

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15415

研究課題名（和文）血小板由来増殖因子による脳および髄膜のリモデリング

研究課題名（英文）Remodeling of the brain and meninges by Platelet-derived growth factor

研究代表者

濱島 丈（Hamashima, Takeru）

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：80467092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：血小板由来増殖因子 受容体(PDGFR)の条件的ノックアウトマウス(N-PR -KO)の脳において、PDGFR 陽性血管周囲細胞は日齢の増加とともに髄膜から連続して血管周囲性に脳深部に分布が拡大し、起源が軟膜由来の線維芽細胞perivascular fibroblast (pvF)であることを特定した。シングルセル解析ではpvFが髄膜の軟膜線維芽細胞から脳血管周囲へ誘導される様と、炎症性組織変化に合致した活動性線維芽細胞への変化を抽出した。PDGFR 中和抗体の投与でpvFはborder-associated macrophageの下流で活性化し、炎症性の組織変化に寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害は日本人の死亡原因の上位を占め、死亡率や後遺症の残存率は依然として高く、予後の改善が急務である。

N-PR -KO 脳で血管の脆弱性を確認したところ、IgG leakage の増加が見られたが、blood-brain-barrierの構成成分に変化は認めなかった。血管の脆弱性は旺盛な血管新生に伴うもの、もしくは稀突起膠細胞系譜細胞による保護の欠如に伴うと推測された。N-PR -KO 脳皮質で大幅な炎症性の組織変化が確認された。髄膜の炎症性変化や脳における線維芽細胞の誘導は、多様な中枢神経疾患において報告されており、本研究はこれらの疾患予後改善の治療法確立に寄与するものとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In the brains of conditional knockout mice (N-PR -KO) of platelet-derived growth factor- receptor (PDGFR), PDGFR -positive perivascular cells expanded their distribution from the meninges to the deep brain in a continuous perivascular fashion with increasing daily age, and fibroblasts perivascular fibroblasts (pvF) derived from the perivascular fibroblasts of the soft membrane. Single-cell analysis revealed the induction of pvF from meningeal perivascular fibroblasts and their transformation into active fibroblasts consistent with inflammatory tissue modification. Treatment with PDGFR -neutralizing antibodies activated pvF downstream of border-associated macrophages and contributed to inflammatory tissue modification.

研究分野：実験病理

キーワード：脳血管障害 稀突起膠細胞 血小板由来増殖因子受容体 血管新生

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は、日本人の死亡原因の上位を占めており、その疾患頻度は高い。様々な治療法が展開されてきたが、死亡率や後遺症の残存率は依然として高く、予後の改善が急務である。我々は血小板由来増殖因子 α 受容体 (PDGFR α) の条件的ノックアウトマウス(N-PR α -KO)を開発し、胎児期から生後に亘り PDGFR α が関与する大脳の稀突起膠細胞 (OL) の発生と脳髄鞘化における役割を解析する過程で、生後の脳血管が過剰に形成されるという全く新しい現象を見出した。さらに同マウスでは PDGFR α 陽性を示す血管周囲間質細胞が広範囲に出現することを見出した。また、別の動物モデルにおいても、類似の細胞が PDGFR α 依存的に脳梗塞巣に出現し、血管新生および出血に対する保護作用を有することを確認した。

2. 研究の目的

(1) 血小板由来増殖因子受容体 α (*Pdgfra*) 遺伝子の条件的ノックアウトマウス (N-PR α -KO)で見られた OL 系譜細胞の異常を起点とする過剰な血管新生の機序を解明する。

(2) (1) には PDGFR α 陽性血管周囲細胞が関与することが示唆される。同細胞の起源、動員のメカニズム、血管新生において果たす役割を評価し、その制御を試みる。

(3) 血管新生、PDGFR α 陽性血管周囲細胞をともなった脳皮質の組織変化について解析し、これらの事象が脳神経病態に及ぼす影響についてより広い視点から評価する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物として、N-PR α -KO マウスを用いる。対照群として野生型(WT)マウスを用いる。

(2) 新生血管の増加について、従来の組織切片に加えて、組織を透明化することで三次元構造を含めた解析を行う。その際、既存の N-PR α -KO と *Flt1* 下流で *tdsRed* を発現するマウスを交配することで、観察をより容易にする。また新生される血管の堅牢度の変化の有無についても検討する。

(3) PDGFR α 陽性血管周囲細胞について、組織学的解析、培養、シングルセル解析を併用し、その起源、機能を特定する。これまでに PDGF は間葉系細胞の誘導と関連することを特定しており、併せて PDGFR α 中和抗体を用いた際のこれら血管周囲細胞の動きについて評価する。

(4) N-PR α -KO の脳皮質において、脳実質組織を構成する他の細胞 (アストロサイト、ミクログリア、border-associated macrophage(BAM)) の変化の有無を形態的に評価する。

