

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16643

研究課題名（和文）ペリサイトに着目した脳梗塞超急性期の炎症惹起機構の解明

研究課題名（英文）The role of brain pericyte inflammation responded to ischemic stroke.

研究代表者

千代田 大尚（Chiyoda, Hirohisa）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特別研究員

研究者番号：20886155

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）：脳虚血後の炎症反応に対する神経細胞やグリア細胞、免疫細胞の役割の理解は進んできたものの、毛細血管を被覆するペリサイトの関与は十分には明らかにされていない。本研究では、一過性脳虚血後の急性期における炎症反応に対するペリサイトの役割について解析を進めた。その結果、脳虚血に反応した急性期のNF- $\kappa$ Bの活性化はペリサイトに加え血管内皮細胞において選択的に誘導され、血管系が脳虚血に対する初期センサーとして機能す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

ペリサイトや血管内皮細胞が脳虚血傷害に対して高い感受性を示すこと明らかにした点で学術的意義があると考えられる。脳梗塞は高い死亡率や発症後の神経障害が大きいものの効果的な治療薬は十分とは言えず、本研究で得られた虚血センサーとしての血管機能は、脳梗塞治療薬開発に対する新たな方向性を示した点で社会的意義があるものと考えられる。今後、より詳細な虚血感知機構や、炎症進展ならびに神経障害誘導機構を明らかにしていくことで学術的な発展に加え、新たな治療薬開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The inflammatory response of capillary pericytes in ischemic stroke is still poorly understood compared to neurons, glial cells, and immune cells. In this study, we analyzed the role of pericytes in the inflammatory response during the acute phase after transient cerebral ischemia. Through the analysis using mouse models, we found that NF- $\kappa$ B activation in response to cerebral ischemia was selectively induced in pericytes and vascular endothelial cells, implying that the vasculature may function as a primary sensor to cerebral ischemia.

研究分野：脳血管障害

キーワード：ペリサイト 脳梗塞 炎症応答 血管内皮細胞

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)脳梗塞発症後の梗塞巣では、神経細胞の損傷をトリガーとして血管透過性が亢進し免疫系細胞が浸潤することで損傷細胞が除去される。しかし、神経損傷が如何に感知され炎症反応が惹起されるのか、そのメカニズムは十分には明らかにされていない。

(2)これまでに脳内の炎症反応を惹起する神経細胞代謝障害によって蓄積する遊離長鎖脂肪酸<sup>1</sup>や投与されたりポポリサッカライド<sup>2</sup>を、毛細血管周囲のペリサイトが Toll 様受容体を介して、他の細胞種よりも良く感知することが報告されたことから、脳梗塞後の神経傷害も最初にペリサイトによって感知され、組織傷害進展に関与する可能性が予想された。

### 2. 研究の目的

(1)毛細血管周囲のペリサイトが脳梗塞超急性期の初期センサーとして機能し、組織炎症展開のトリガーとして機能するという仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1)脳梗塞モデルの作成

脳梗塞後の病態解析のために、結紮した主頸動脈からシリコンで覆われたナイロンモノフィラメントの塞栓系(Doccol 社)を外頸動脈との分岐点から内頸動脈方向へ 1 cm 挿入し、中大脳動脈を一過的に閉塞する脳梗塞マウスモデル(tMCAO)を使用した。

#### (2)脳組織における p65 の活性化の検出

梗塞巣において炎症応答が生じているかを調べるために、tMCAO 後 2 時間から 24 時間の野生型マウスを Hank's 平衡塩溶液で灌流し、脳組織を取り出して OCT で包埋後に液体窒素で凍結し、クライオスタットで 30  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、免疫蛍光染色および DAPI 染色をおこない、反対側領域および梗塞側領域の脳皮質における p65 の核移行頻度を計測した。観察には bregma  $\pm 0$  から -2 の領域の脳切片を使用した。

#### (3) TTC 染色による梗塞巣面積の判定

tMCAO 後 24 時間に Hank's 平衡塩溶液で灌流したマウスから脳を取り出し、脳スライサーで 1 mm 間隔で脳を薄切りにし、2%の 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド溶液を用いて 20 分間室温暗所で染色した 7 枚の切片を解析した。また、梗塞領域は Fiji によって測定した。

#### (4)神経症状スコアの評価

神経症状は先行報告<sup>3</sup>を参考に、0:異常症状がない、1:尾を持ち上げた時に非梗塞側方向に体を翻す、または梗塞側の前足が麻痺して動かない、2:常に梗塞側方向へ回転する、3:歩行できない、もしくは横たわる場合、4:解析前までに死亡した場合の 4 段階に分けて評価した。

#### (5)オープンフィールドテスト

行動量測定はマウスを飼育ケージから 30 x 30 cm のプラスチックケースの中央に移動後、10 分間の行動を撮影し、得られた動画を Ethovision XT の解析ツールを使用して行動量 (m)、行動頻度 (割合)を測定した。

