

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20005

研究課題名(和文)脳梗塞亜急性期におけるペントラキシン3の作用

研究課題名(英文)Effect of pentraxin 3 in subacute phase of ischemic stroke

研究代表者

新堂 晃大(Shindo, Akihiro)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60422820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経血管ユニットは脳内における血管、神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリア細胞の細胞間連携を考えるうえで重要な枠割を果たしている。脳梗塞後のアストロサイトから発現する炎症性タンパク質であるペントラキシン3(PTX3)に着目し、脳梗塞亜急性期におけるPTX3の役割を検討した。PTX3が血管内皮細胞に対する作用について着目し、ラット脳血管内皮細胞(RBE.4)に対して recombinant PTX3 (rPTX3) を投与したところ、PTX3に血管新生抑制作用があることを確認した。さらにマウス白質梗塞モデルを作成し、亜急性期にPTX3発現を抑制しその効果を確認した。

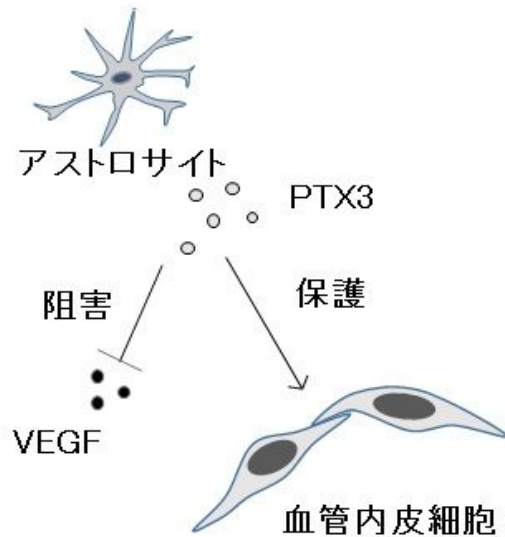
研究成果の概要(英文)：The concept of the neurovascular unit is widely accepted nowadays, since proposed as a conceptual framework for investigating the mechanisms of both blood vessels and brain cells, such as neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Pentraxin 3 (PTX3) upregulates during cerebrovascular diseases. In this study, we examined the hypothesis that PTX3 may have important roles after ischemic stroke in and sub-acute phase, mediate crosstalk between reactive astrocytes and endothelial cells and other types of cells. We added rPTX3 to RBE.4 cells and examined the angiogenic response using in vitro angiogenesis assay. Treatment with rPTX3 might suppress the number of vessel-like structures in vitro. Next, we used siRNA to make the suppression of PTX3 after stroke. Downregulation of PTX3 in sub-acute phase may increase angiogenesis.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳卒中 脳梗塞 炎症 血液脳関門 血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は我が国のみならず世界中において主要な死亡原因の一つであり、さらにその後遺症による要介護状態が社会的な問題となっている。研究代表者は、頸動脈アテローム硬化症において脳梗塞の危険度が高い不安定プラーク患者で血清ペントラキシン 3 (Pentraxin 3, PTX3) 値が有意に上昇していることを示した (Shindo et al. PLoS ONE 2014)。PTX3 は炎症性タンパク質として知られ、大きくは C 反応性蛋白 (CRP) と同じペントラキシンファミリーに属する。PTX3 は抗炎症作用があり、急性心筋梗塞に対しては障害の軽減などが報告されている (Daigo K, et al. Immunology Letters 2014)。ノックアウトマウスを用いた検討では脳卒中後 PTX3 が血液脳関門の保護作用を有し、脳保護に働くことが報告されているが、詳細な機序は不明である。研究代表者は脳内での PTX3 の働きに着目し、脳梗塞急性期に病側で PTX3 の発現が増加し、その主たる発現細胞がアストロサイトであること、PTX3 と出血性病変に負の相関が認められること、培養細胞を用いた検討でアストロサイト由来の PTX3 が血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) の阻害により、タイトジャンクション構成蛋白 (ZO-1、Claudin 5) の発現増加を促し血管内皮の透過性低下に働くことを発見した (Shindo et al. Stroke 2016、図は



同論文より改変)