4. 研究成果

(1) PDGFR α 陽性血管周囲細胞を経時的に観察したところ、生直後はほぼ観察されず、日齢の増加とともに髄膜から連続して血管周囲性に脳深部に分布が拡大することがわかった。またコラーゲン I(COL1)、PDGFR、S100A6、RALDH1、RALDH2 に陽性かつ、血管周皮細胞に陽性となる NG2 は陰性で、これらの起源は軟膜由来の線維芽細胞であることを特定した。以下 perivascular fibroblast (pvF) とする。

RT-PCR を用いて N-PR α -KO , WT マウスの脳組織を比較したところ、N-PR α -KO 脳では *Cxcl12*, *Tgfb1*, *Angpt2* といった線維化、血管新生に関与する因子が高発現していた。これらを受けて免疫染色を行ったところ、CXCL12, TGF の下流で活性化する pSmad2/3, Angiopoietin 2 は pvF に発現していた。また pvF を磁気分離法にて抽出し、培養することで、In Vitro での検証も行った。PDGF リガンドのうち N-PR α -KO 脳で増加していた PDGF-AB, PDGF-BB により培養している pvF を刺激したところ、In Vivo の結果に合致した遺伝子発現の増加を認めた。このことから pvF が組織の線維化、血管新生に関与することが示唆された。

N-PR α -KO 脳で血管の脆弱性について確認したところ、IgG leakage の増加がうかがわれたが、blood-brain-barrier(BBB) の構成成分に明らかな変化は認めなかった。血管の脆弱性については旺盛な血管新生に伴うもの、もしくは OL 系譜細胞による保護が欠如したことに伴うものであると推測された。

形態的に N-PR α -KO 脳皮質には線維芽細胞の誘導や血管新生に続いて、ミクログリア、アストロサイトが増加することが見出された。また線維芽細胞の変化に先行して BAM が増加していた。KO 脳皮質では大幅な炎症性の組織変化が起こっていることが確認された。

PDGFR α 陽性細胞を磁気分離法にて濃縮し、シングルセル解析を行ったところ、N-PR α -KO 脳において pvF が髄膜に分布する軟膜線維芽細胞から血管周囲性への分布を示すものへと誘導されていく様、加えて、炎症性の組織変化に合致した活動性の線維芽細胞への変化が抽出された。また BAM と pvF の間には、既にマクロファージと線維芽細胞の間で報告されている CSF1/PDGF-BB によるサーキットの形成が見いだされ、両者による刺激が N-PR α -KO マウスの脳皮質における慢性炎症性変化に関与していることが示唆された。

PDGFR α 中和抗体を投与したところ pvF の誘導は抑制され、N-PR α -KO 脳皮質における炎症性組織変化が緩和された。BAM については有意な変化を認めず、N-PR α -KO の髄鞘低形成脳皮質において、pvF は BAM の下流で活性化し、炎症性の組織変化に寄与すると考えられた。髄膜における炎症性変化や脳における線維芽細胞の誘導は、多様な中枢神経疾患において報告されており、本研究はこれらの疾患予後改善の治療法確立に寄与するものとなりうる。(Okuno et al., under review)

(2) 血管については脳皮質を透明化し、三次元的な血管構築について解析を施行している。これにより、N-PR α -KO では、WT と比較し、密度のみならず血管構築についても大きな差異があることを見出した。N-PR α -KO の血管を tdsRed にて標識することに成功し、現在より詳細に解析を継続中である。

(3) またこの過程において NPR α -KO の脂肪組織について検索したところ、N-PR α -KO ではより脂肪組織が軽量化していることを見出した。同脂肪細胞について組織学的に検索したところ、高度にベージュ化が誘導されていた。血管周囲性の脂肪前駆細胞(perivascular adipocyte progenitor cell (APC) niche) では Nestin 陽性の PDGFR α 陽性細胞が減少し、一方で脳組織と類似し、Nestin 陰性の PDGFR α 陽性細胞は増加し、結果的に PDGFR α 陽性細胞の総量は N-PR α -KO が WT を上回っていた。PDGFR α シグナルは Nestin 陽性と陰性細胞により調整されており、脂肪のベージュ化、代謝に関与することが示唆された。(2023, Takashima et al.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥野 のり子, 山本 誠士, 濱島 丈, 藤川 美和, 国沢 智巳, 笹原 正清
2. 発表標題 髄鞘低形成脳病変における線維芽細胞のシングルセル解析
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥野 のり子, 山本 誠士, 濱島 丈, Tung Son Dang, 笹原 正清
2. 発表標題 髄膜における反応性変化は髄鞘低形成脳における炎症性組織改変に寄与する
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥野 のり子, 山本 誠士, 濱島 丈, 笹原 正清
2. 発表標題 脳髄鞘低形成マウスモデルにおける線維芽細胞のシングルセル解析
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥野 のり子, 山本 誠士, 濱島 丈, 笹原 正清
2. 発表標題 髄鞘低形成マウス脳病変における血管周囲性線維芽細胞の解析
3. 学会等名 第31回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥野 のり子、山本 誠士、濱島 丈、笹原 正清
2. 発表標題 進行型多発性硬化症の炎症巣におけるPDGFの役割
3. 学会等名 第113回 日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------