#### (6)炎症性サイトカインの発現量の測定

tMCAO 後 24 時間における脳組織の脳皮質と線条体を含む bregma 0 から +2 の反対側領域および梗塞側領域から RNA を抽出し、逆転写によって得られた cDNA ライブラリーを用いて、qPCR によって発現量を解析した。内在性コントロール遺伝子には *Actb* を使用し、主要な炎症誘発性サイトカインの *Tnf* と *Il1b*、*Il6* の発現変動を調べた。

### 4. 研究成果

(1)ペリサイトと血管内皮細胞では脳虚血に応答し NF- $\kappa$ B の活性化を伴う炎症反応が生じる

炎症性サイトカイン産生に対して中心的な役割を担う NF- $\kappa$ B の活性化細胞を指標に、超急性期から急性期にかけて脳組織内の炎症進展様式を解析した。tMCAO 後 2 時間から 24 時間までの継時的な NF- $\kappa$ B の核移行頻度を計測した結果、梗塞後 6 時間をピークとした NF- $\kappa$ B の活性化が認められた。さらに、NF- $\kappa$ B の活性化細胞の同定を試みた結果、梗塞後の 24 時間までの急性期では主に CD31 陽性血管内皮細胞と PDGFRb 陽性ペリサイトにおいて NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されることが分かった(図.1)。すなわち、血管系が神経傷害に対して高い感受性を示し、組織炎症進展に関与する可能性が考えられた。

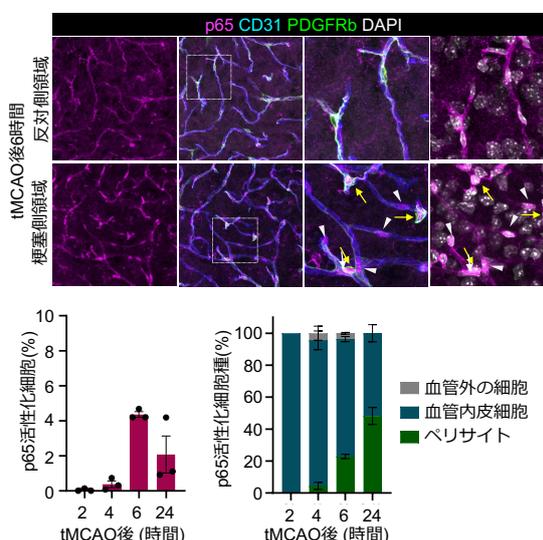


図.1 梗塞巣でのp65は主に血管内皮細胞とペリサイトで活性化される

(2) 脳虚血後の神経傷害進展に対するペリサイト NF- $\kappa$ B 活性化の意義の検討  
 神経傷害形成に対する NF- $\kappa$ B の役割を明らかにするために、NF- $\kappa$ B の構成因子である *Rela* 遺伝子の条件付き欠損マウス (*Rela<sup>Flox/Flox</sup>*) を用いて解析を進めた。まず、ペリサイト選択的に *Rela* を欠損させることにより NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制可能なマウス (*Abcc9-CreER<sup>T2</sup>; Rela<sup>Flox/Flox</sup>*) を用いて解析した結果、梗塞巣面積や神経症状に対照群との差は認められず(図.2)、ペリサイトの NF- $\kappa$ B 経路の活性化は神経傷害の進展に対する影響はほとんどないことが明らかになった。

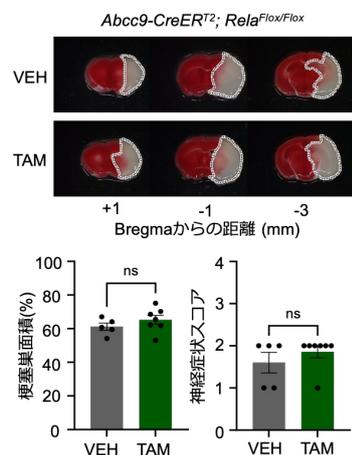


図.2ペリサイトのNF- $\kappa$ B経路遮断マウスはtMCAO後の病態が軽減しない

(3) 血管内皮細胞NF- $\kappa$ Bは脳虚血後の傷害進展に関与する次に、血管内皮細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の役割の検討を実施した。血管内皮細胞選択的に *Rela* を欠損させたマウス (*Cdh5-CreER<sup>T2</sup>; Rela<sup>Flox/Flox</sup>*) を用いた解析を進めた結果、tMCAO 後における梗塞巣面積および神経症状が優位に抑制されることが分かった。さらに、血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B経路遮断マウスではtMCAO後の行動量や行動頻度が上昇することから、血管内皮細胞のNF- $\kappa$ Bが脳虚血による神経傷害の進展に大きく寄与することが明らかになった。一方、今後の詳細な解析を必要とするが、血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B経路を抑制したマウスでもIL-1 $\beta$ やIL-6などの炎症性サイトカインの発現は抑制されなかった(図.3)。