### 2. 研究の目的

今回、脳梗塞亜急性期における PTX3 の作用に関し、血管内皮細胞などに対する作用を検討し、脳梗塞後、特に亜急性期における PTX3 の作用を明らかにする。

### 3. 研究の方法

血管内皮細胞に対する PTX3 の役割を明らかにする

ラット血管内皮細胞 (RBE.4) を用い、PTX3

製剤 (rPTX3) を投与する。血管新生の評価に tube formation assay を試行し、血管形成に働く作用を確認する。

マウス白質梗塞モデルを用いて脳梗塞後、PTX3 の発現増加を確認する

血管収縮作用を有するエンドセリン 1 (endothelin-1, ET-1) をマウス白質に対し投与し白質梗塞を作成する (Hayakawa K, et al. JCBFM 2015)。

PTX3 siRNA を用いて脳内の PTX3 発現を抑制する

PTX3 siRNA を側脳室内に投与し、PTX3 発現を低下させる。

マウス白質梗塞モデルで PTX3 の発現を亜急性期に抑制し、その効果を確認する

ET-1 による白質梗塞モデルマウスを作成し、亜急性期において PTX3 の発現を抑制することで脳梗塞亜急性期における PTX3 の作用を確認する。

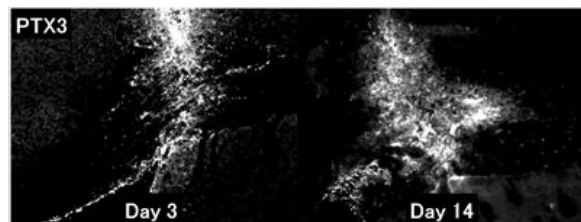
オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC)、神経幹細胞 (NSC) に対する PTX3 の作用を明らかにする

ラット初代培養の OPC、NSC を作成し、rPTX3 の投与を行い、細胞増殖や分化を評価する。

### 4. 研究成果

培養細胞を用いた実験で、rPTX3 を RBE.4 に投与し、細胞外マトリクス (BD マトリゲル TM) を用いた tube formation assay にて血管新生の解析を行ったところ、PTX3 が血管新生を抑制している可能性が明らかとなった。

ET-1 投与後、3 日で白質梗塞が明らかとなり、梗塞周囲のアストロサイトにおいて PTX3 の発現を認めた。さらに梗塞後 14 日においても PTX3 は梗塞周囲に強く発現を認めた (図)。



側脳室内に PTX3 siRNA を投与し、PTX3 の発現変化を確認した。投与後、脳白質を中心に PTX3 の発現低下を投与後 3 日から 7 日まで認めた。

マウス白質梗塞モデルを作成し、亜急性期における PTX3 発現を低下させ、血管新生、出血性病変について変化を検討した。

OPC 初代培養に対して rPTX3 を投与したが、細胞増殖や分化に特に変化を認めなかった。また NSC に対しては現在確認中である。

### 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 12 件)

1. Shindo A, Suzuki K, Iwashita Y, Tomimoto H. Sepsis-Associated Encephalopathy with Multiple Microbleeds in Cerebral White Matter. *Am J Med.* 2018 Mar 9. pii: S0002-9343(18)30199-2 (査読あり)
  2. Maki T, Choi YK, Miyamoto N, Shindo A, Liang AC, Ahn BJ, Mandeville ET, Kaji S, Itoh K, Seo JH, Gelman IH, Lok J, Takahashi R, Kim KW, Lo EH, Arai K. A-Kinase Anchor Protein 12 Is Required for Oligodendrocyte Differentiation in Adult White Matter. *Stem Cells.* 2018 May;36(5):751-760 (査読あり)
  3. Ohtomo R, Bannai T, Ohtomo G, Shindo A, Tomimoto H, Tsuji S, Iwata A. Cilostazol alleviates white matter degeneration caused by chronic cerebral hypoperfusion in mice: Implication of its mechanism from gene expression analysis. *Neurosci Lett.* 2018 Jan 1;662:247-252 (査読あり)
  4. Makoto I, Usui M, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Shindo A, Yamashita Y, Nakatani K, Tamaki S, Tomimoto H, Isaji S. Congenital Thrombophilia in Patients With Superior Mesenteric Venous Thrombosis or Portal Vein Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018 Jan 1:1076029618774146 (査読あり)
  5. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei KI, Akatsu H, Hashizume Y, Akiyama H, Ayaki T, Maki T, Sawamoto N, Takahashi R, Oikawa S, Tomimoto H. Complement Activation in Capillary Cerebral Amyloid Angiopathy. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2017;44(5-6):343-353 (査読あり)
  6. Niwa A, Ii Y, Shindo A, Matsuo K, Ishikawa H, Taniguchi A, Takase S, Maeda M, Sakuma H, Akatsu H, Hashizume Y, Tomimoto H. Comparative Analysis of Cortical Microinfarcts and Microbleeds using 3.0-Tesla Postmortem Magnetic Resonance Images and Histopathology. *J Alzheimers Dis.* 2017;59(3):951-959 (査読あり)
  7. Ishikawa H, Shindo A, Ii Y, Niwa A, Matsuura K, Kishida D, Tomimoto H. Mediterranean fever gene mutations in patients with possible neuro-Sweet disease: a case series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Nov 24. pii: jnnp-2017-316667 (査読あり)
  8. Egawa N, Shindo A, Liang AC, Du Y, Xing C, Lo EK, Itoh K, Kinoshita H, Maki T, Takahashi R, Sudo R, Spector M, Lok J, Arai K. A Novel Three-Dimensional Culture System for Oligodendrocyte Precursor Cells. *Stem Cells Dev.* 2017 Jul 15;26(14):1078-1085 (査読あり)
  9. Matsuyama H, Ii Y, Maeda M, Umino M, Ueda Y, Tabei KI, Kida H, Satoh M, Shindo A, Taniguchi A, Takahashi R, Tomimoto H. Background and distribution of lobar microbleeds in cognitive dysfunction. *Brain Behav.* 2017 Oct 16;7(11):e00856 (査読あり)
  10. Shindo A, Maki T, Mandeville ET, Liang AC, Egawa N, Itoh K, Itoh N, Borlongan M, Holder JC, Chuang TT, McNeish JD, Tomimoto H, Lok J, Lo EH, Arai K. Astrocyte-Derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity Under Acute Phase of Stroke. *Stroke.* 2016 Apr;47(4):1094-100 (査読あり)
  11. Liang AC, Mandeville ET, Maki T, Shindo A, Som AT, Egawa N, Itoh K, Chuang TT, McNeish JD, Holder JC, Lok J, Lo EH, Arai K. Effects of Aging on Neural Stem/Progenitor Cells and Oligodendrocyte Precursor Cells After Focal Cerebral Ischemia in Spontaneously Hypertensive Rats. *Cell Transplant.* 2016;25(4):705-14 (査読あり)
  12. Itoh K, Maki T, Shindo A, Egawa N, Liang AC, Itoh N, Lo EH, Lok J, Arai K. Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. *Neurosci Res.* 2016 May;106:66-9 (査読あり)
- [学会発表](計 4件)
1. Shindo A, Maki T, Egawa N, Liang AC, Itoh K, Lo EH, Arai K, Tomimoto H. Pentraxin 3 supports blood-brain barrier integrity after ischemic stroke. World Congress of Neurology 2017年9月16-21日
  2. Shindo A, Maki T, Egawa N, Itoh K, Liang AC, Lo EH, Arai K, Tomimoto H. Astrocyte-derived Pentraxin 3 Supports Blood-Brain Barrier Integrity after ischemic stroke. Asian and Oceanian Congress of Neurology 2016年8月18-21日 Kuala Lumpur, Malaysia.
  3. 新堂晃大、眞木崇州、Anna C. Liang、Eng H Lo、荒井健、富本秀和. アストロサイト由来のペントラキシン3は脳梗塞急性期に血液脳関門を保護する. 日本脳卒中学会総会 2016年4月14-16日
  4. Shindo A, Maki T, Mandeville ET, Liang AC, Egawa N, Itoh K, Itoh N, Lok J, Lo EH, Arai K, Tomimoto H. Astrocytic

pentraxin 3 supports blood-brain  
barrier integrity under acute phase of  
ischemic stroke . 日本神経学会 2016  
年 5 月 18-21 日

〔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  
なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

新堂 晃大 (SHINDO, Akihiro)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60422820

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

富本 秀和 (TOMIMOTO, Hidekazu)  
三重大学 大学院医学系研究科 神経病態内  
科学 教授

ARAI, Ken

マサチューセッツ総合病院