

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09511

研究課題名(和文)細胞外マトリックスperlecanによる脳血管障害の新規修復治療法の開発

研究課題名(英文)Development of tissue repair treatment for cerebrovascular disease using extracellular matrix protein perlecan

研究代表者

中村 晋之(Nakamura, Kuniyuki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80713742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は脳血管障害における組織修復・機能回復の機序を明らかとすることである。基底膜を構成する細胞外マトリックス(ECM)蛋白perlecanに着目し、脳梗塞における組織修復過程を検討した。Perlecanは血液脳関門の維持に関わる他、梗塞巣周囲への脳血管ペリサイトの遊走に参与することを明らかとした。さらに脳梗塞後の組織修復過程ではペリサイトが起点となり、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化による再髄鞘化やマクロファージによるミエリンデブリスの貪食が促進された。脳梗塞後の組織修復の促進には、neurovascular unit各細胞とECM蛋白の相互作用が重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害はその後遺症によって寝たきりの原因となる大きな要因であり、急性期治療後の機能回復をもたらす治療の開発は重要である。脳は神経だけでなく、血管系、グリアなどの種々の細胞や細胞外マトリックス(ECM)蛋白などから構成される。本研究課題ではECM蛋白perlecanが、脳梗塞後の血液脳関門の維持や脳血管ペリサイトの活性化をもたらし、ペリサイトを起点として組織修復、機能回復が進むことを明らかにした。今回見出した細胞同士、あるいは細胞-ECM間の相互作用および組織修復機序は、脳梗塞治療の新たな分子標的の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to clarify the mechanism underlying tissue repair and functional recovery after cerebrovascular diseases. We investigated the tissue repair process in ischemic stroke, focusing on an extracellular matrix (ECM) protein, perlecan, which constitutes the basement membrane. Perlecan was involved in the maintenance of the blood-brain barrier (BBB) and also in the migration of cerebrovascular pericytes around the infarct lesion. Furthermore, we found that pericytes regulated tissue repair through remyelination by oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) differentiation and phagocytosis of myelin debris by macrophages. Reciprocal interactions among pericytes, OPCs, macrophages and ECM proteins are important for post-stroke tissue repair and functional recovery.

研究分野：脳血管障害

キーワード：ペリサイト 細胞外マトリックス 脳梗塞 組織修復 血液脳関門 慢性虚血 再髄鞘化

1. 研究開始当初の背景

近年、急性期脳梗塞に対して血管内治療やrt-PA静注療法などの急性期治療が進歩し、救命率の向上や後遺症の軽減がもたらされているものの、脳血管障害は未だ死因や寝たきりとなり介護を必要とする最大の要因の一つとなっている。後遺症としての機能障害を回復させる治療法の開発を進めるにあたってneurovascular unit (NVU)の修復機構を標的とした治療を確立する必要がある。NVUは内皮細胞、基底膜、ペリサイト、アストロサイト足突起、細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)から構成され、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を構成し中枢神経系の保護と恒常性の維持に関与する。

脳組織傷害後のNVUの再構築にはNVU構成因子それぞれが寄与する役割ならびに相互作用を考慮する必要がある。我々はこれまでマウス脳梗塞モデルなどを用いて、脳梗塞後に生じるBBBの破綻の機序や修復過程について研究を進めてきた。特に脳血管ペリサイトに発現する血小板由来成長因子受容体(platelet-derived growth factor receptor β ; PDGFR β)に着目し、遺伝子改変マウスや培養細胞を用いた検討によって、ペリサイトの脱落がBBBの破綻と血管透過性の亢進に関与していること、脳梗塞後にPDGFR β 陽性の線維芽細胞様ペリサイトが梗塞巣周囲に増加し、組織修復に関与している可能性などを明らかとしてきた^{1,4}。

一方、細胞外マトリックス蛋白の中で、特にヘパラン硫酸プロテオグリカンperlecanは血管内皮細胞から産生される、主要な血管基底膜構成蛋白である。Perlecanは種々の成長因子と結合し細胞内シグナルを制御することで多彩な生物機能を有する。申請者らはperlecanが脳血管において内皮細胞・ペリサイト間の基底膜に存在することに着目し、両細胞間の密な相互作用に関与し、NVU再構築の足場として組織修復を促進する重要な蛋白である可能性があるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では 1. NVU の再構築において ECM、特に perlecan が NVU を構成する各細胞に及ぼす影響および作用機序、2. ECM 蛋白、特に perlecan fragment 蛋白の投与によって脳梗塞急性期治療以降に病態改善がもたらされうるかどうか、さらには 3. NVU を構成する各細胞同士の組織修復時に生じる相互作用について検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス

Conventional perlecan knockout mice は軟骨形成不全により胎生致死となり、過去 perlecan の機能抑制実験には大きな制限があった。しかし、我々が本研究で使用する、軟骨特異的に perlecan を発現させた lethality rescue KO-TG mice (Perlecan KO) では各臓器における perlecan の機能解析が可能である⁵⁻⁶。

同様に Conventional PDGFR β knockout mice も血管の発生に異常を来し胎生致死となる。本研究課題ではペリサイト機能が減弱した *Pdgfr β* ^{+/-}マウスを用いる⁷。

(2) 脳梗塞モデル

ナイロン糸を用いて血管内を閉塞後、再灌流させる一過性脳虚血モデル(transient middle cerebral artery occlusion: tMCAO)および中大脳動脈を直視下に結紮切断する永久閉塞モデル(permanent middle cerebral artery occlusion: pMCAO)を行う。組織学的あるいは神経機能的な評価を行う。

(3) 培養細胞を用いた機序の解明

脳血管ペリサイト、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、マクロファージなどを培養し、遺伝子プロファイルの変化、接着能、遊走能、貪食能の評価などを行う。

(4) Perlecan fragment 蛋白の作製

Perlecan のコア蛋白のうち生理活性の高い C 末端側の domain V を精製し、細胞との接着・遊走に及ぼす影響やマウスへの投与を行い、脳梗塞後の組織修復への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) Perlecan は脳梗塞後の BBB の維持ならびに組織修復の起点となるペリサイト活性化を促進する

ECM 蛋白 perlecan が脳梗塞後の BBB の破綻、ペリサイト活性化、修復機構にどのような影響を及ぼすか、遺伝子改変マウスを用いて検討した。Perlecan KO マウスでは脳梗塞のサイズおよび BBB の破綻の増悪がみられた。一方、perlecan KO マウスでは、脳梗塞後に生じるペリサイトの遊走・集簇が抑制された。

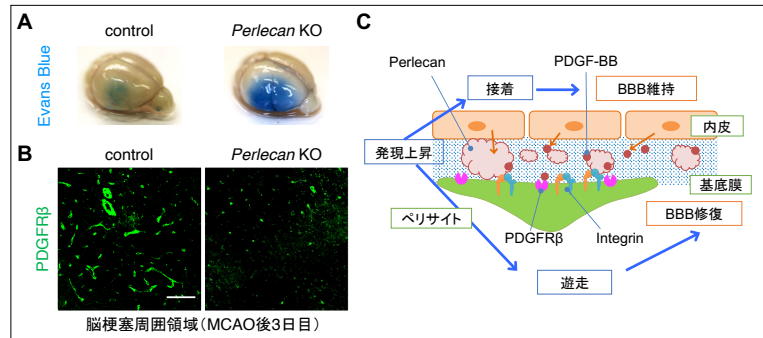


図1: PerlecanによるBBBの維持とペリサイト活性化

A. 脳梗塞(MCAO)後のBBBの破綻 (Evans Blueの漏出) はPerlecan KOマウスで増加した。
B. Perlecan KOマウスでは梗塞巣およびその周囲へのペリサイトの誘導が抑制された。
C. PerlecanによるBBBの維持と修復のメカニズム。

培養細胞を用いた検討では perlecan C 末端側フラグメントである domain V (DV)が、ペリサイト上の integrin $\alpha 5$ を介して接着および PDGF シグナルの活性化をもたらし、ペリサイト遊走をもたらすことを明らかとした。さらに、脳梗塞後に perlecan DV を投与すると投与蛋白は梗塞巣に蓄積し、梗塞サイズの縮小やペリサイト活性化がもたらされる可能性が示唆された。本研究は *J Cell Biol* 誌に報告した⁸。

(2) ペリサイト-アストロサイト-オリゴデンドロサイト前駆細胞の連関が脳梗塞後の組織修復を促進する

Pdgfrb^{+/-} マウスでは、脳梗塞後に生じる脳軟膜動脈新生および梗塞内部の血管新生が抑制されることによって梗塞内部の脳血流回復が減弱し、組織修復は有意に障害された。ペリサイト機能を減弱させた *Pdgfrb*^{+/-} マウスでは梗塞周囲アストログリーシスも減弱し、ペリサイトがアストロサイトの STAT3 活性化に関与していた。梗塞周囲にお

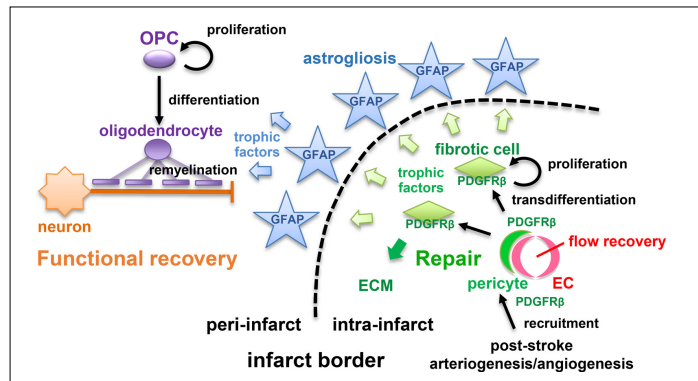


図2: NVU連関による組織修復・機能回復

ける oligodendrocyte precursor cells (OPCs)の分化および髄鞘化応答は *Pdgfrb*^{+/-} マウスで減弱していた。以上より、PDGFRβ を介したペリサイトによる梗塞内線維性修復は、急性期脳梗塞後の梗塞周囲アストログリーシスおよびオリゴデンドロサイト新生を促進することで神経機能回復を促進する可能性が示唆された。本研究は *eNeuro* 誌に報告した⁹。

(3) ペリサイトは脳梗塞後のマクロファージによるミエリンデブリスの貪食を促進する

脳梗塞組織修復の過程においてペリサイトとマクロファージは近い動態を示す。*Pdgfrb*^{+/-}マウスでは、梗塞内に浸潤するマクロファージが抑制され、さらに、ミエリンデブリスの貪食が抑制された。ペリサイト-マクロファージ間の連関により梗塞組織のクリアランスが促され、組織修復が進む可能性が考えられた。本研究は

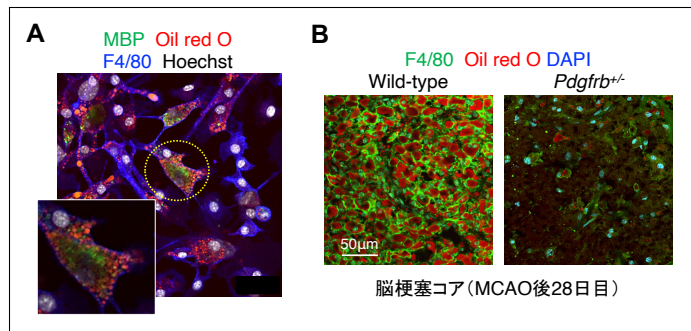


図3: マクロファージによるミエリンデブリスの貪食

A. 培養マクロファージによるミエリンデブリスの貪食。
B. 梗塞巣におけるミエリンデブリスの貪食 (MCAO後28日目) は*Pdgfrb*^{+/-}マウスで減弱した。

Stroke 誌に報告した¹⁰。これらの一連の細胞間相互作用には、各々種々の ECM 蛋白が関与している可能性が考えられ、現在検討を行っている(投稿中)。

<引用文献>

1. Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T. PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res*. 2012 Feb;9(1):1-9.
2. Ishitsuka K, Ago T, Arimura K, Nakamura K, Tokami H, Makihara N, Kuroda J, Kamouchi M, Kitazono T. Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res*. 2012 May;83(3):352-9.
3. Makihara N, Arimura K, Ago T, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kuroda J, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T. Involvement of platelet-derived growth factor receptor β in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. *Exp Neurol*. 2015; 264:127-34.
4. Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, Tachibana M, Yoshikawa Y, Makihara N, Wakisaka Y, Kuroda J, Kamouchi M, Ooboshi H, Kitazono T, Ago T. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic stroke. *Brain Res*. 2016;1630:98-108.
5. Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet*. 1999;23(3):354-8.
6. Xu Z, Ichikawa N, Kosaki K, Yamada Y, Sasaki T, Sakai LY, Kurosawa H, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition. *Matrix Biol*. 2010;29(6):461-70.
7. Tachibana M, Ago T, Wakisaka Y, Kuroda J, Shijo M, Yoshikawa Y, Komori M, Nishimura A, Makihara N, Nakamura K, Kitazono T. Early Reperfusion After Brain Ischemia Has Beneficial Effects Beyond Rescuing Neurons. *Stroke*. 2017;48(8):2222-30.
8. Nakamura K, Ikeuchi T, Nara K, Rhodes CS, Zhang P, Chiba Y, Kazuno S, Miura Y, Ago T, Arikawa-Hirasawa E, Mukouyama YS, Yamada Y. Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. 2019;218(10):3506-3525.
9. Shibahara T, Ago T, Nakamura K, Tachibana M, Yoshikawa Y, Komori M, Yamanaka K, Wakisaka Y, Kitazono T. Pericyte-Mediated Tissue Repair through PDGFR β Promotes Peri-Infarct Astroglia, Oligodendrogenesis, and Functional Recovery after Acute Ischemic Stroke. *eNeuro*. 2020;7(2). pii: ENEURO.0474-19.2020.
10. Shibahara T, Ago T, Tachibana M, Nakamura K, Yamanaka K, Kuroda J, Wakisaka Y, Kitazono T. Reciprocal Interaction Between Pericytes and Macrophage in Poststroke Tissue Repair and Functional Recovery. *Stroke*. 2020;51(10):3095-3106.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibahara Tomoya, Ago Tetsuro, Nakamura Kuniyuki, Tachibana Masaki, Yoshikawa Yoji, Komori Motohiro, Yamanaka Kei, Wakisaka Yoshinobu, Kitazono Takanari	4. 巻 7
2. 論文標題 Pericyte-Mediated Tissue Repair through PDGFR Promotes Peri-Infarct Astrogliosis, Oligodendrogenesis, and Functional Recovery after Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0474~
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0474-19.2020	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 Shibahara Tomoya, Ago Tetsuro, Tachibana Masaki, Nakamura Kuniyuki, Yamanaka Kei, Kuroda Junya, Wakisaka Yoshinobu, Kitazono Takanari	4. 巻 51
2. 論文標題 Reciprocal Interaction Between Pericytes and Macrophage in Poststroke Tissue Repair and Functional Recovery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 3095~3106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/STROKEAHA.120.029827	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 Nakamura Kuniyuki, Ikeuchi Tomoko, Nara Kazuki, Rhodes Craig S., Zhang Peipei, Chiba Yuta, Kazuno Saiko, Miura Yoshiki, Ago Tetsuro, Arikawa-Hirasawa Eri, Mukouyama Yoh-suke, Yamada Yoshihiko	4. 巻 218
2. 論文標題 Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3506~3525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201807178	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村晋之, 吾郷哲朗, 芝原友也, 脇坂義信, 北園孝成.
2. 発表標題 脳梗塞後のペリサイト-アストロサイト-細胞外マトリックス連関を介した組織修復および機能回復.
3. 学会等名 日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村晋之, Yoh-suke Mukouyama, 平澤恵理, 脇坂義信, 吾郷哲朗, 北園孝成, Yoshihiko Yamada.
2. 発表標題 脳梗塞後のNVU修復過程における細胞外マトリックスタンパク質の重要性
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村晋之、芝原友也、脇坂義信、吾郷哲朗、北園孝成
2. 発表標題 グリア瘢痕における laminin 2再構築が脳梗塞後の再髄鞘化を促進し、機能回復に關与する
3. 学会等名 日本結合組織学会学術集会
4. 発表年 2021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		
米国	National Institutes of Health		