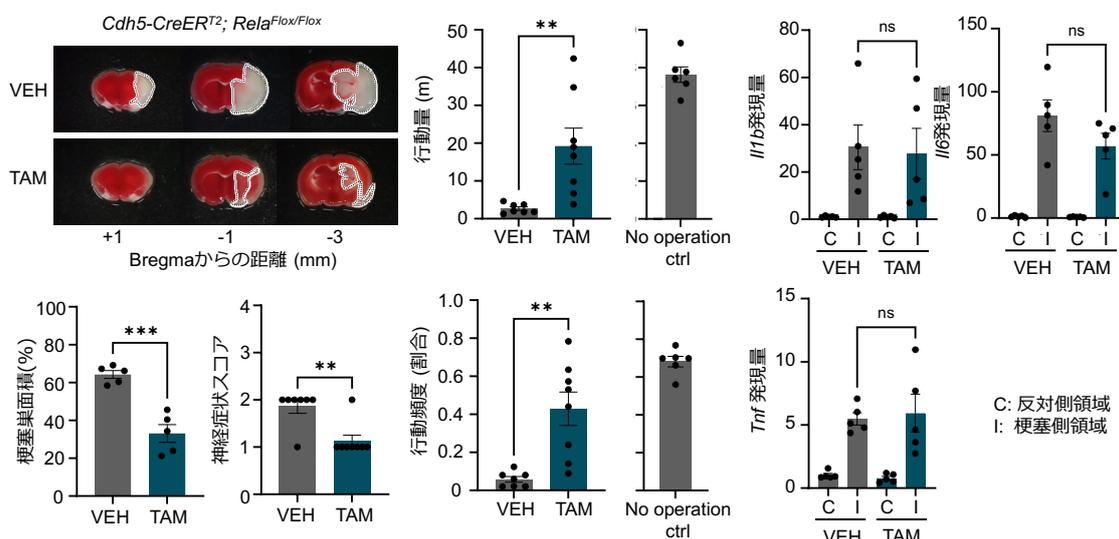


図.3 血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B経路遮断マウスはtMCAO後の病態が軽減するが炎症性サイトカインの発現量は低下しない

#### (4) まとめ

脳虚血に応答したNF- $\kappa$ Bの活性化はペリサイトおよび血管内皮細胞において選択的に誘導され、血管系が脳梗塞超急性期の初期センサーとして機能する可能性が示唆された。実際に血管内皮細胞におけるNF- $\kappa$ B経路を抑制することにより、神経傷害が顕著に抑制されたことから、血管内皮細胞が傷害進展に対する中心的な役割を果たすことが明らかになった。一方、当初の予想とは異なり、ペリサイトでのNF- $\kappa$ Bを介した炎症反応は神経傷害進展に対する寄与はほとんどなかった。今回の解析から、血管内皮細胞が傷害進展に大きく寄与することが明らかになったが、血管内皮細胞でNF- $\kappa$ B経路遮断しても脳虚血後におけるIL-1 $\beta$ やIL6など炎症誘発性サイトカインの発現量は変化しなかった。脳梗塞急性期の炎症進展には複雑な制御機構が潜んでいるものと考えられ、(1細胞)RNAシーケンスなどにより包括的な遺伝子発現変動を解析することで、より詳細に炎症進展に対するペリサイトおよび血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B活性化の役割が明らかになるものと思われる。さらに、ペリサイトと血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B経路を同時に抑制するマウスなどを用いてサイトカインの発現に及ぼす影響を検討することで、炎症進展機構の深い理解に繋がるものと期待される。今回明らかになった点から、血管内皮細胞のNF- $\kappa$ B活性化が如何に神経傷害を亢進するのか、その分子機構を明らかにすることで脳梗塞治療に対する新たな治療薬開発に貢献するものと期待される。

#### 参考文献

1. Bilal N. Sheikh, Sukanya Guhathakurta, Tsz Hong Tsang, et al., Neural metabolic imbalance induced by MOF dysfunction triggers pericyte activation and breakdown of vasculature. *Nat Cell*

*Biol.* 2020 Jul;22(7):828-841.

2. Lihui Duan, Xiao-Di Zhang, Wan-Ying Miao, et al., PDGFR $\beta$  Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2. *Neuron*. 2018 Oct 10;100(1):183-200.e8.
3. E Z Longa, P R Weinstein, S Carlson, et al., Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan;20(1):84-91.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koji Ando, Lei Tong, Di Peng, Elisa Vazquez-Liebanas, Hirohisa Chiyoda, Liqun He, Jianping Liu, Koichi Kawakami, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara, Jaime Grutzendler, Christer Betsholtz	4. 巻 57
2. 論文標題 KCNJ8/ABCC9-containing K-ATP channel modulates brain vascular smooth muscle development and neurovascular coupling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 1383-1399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2022.04.019.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千代田 大尚、菊地 和、安藤 康史
2. 発表標題 Role of pericytes in ischemic stroke.
3. 学会等名 第1回 NCVV Annual Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千代田 大尚
2. 発表標題 脳梗塞急性期における傷害進展機構の理解とその制御
3. 学会等名 第7回 Neuro-Vascular研究会
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
---------	---------