016, e0159158. DOI: 10.1371/journal.pone.0159158
- Miyata, S., Kurachi, M., Sakurai, N., Yanagawa, Y., Ishizaki, Y., Mikuni, M., Fukuda, M., Gene expression alterations in the medial prefrontal

cortex and blood cells in a mouse model of depression during menopause. *Heliyon*, 査読有, 2, 2016, e00222.

DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00222

- ④ Miyata, S., Kurachi, M., Okano, Y., Sakurai, N., Kobayashi, A., Harada, K., Yamagata, H., Matsuo, K., Takahashi, K., Narita, K., Fukuda, M., Ishizaki, Y., Mikuni, M., Blood transcriptomic markers in patients with late-onset major depressive disorder. *PLoS ONE*, 査読有, 11, 2016, e0150262. DOI: 10.1371/journal.pone.0150262
- ⑤ Ijima, K., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Puentes, S., Imai, H., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Ishizaki, Y., Transplanted microvascular endothelial cells promote oligodendrocyte precursor cell survival in ischemic demyelinating lesions. *J. Neurochem.*, 査読有, 135, 2015, 539-50. DOI: 10.1111/jnc.13262

[学会発表] (計 14 件)

- ① Kurachi, M., Osawa, S., Yamamoto, H., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Ishizaki, Y., Extracellular vesicles from vascular endothelial cells promote survival, proliferation and motility of oligodendrocyte precursor cells., The 7th Conference of International Society of Radiation Neurobiology, 2017. 2. 9, 新潟・湯沢.
- ② Sejimo, Y., Yoshida, Y., Takahashi, A., Kurachi, M., Ishizaki, Y., X-ray induced disruption of the blood-brain barrier with the localized change in Claudin5 and the activation of microglia in a normal mouse brain., The 7th Conference of International Society of Radiation Neurobiology, 2017. 2. 9, 新潟・湯沢.
- ③ 石崎泰樹, 倉知 正, 山本華子, 大澤 祥, 好本裕平, 三國雅彦, 血管内皮細胞由来・細胞外小胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖・運動能を促進す

る, 第89回日本生化学会大会,

2016. 9. 27, 仙台.

- ④ 倉知 正, 山本華子, 大澤 祥, 好本裕平, 三國雅彦, 石崎泰樹, Extracellular vesicles from vascular endothelial cells affect the behavior of oligodendrocyte precursor cells, 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会, 2016. 9. 9, 福岡.
- ⑤ 山本華子, 倉知 正, 成瀬雅衣, 柴崎貢志, 石崎泰樹, マウス神経幹細胞に対する生存因子としてのBMP4シグナル経路の解析, 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会, 2016. 9. 10, 福岡.
- ⑥ 石崎泰樹, 山本華子, 倉知 正, 成瀬 雅衣, 柴崎 貢志, BMP4がマウス神経幹細胞の生存を促進する信号伝達系の解析, 第39回日本神経科学大会, 2016. 7. 20, 横浜.
- ⑦ Ishizaki, Y., Iijima, K., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Puentes, S., Imai, H., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Transplantation of brain microvascular endothelial cells stimulates remyelination in the white matter infarct. The 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, 2016. 7. 2-6, Copenhagen, Denmark.
- ⑧ 瀬下幸彦, 吉田由香里, 高橋昭久, 倉知 正, 石崎泰樹, 正常脳組織における放射線障害の微視的解析, The 6th Conference of International Society of Radiation Neurobiology, 2016. 2. 13, 長崎.
- ⑨ 石崎泰樹, 飯島圭哉, 倉知 正, 柴崎貢志, 成瀬雅衣, Sandra Puentes, 今井英明, 好本裕平, 三國雅彦, 脳微小血管内皮細胞移植による虚血性脱髄巣における

再髄鞘化の促進機構の解析, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同年会, 2015. 12. 2, 神戸.

- ⑩ 山本華子, 倉知 正, 成瀬雅衣, 柴崎貢志, 石崎泰樹, A role for BMP4 signaling pathway in mouse neural stem cell survival., 第58回日本神経化学会大会, 2015. 9. 12, 大宮.
- ⑪ 飯島圭哉, 倉知 正, 柴崎貢志, 成瀬雅衣, 好本裕平, 三國雅彦, 石崎泰樹, Brain microvascular endothelial cells promote survival of oligodendrocyte precursor cells., 第58回日本神経化学会大会, 2015. 9. 12, 大宮.
- ⑫ 倉知 正, 三國雅彦, 石崎泰樹, Effect of exosomes derived from vascular endothelial cells on OPC survival, proliferation and motility., 第58回日本神経化学会大会, 2015. 9. 12, 大宮.
- ⑬ 石崎泰樹, 倉知 正, 飯島圭哉, 好本裕平, 三國雅彦, 血管内皮細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞に及ぼす効果の解析, 第38回日本神経科学大会, 2015. 7. 30, 神戸.
- ⑭ Ishizaki, Y., Kurachi, M., Extracellular vesicles from brain microvascular endothelial cell cultures promote survival, proliferation, and motility of oligodendrocyte precursor cells, European Glial Meeting 2015, 2015. 7. 15-18, Bilbao, Spain.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :

出願年月日 :  
国内外の別 :

○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]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉知 正 (KURACHI, Masashi)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 20271546

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし