

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02522

研究課題名(和文) 血管内皮細胞由来エクソソームを利用する脱髄疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of curative therapies for demyelinating diseases utilizing exosomes from vascular endothelial cells

研究代表者

石崎 泰樹 (ISHIZAKI, YASUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90183003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞由来エクソソームの膜表面に存在するPDGF-Bがオリゴデンドロサイト前駆細胞に存在するPDGF受容体を介してオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進することを明らかにした。これは血管内皮細胞由来エクソソームの脱髄軸索・再髄鞘化促進効果の一部はPDGF-Bを介することを強く示唆する結果である。

またiPS細胞から造り出した血管内皮細胞iVECs移植も脳微小血管内皮細胞移植と同様の脱髄軸索・再髄鞘化促進効果を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中高年初発うつ病では、MRI画像上、深部白質の高信号がしばしば認められ、脱髄変化を反映していると考えられている。大脳白質病変は他に認知障害や歩行障害などとも関連性が示されている。また大脳白質病変は経過とともに進行する例が多く、改善することはないとされている。この脱髄変化に対して有効な治療法が開発されれば、中高年初発うつ病、認知障害、歩行障害の予防法や治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。本研究により得られた成果は白質梗塞等の脱髄疾患一般の治療戦略開発の基盤となる知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found PDGF-B localized on the outer surface of the exosomes from cerebral microvascular endothelial cells (MVECs) promotes proliferation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs). This result strongly suggests that the beneficial effect of MVEC transplantation on white matter infarct is mediated by PDGF signaling.

We also found that transplantation of vascular endothelial cells generated from human iPS cells (iVECs) increased the number of OPCs, reduced inflammation, and greatly enhanced remyelination of demyelinated axons in white matter infarct.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：血管内皮細胞 白質梗塞 エクソソーム 移植 オリゴデンドロサイト ミエリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

中高年初発うつ病では、MRI画像上、深部白質の高信号がしばしば認められ、脱髄変化を反映していると考えられている。大脳白質病変は他に認知障害や歩行障害などとも関連性が示されている。また大脳白質病変は経過とともに進行する例が多く、改善することはないとされている。この脱髄変化に対して有効な治療法が開発されれば、中高年初発うつ病、認知障害、歩行障害の予防法や治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。研究代表者は、虚血性白質障害の治療法の開発を目指す過程で、脳微小血管内皮細胞を大脳内包梗塞巣に移植すると脱髄した軸索の再髄鞘化が劇的に促進されることを見出した (Puentes *et al.*, *Brain Res.* **1469**: 43-53, 2012)。さらにこの促進効果において血管内皮細胞由来のエクソソームが重要な役割を果たすことを明らかにした (Kurachi *et al.*, *PLoS one* **11**: e0159158, 2016)。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの研究成果を基盤として研究期間内に以下の3点を達成することを目的とした。

(1) 血管内皮細胞由来のエクソソームに含有される脱髄軸索・再髄鞘化促進分子を同定する。

(2) (1) で解明した脱髄軸索・再髄鞘化促進分子が白質梗塞のみならず他の脱髄疾患モデルにおける脱髄軸索の再髄鞘化に対する治療戦略構築においても有効であることを実証する。

また研究実施の過程で、血管内皮細胞移植を臨床応用する際にiPS細胞を利用すれば、移植に用いる細胞数を充分量確保できること、免疫学的拒絶反応を回避することができることに思い至り、新たな目的を追加した。

(3) iPS細胞を血管内皮細胞に分化させ、このiPS細胞由来血管内皮細胞 (iVECs) 移植が白質梗塞に及ぼす効果を検証する。

以上より、白質梗塞等の脱髄疾患一般の治療戦略開発の基盤となる知見を獲得することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物

本研究ではSDラットを用いた。オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) 調製には生後1~2日目の幼弱ラットを、白質梗塞モデル作製及び脳微小血管内皮細胞 (MVECs) 調製には成体ラットを用いた。動物実験は国立大学法人群馬大学動物実験安全管理規程に従って行った。

(2) 細胞培養

①OPCsの調製

生後1~2日目の幼弱ラット大脳をパパイニンで処理して得られた細胞から RAN-2、抗ガラクトセレブロシド、O4抗体を用いた immunopanning により調製した。

②MVECsの調製

成体ラット大脳をディスパーゼ/コラゲナーゼで処理し、パーコール密度勾配遠心で得られた微小血管をピュロマイシン (周皮細胞の増殖を抑制する作用を有する) 含有培地中 I 型コラーゲンでコートした培養皿上に播種し、内皮細胞を調製した。

③iVECsの調製

ヒト iPS 細胞株 (WiCell 社から購入) から既報 (Lippmann *et al.*, *Nature Biotechnol.* **8**: 783-791, 2012) に従って調製した。

④その他の細胞

ラット線維芽細胞由来 Rat-1 (University College London の Martin Raff 研より供与) を用いた。

(3) エクソソームの調製

MVECs 及び Rat-1 をエクソソーム除去ウシ胎仔血清含有培地で 72 時間培養して得られた培養上清からエクソソーム沈殿溶液 (Exo-Quick-TC) を用いて調製した。

(4) 大脳白質梗塞モデル

成体ラット大脳の内包に強力な血管収縮作用を持つエンドセリン 1 (ET-1) を定位的に注射し、白質梗塞を誘導、MRI で内包に梗塞が生じている動物のみを実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞由来のエクソソームに含有される脱髄軸索・再髄鞘化促進分子の同定

Rat-1 由来エクソソームは OPCs の生存・増殖・運動能促進効果が認められないことを明らかにしている (Kurachi *et al.*, *PLoS one* **11**: e0159158, 2016)、MVECs 由来エクソソームに含有されるタンパク質と Rat-1 由来エクソソームに含有されるタンパク質を質量分析により比較し、MVECs 由来エクソソームのみに含まれるタンパク質およそ 800 種の中に、OPCs の増殖を促進することが知られている PDGF-B が存在することを見出した。またこの PDGF-B はエクソソーム膜の表面に存在することを免疫電顕法で確認した。さらに MVECs 由来エクソソームを培養 OPCs に投与する際に、抗 PDGF-B 中和抗体を添加するとエクソソームの MVECs 増殖促進効果が抑制されることを見出した。また PDGF 受容体キナーゼ阻害薬によってもエクソソームの MVECs 増殖促進効果が抑制されることを見出した。以上より MVECs 由来エクソソームの膜表面に存在する PDGF-B が脱髄軸索・再髄鞘化促進分子の有力な候補であることを明らかにした。

(2) (1) で解明した脱髄軸索・再髄鞘化促進分子が白質梗塞のみならず他の脱髄疾患モデルにおける脱髄軸索の再髄鞘化に対する治療戦略構築においても有効であることの実証

(1) の分子同定に時間がかかったため、他の脱髄疾患モデルにおいても PDGF-B が有効であるかの検討は十分に進めることができなかった。

(3) iPS 細胞由来血管内皮細胞 (iVECs) 移植が白質梗塞に及ぼす効果の検証

Lippmann らが開発した方法 (Lippmann *et al.*, *Nature Biotechnol.* **8**: 783-791, 2012) でヒト iPSCs から作り出した血管内皮細胞は、典型的な内皮細胞様の形態を示し、CD 31、vWF、VE-cadherin などの内皮細胞特異的マーカー及び occludin、zonula occludens-1 (ZO-1)、claudin 5、GLUT-1 などのタイト結合タンパク質を発現、アセチル化 LDL 取り込み能を有し、VEGF 存在下にチューブ形成能を示した。これらの結果から、真正な血管内皮細胞しかも微小血管内皮細胞に近い血管内皮細胞 (iVECs) を得ることに成功したことが確認された。

大脳白質梗塞モデルラットの IC に ET-1 を注射して虚血性白質梗塞を誘導した 7 日後に、白

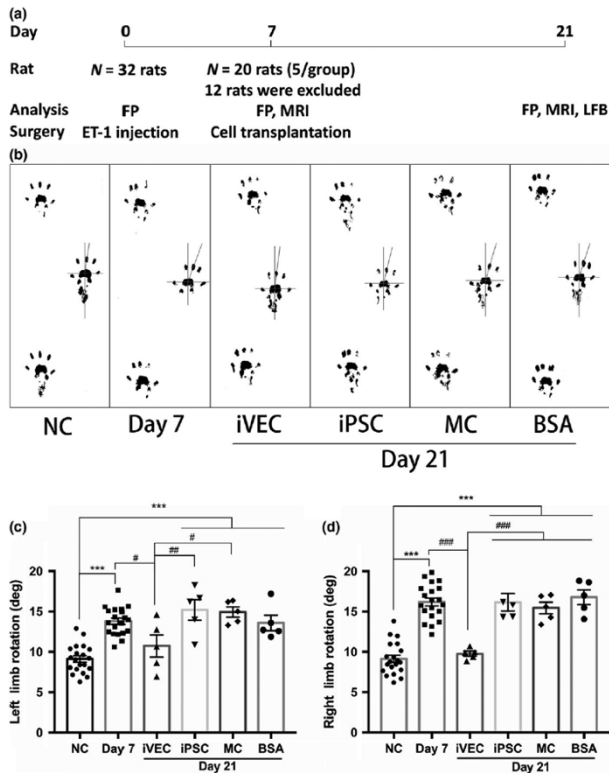


図 1 ①
 (a) 実験デザイン。(b)フットプリントテスト。(c) 左足の検証結果。(d) 右足の検証結果。

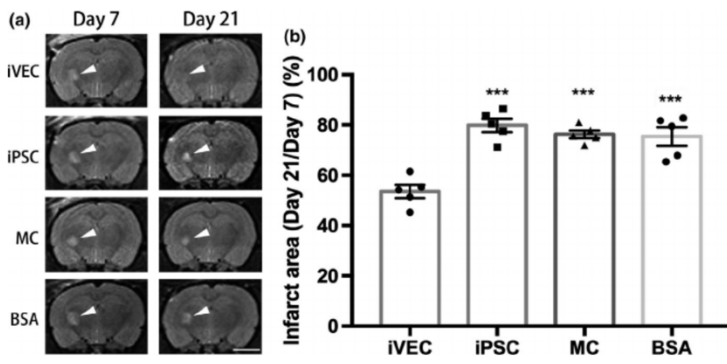


図 2 ①
 (a) MRI 画像。(b) 梗塞面積。

質梗塞部位に iVECs を定位的に移植したところ、ヒトの iPSCs そのものやラット髄膜細胞 (MCs) 移植と比べ、ラットの歩行障害が有意に改善することが明らかになった (図 1)。

核磁気共鳴イメージング法 (MRI、図 2) や Luxol Fast Blue (LFB) による髄鞘染色によって評価したところ、iVECs 移植によって、梗塞巣の面積が縮小し、脱髄軸索の再髄鞘化が劇的に促進されることが明らかになった。さらに、iVECs を移植したラット大脳白質では OPCs の細胞数が増加することが明らかになった (図 3)。以上より、iPS 細胞から造り出した血管内皮細胞 iVECs 移植により、白質梗塞巣の脱髄軸索の再髄鞘化が強力に促進されることが明らかになった。

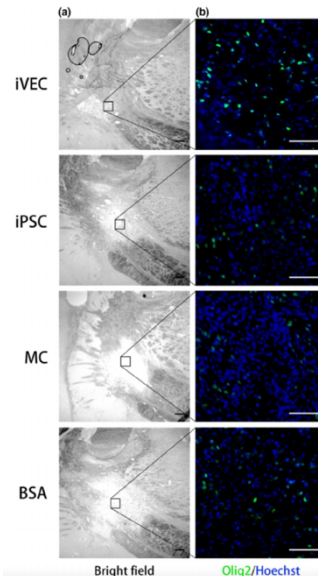


図 3 ①
 (a) 明視野顕微鏡像。(b) 抗 Olig2 (OPCs マーカー) 蛍光抗体染色像。

本研究により、血管内皮細胞由来エクソソームの膜表面に存在する PDGF-B がエクソソームの脱髄軸索再髄鞘化促進効果に寄与すること、iPS 細胞から造り出した血管内皮細胞 iVECs 移植も脳微小血管内皮細胞移植と同様の効果を持つことが明らかになった。これらの結果は白質梗塞等の脱髄疾患一般の治療戦略開発の基盤となる知見であると考えられる。

<引用文献>

① Xu, B., Kurachi, M., Shimauchi-Ohtaki, H., Yoshimoto, Y., Ishizaki, Y. Transplantation of iPS-derived vascular endothelial cells improves white matter ischemic damage. *J. Neurochem.* **153**: 759-771 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki	4. 巻 153
2. 論文標題 Transplantation of iPS derived vascular endothelial cells improves white matter ischemic damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 759 ~ 771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hosoi Nobutake, Shibasaki Koji, Hosono Mayu, Konno Ayumu, Shinoda Yo, Kiyonari Hiroshi, Inoue Kenichi, Muramatsu Shin-ichi, Ishizaki Yasuki, Hirai Hirokazu, Furuichi Teiichi, Sadakata Tetsushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Deletion of Class II ADP-Ribosylation Factors in Mice Causes Tremor by the Nav1.6 Loss in Cerebellar Purkinje Cell Axon Initial Segments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6339 ~ 6353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2002-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibasaki Koji, Yamada Katsuya, Miwa Hideki, Yanagawa Yuchio, Suzuki Michiyasu, Tominaga Makoto, Ishizaki Yasuki	4. 巻 100
2. 論文標題 Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 274 ~ 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0335-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oda Mai, Yamamoto Hanako, Matsumoto Hidetaka, Ishizaki Yasuki, Shibasaki Koji	4. 巻 100
2. 論文標題 TRPC5 regulates axonal outgrowth in developing retinal ganglion cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 297 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0347-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimauchi-Ohtaki, H. Kurachi, M. Naruse, M. Shibasaki, K. Sugio, S. Matsumoto, K. Ema, M. Yoshimoto, Y. Ishizaki, Y.	4. 巻 692
2. 論文標題 The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Fik1-GFP mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 70-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, H. Kurachi, M. Naruse, M. Shibasaki, K. Ishizaki, Y.	4. 巻 496
2. 論文標題 BMP4 signaling in NPCs upregulates Bcl-xL to promote their survival in the presence of FGF-2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 588-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 倉知正、徐彬、大澤祥、松崎利行、好本裕平、石崎泰樹
2. 発表標題 脳微小血管内皮細胞由来の細胞外小胞の表面に存在するPDGF-BIはオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimauchi-Otaki Hiroya, Kurachi Masashi, Naruse Masae, Shibasaki Koji, Sugio Shouta, Matsumoto Ken, Ema Masatsugu, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 The dynamics of revascularization after white matter infarction monitored in Flt1-tdsRed and Fik1-GFP mice.
3. 学会等名 The 29th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishizaki Yasuki, Kurachi Masashi, Xu Bin, Matsuzaki Toshiyuki
2. 発表標題 A role for PDGF-B in the stimulatory effect of exosomes from cerebral microvascular endothelial cells on proliferation of oligodendrocyte precursor cells.
3. 学会等名 The 14th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Hanako, Kurachi Masashi, Shibasaki Koji, Naruse Masae, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Calpain/calpastatin system plays a role for control of NPC survival via cleavage of Bax.
3. 学会等名 Neuro 2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurachi Masashi, Xu Bin, Osawa Sho, Matsuzaki Toshiyuki, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 PDGF-B in the extracellular vesicles from brain microvascular endothelial cells promotes proliferation of oligodendrocyte precursor cells.
3. 学会等名 Neuro 2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Effect of transplantation of iPS-derived vascular endothelial cells on white matter infarct.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xu Bin, Kurachi Masashi, Shimauchi-Ohtaki Hiroya, Yoshimoto Yuhei, Ishizaki Yasuki
2. 発表標題 Transplantation of iPS-derived vascular endothelial cells ameliorates white matter infarct
3. 学会等名 The 10th Conference of International Society of Radiation Neurobiology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成瀬雅衣 柴崎貢志 島内寛也 石崎泰樹
2. 発表標題 局所脱髄によって活性化されたミクログリアは脳室下層よりOPC産生を誘導する
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本華子 倉知正 成瀬雅衣 柴崎貢志 石崎泰樹
2. 発表標題 A role for Bax in control of NPC apoptosis by combined FGF2 and BMP4 signaling
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018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
連携研究者	柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI) (20399554)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	倉知 正 (KURACHI MASASHI) (20271546)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	
連携研究者	成瀬 雅衣 (NARUSE MASAE) (60455219)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	
連携研究者	山本 華子 (YAMAMOTO HANAKO) (00332370)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	

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