

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15423

研究課題名（和文）新規ミクログリアiSMGと血管反応に着目した脳梗塞巣組織ダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Investigation of changes in infarct tissue based on vascular remodeling induced by novel microglia

研究代表者

澤野 俊憲（Sawano, Toshinori）

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：60805597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞によって形成された壊死組織内には虚血誘導性幹細胞（ischemia-induced multipotent stem cells: iSCs）が分化した特殊なミクログリア（iSCs derived microglia: iSMG）が出現している。本研究ではiSMGが脳梗塞巣内で血管新生や血管体積の増加を促していることが明らかになった。脳梗塞巣成分が脳梗塞巣内の血管内腔に移行しており、脳梗塞後の血管変化を抑制すると脳梗塞巣の消失が抑制された。従って脳梗塞巣内の血管が脳梗塞巣成分の排出ルートとして機能しており、iSMGがその整備を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳内の老廃物排出機構が注目を集めており、いくつかの機序が提唱されている。しかし、これらは健常脳や認知症などを対象に検討されており、血流の滞った脳梗塞脳における排出機構は明らかにされていなかった。また、脳梗塞巣内にはタンパク質分解酵素などの神経毒性因子が多く含まれている。従って、速やかな脳梗塞巣の排出は脳梗塞病態の改善をもたらす可能性がある。本研究成果は脳における新たな排出機構を提唱するとともに、画期的な脳梗塞治療法の創出にもつながるものである。

研究成果の概要（英文）：In the infarct tissue, novel microglia derived from ischemia-induced multipotent stem cells (iSCs derived microglia: iSMG) appear. This study revealed that iSMG promote angiogenesis and an increase in vascular volume within the infarct tissue. Components of infarct tissue translocated into vascular lumen. Furthermore, inhibition of angiogenesis and an increase in vascular volume suppressed the temporal disappearance of the infarct tissue. These findings suggest that vascular remodeling induced by iSMG provide the drainage roots of the infarct tissue.

研究分野：神経生物学

キーワード：脳梗塞 ミクログリア 血管 虚血誘導性幹細胞 VEGF

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞によって形成された脳梗塞巣は組織再生を見込めないため、治療ターゲットとして考えにくいとされている。そのため、脳梗塞に関する組織学的・病理学的検討の多くは梗塞巣周辺のペナンプラと呼ばれる領域に集中していた。そうした中、我々のグループは脳梗塞巣内に様々な細胞へと分化可能な虚血誘導性幹細胞 (ischemia-induced multipotent stem cells: iSCs) が出現することを報告し、単離にも成功した (Nakagomi et al., Eur J Neurosci., 2009. and Sakuma et al., J Neuroinflamm., 2016.)。すなわち、脳梗塞巣は脱落を待つみの単なる壊死巣などではなく、むしろ活発に活動している組織である可能性が示された。さらに、脳梗塞巣内ではこれらの iSCs が分化したと考えられるミクログリア (iSCs derived microglia: iSMG) を発見し、その機能解析を進めていた。その結果、iSMG は既知のミクログリアに比べて血管発達に関与する遺伝子群の発現が突出して活発であることが判明した。実際に脳梗塞巣内では増殖性を示す血管内皮細胞が脳梗塞発症から 3 日を経た後でも多数存在しており、非梗塞巣組織に比べて血管の拡張も生じていた。しかし、血液供給が途絶えた脳梗塞巣内での血管拡張や増殖が何を意味しているのか問いに対して十分に答える知見はその時点では存在していなかった。

2. 研究の目的

脳梗塞モデルマウスの脳梗塞巣を経時的に観察すると、脳梗塞巣が徐々に頭蓋骨内から消失していた。このことは良く知られた現象であるが、脳梗塞巣を頭蓋骨外へと排出する経路については明らかになっていなかった。申請者は iSMG によって脳梗塞巣内の血管が誘導されており、それが脳梗塞巣成分の排出経路になり得るのではないかと考えた。そこで、本研究では、脳梗塞巣内で生じる血管変化が iSMG によるものであるのかを検証すると同時に、生じた血管変化が脳梗塞巣の排出に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

すべての動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」その他関係法令に基づき、立命館大学びわこ・くさつキャンパス動物実験委員会にて承認された動物実験計画書に従って実施した。実験に動物を供する際には、その数を最小限にとどめると共に、実験動物に苦痛を与えることの無いよう注意し、動物実験計画書を提出したうえ、認められたものに限って実施した。

(1) iSMG の有無が脳梗塞巣内における血管変化に与える影響の解析

ミクログリアの生存・維持に必要な CSF1 受容体シグナリングを阻害すると、ミクログリアの消失が生じる。そこで、CSF1 受容体阻害剤である PLX3397 を混餌投与することで iSMG の除去を行った。通常餌を与えた脳梗塞モデルマウスと PLX3397 混餌を与えた脳梗塞モデルマウスの脳梗塞巣内の血管を免疫染色により可視化した。両群を組織学的に比較することにより、脳梗塞巣内における血管変化が iSMG によって誘導されるのかを検証した。

(2) iSMG の有無が脳梗塞巣の消失に与える影響の解析

通常の脳梗塞モデルマウスと PLX3397 投与によって iSMG を除去したマウスの脳梗塞巣サイズを TTC 染色によって経時的に評価した。脳梗塞巣の消失を比較することで、iSMG が脳梗塞巣の排出を促進しているのかを検証した。

(3) VEGF 受容体阻害剤投与による血管発達抑制が脳梗塞巣の排出に与える影響の解析

iSMG が豊富に発現する血管発達関連因子として VEGF を既に同定している。そこで、VEGF 受容体阻害剤である Cediranib を脳梗塞巣内に投与することで、脳梗塞巣内の血管発達が抑制されるか、及び脳梗塞巣の排出に影響を与えるかを検証した。

(4) 脳梗塞巣内の血管が脳梗塞巣の排出ルートであるかの検証

脳梗塞巣内に蛍光標識したデキストランを局所注入した。その後、脳を摘出し免疫染色によって血管を可視化した。脳梗塞巣内に注入した蛍光標識デキストランが血管内に移行しているかを観察することで、脳梗塞巣内の血管が実際に脳梗塞巣の排出ルートとして機能しているのかを検証した。

4. 研究成果

(1) iSMG の有無が脳梗塞巣内における血管変化に与える影響の解析

通常の脳梗塞モデルマウスと比較して、PLX3397 投与により iSMG を除去した脳梗塞モデルマウスの脳梗塞巣内では増殖マーカーである Ki67 を発現した CD31 陽性血管内皮細胞が有意に減少していた。また、CD31 陽性血管内皮細胞を指標に三次元的に血管体積を評価すると、PLX3397 投与群における脳梗塞巣内の血管体積が有意に減少していた。これらのことから、脳梗塞巣内に出現し、様々な血管発達因子を発現している iSMG は脳梗塞巣内の血管内皮細胞増殖と血管体積

の増加を促進して可能性が示された。

(2) iSMG の有無が脳梗塞巣の消失に与える影響の解析

通常の脳梗塞モデルマウスでは脳梗塞発症 3 日目から 7 日目にかけて、有意な脳梗塞巣サイズの減少が生じていた。一方で、PLX3397 投与を行った脳梗塞モデルマウスでは、脳梗塞発症後 3 日目の時点では通常群と脳梗塞巣サイズに違いは無かったものの、7 日目にかけての有意な減少が認められなかった。また、7 日目時点での脳梗塞巣サイズは通常群に比べて PLX3397 投与群で優位に大きかった。これららの事から、iSMG は脳梗塞巣の排出を促進する作用を有している可能性が示された。

(3) VEGF 受容体阻害剤投与による血管発達抑制が脳梗塞巣の排出に与える影響の解析

iSMG が豊富に発現する血管発達関連因子の 1 つである VEGF の受容体を阻害する Cediranib を脳梗塞巣内に投与すると通常の脳梗塞モデルマウスに比べて、脳梗塞巣内の Ki67 陽性血管内皮細胞数が有意に減少した。さらに血管体積にも有意な減少が確認できた。従って、iSMG が放出する VEGF が脳梗塞巣内の血管発達を促進している可能性が示された。Cediranib によって脳梗塞巣内の血管発達が抑制された脳梗塞モデルマウスでは脳梗塞発症 3 日目から 7 日目にかけて、有意な脳梗塞巣サイズの減少が生じなかった。また、通常の脳梗塞モデルマウスと比較して、脳梗塞発症 3 日目の時点では脳梗塞巣サイズに違いは無かったものの、7 日目時点では通常群よりも優位に大きかった。従って、脳梗塞巣内で生じる血管発達が脳梗塞巣の排出に重要であることが示された。

(4) 脳梗塞巣内の血管が脳梗塞巣の排出ルートであるかの検証

脳梗塞巣内に蛍光標識デキストランを投与後にサンプル化した脳の CD31 陽性血管内皮細胞を可視化して立体構築すると、蛍光標識デキストランが血管壁及び血管内腔に移行していることを確認した。従って、脳梗塞巣成分も血管を経路として頭蓋骨外へと排出されている可能性が示された。

以上の結果から、脳梗塞巣内に出現する iSMG は VEGF を放出することによって脳梗塞巣内の血管発達を促していることが示された。これらの血管には脳梗塞巣成分が移行可能であり、脳梗塞巣の排出ルートとして機能している可能性が高い。すなわち、iSMG は脳梗塞巣内の血管発達を介して脳梗塞巣の効率的な排出に貢献している可能性が示された(図)。脳梗塞巣にはタンパク質分解酵素などの神経毒性成分が豊富に含まれている。従って、iSMG による効果的な脳梗塞巣排出は脳梗塞病態の緩和に寄与していることも予想される。本研究成果は脳内の新たな排出システムを提唱するものであると同時に、これまで注目されてこなかった脳梗塞巣を対象とした画期的な脳梗塞治療開発の突破口にもなり得ると考えている。

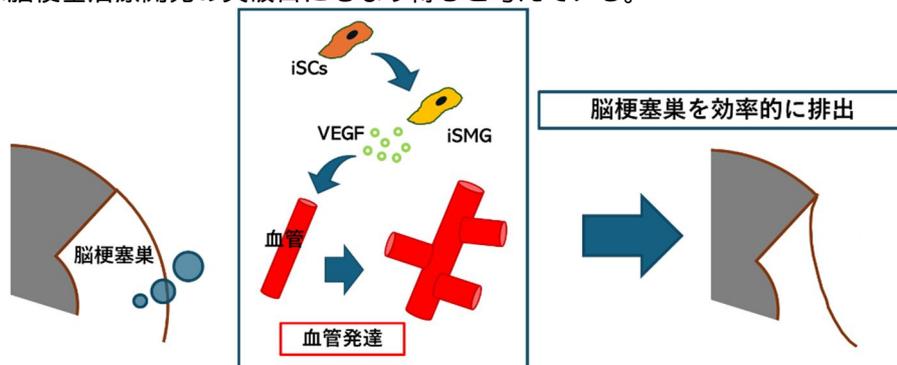


図 . iSMG による血管発達を介した脳梗塞排出機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5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 Inoue Yosuke, Sawano Toshinori, Yamaguchi Natsumi, Inoue Shota, Takayama Akinori, Nakazawa Shuma, Inagaki Shinobu, Nakatani Jin, Tanaka Hidekazu	4. 巻 530
2. 論文標題 Comparative distribution of Arcadlin/Protocadherin 8 mRNA in the intact and ischemic brains of adult mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2033 ~ 2055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.25319	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 Nakagomi Takayuki, Nishie Hideaki, Sawano Toshinori, Nakano-Doi Akiko	4. 巻 18
2. 論文標題 A potential new tool to enhance translational success rate in stroke research by backcrossing techniques in transgenic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neural Regeneration Research	6. 最初と最後の頁 107 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.343899	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 Yamaguchi Natsumi, Sawano Toshinori, Nakatani Jin, Nakano-Doi Akiko, Nakagomi Takayuki, Matsuyama Tomohiro, Tanaka Hidekazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Voluntary running exercise modifies astrocytic population and features in the peri-infarct cortex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IBRO Neuroscience Reports	6. 最初と最後の頁 253 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibneur.2023.02.004	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 Yamaguchi Natsumi, Sawano Toshinori, Fukumoto Kae, Nakatani Jin, Inoue Shota, Doe Nobutaka, Yanagisawa Daijiro, Tooyama Ikuo, Nakagomi Takayuki, Matsuyama Tomohiro, Tanaka Hidekazu	4. 巻 1767
2. 論文標題 Voluntary running exercise after focal cerebral ischemia ameliorates dendritic spine loss and promotes functional recovery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147542 ~ 147542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147542	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 Nishie Hideaki, Nakano-Doi Akiko, Sawano Toshinori, Nakagomi Takayuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Establishment of a Reproducible Ischemic Stroke Model in Nestin-GFP Mice with High Survival Rates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12997 ~ 12997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312997	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 Nakagomi Takayuki, Nakano-Doi Akiko, Kubo Shuji, Sawano Toshinori, Kuramoto Yoji, Yamahara Kenichi, Matsuyama Tomohiro, Takagi Toshinori, Doe Nobutaka, Yoshimura Shinichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Transplantation of Human Brain-Derived Ischemia-Induced Multipotent Stem Cells Ameliorates Neurological Dysfunction in Mice After Stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 400 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szad031	査読の有無 無
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 Hirano Yoshinobu, Nakagomi Takayuki, Nakano-Doi Akiko, Kubo Shuji, Minato Yusuke, Sawano Toshinori, Sakagami Masafumi, Tsuzuki Kenzo	4. 巻 12
2. 論文標題 Microglia Negatively Regulate the Proliferation and Neuronal Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells Isolated from Poststroke Mouse Brains	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2040 ~ 2040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12162040	査読の有無 無
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23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中澤秀真、井上耀介、井上翔太、山口菜摘、中谷仁、澤野俊憲、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後に海馬歯状回で誘導されるArcadlinが樹状突起スパイン密度に及ぼす影響
3. 学会等名 NEURO2022 第65回日本神経化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤秀真、井上耀介、井上翔太、山口菜摘、中谷仁、澤野俊憲、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後のArcadlin発現パターンと樹状突起スパインへの影響
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口菜摘、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の自発運動がアストロサイトに与える影響
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤秀真、井上耀介、井上翔太、山口菜摘、中谷仁、澤野俊憲、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の海馬歯状回において誘導されるArcadlinが樹状突起スパイン密度に与える影響
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山晃行、雑賀智菜実、上村健士郎、小山奈々、飯橋快斗、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和
2. 発表標題 デスモソームタンパク質Desmoplakinは海馬歯状回において一次繊毛のrootletに局在する
3. 学会等名 第114回近畿生理学談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北川貴士、河前なつみ、重松成秋、高山晃行、上村健士郎、山形要人、杉浦弘子、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和
2. 発表標題 Arcadlin ^{-/-} マウスの梨状皮質錐体細胞の樹状突起形態
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口菜摘、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の自発運動は脳梗塞後に新生したアストロサイトの残存を促進し、遺伝子発現を変化させる
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤野俊憲、孫海洋、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞巣内に出現するミクログリアが血管リモデリングに与える影響
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の壊死組織に出現するミクログリア機能の解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和
2. 発表標題 Role of novel microglia in the ischemic tissue
3. 学会等名 第25回グリア研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞巣内におけるmicrogliaの起源と機能についての検討
3. 学会等名 第6回 包括的神経グリア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤野俊憲、山口菜摘、中谷仁、稲垣忍、中込隆之、松山知弘、田中秀和
2. 発表標題 脳梗塞巣内に出現する新規ミクログリアの機能解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 桃花, 中澤 秀真, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 Role of microglia in dendritic spine changes of dentate gyrus granule cells after cerebral ischemia
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術 研究会/第66回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤野 俊憲, 孫 海洋, 中谷 仁, 稲垣 忍, 中込 隆之, 松山 知弘, 田中 秀和
2. 発表標題 Role of novel microglia induced in necrotic tissue after cerebral ischemia
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術 研究会/第66回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤 秀真, 井上 耀介, 井上 翔太, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の海馬歯状回で誘導されるArcadlinは樹状突起スパイン密度減少に関与する
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術 研究会/第66回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤 秀真, 井上 耀介, 井上 翔太, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 脳梗塞後の海馬歯状回で発現上昇するArcadlinが樹状突起スパイン密度を減少させる
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山 晃行, 上村 健士郎, 小山奈々, 飯橋 快斗, 林 美羽, 肖 中洋, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 マウス脳におけるciliary rootletの形態は領域によって異なるパターンを示す
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤野 俊憲, 孫 海洋, 岡田 桃花, 中谷 仁, 稲垣 忍, 中込 隆之, 松山 知弘, 田中 秀和
2. 発表標題 Mechanism of necrotic tissue drainage after cerebral ischemia
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 桃花, 中澤 秀真, 高橋 瞳, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 ミクログリアが脳梗塞の海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起スパインに与える影響
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 桃花, 中澤 秀真, 高橋 瞳, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 ミクログリアは脳梗塞後の海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起スパイン数変化に寄与する
3. 学会等名 第7回包括的神経グリア研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 澤野 俊憲
2. 発表標題 脳梗塞後の壊死巣排出メカニズム：壊死巣に出現する新規ミクログリアに着目して
3. 学会等名 第7回包括的神経グリア研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡田 桃花, 中澤 秀真, 高橋 瞳, 山口 菜摘, 中谷 仁, 澤野 俊憲, 田中 秀和
2. 発表標題 ミクログリアは脳梗塞後の海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起スパイン減少に関与する
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 澤野 俊憲, 孫 海洋, 岡田 桃花, 中谷 仁, 稲垣 忍, 中込 隆之, 松山 知弘, 田中 秀和
2. 発表標題 脳梗塞後に出現する特殊なミクログリアが壊死組織排出に与える影響
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------