

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20693

研究課題名（和文）細胞外マトリックス蛋白質をターゲットとした脳梗塞後の内因性機能回復治療の開発

研究課題名（英文）Development of endogenous functional recovery therapy after ischemic stroke targeting extracellular matrix protein

研究代表者

芝原 友也 (Shibahara, Tomoya)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20908496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では脳梗塞後に再構築される細胞外マトリックス(ECM)が、細胞間の相互作用を制御して内因性機能回復を誘導する機序について検討した。脳梗塞後の梗塞内部では、ペリサイトが fibronectin を産生し、マクロファージによる壊死組織の処理を促進することで組織修復を誘導した。また、梗塞内部のペリサイトは梗塞/健常境界領域におけるアストロサイトの laminin 2 産生を促進し、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化/再髄鞘化を介して、神経系ネットワーク再構築による機能回復をもたらすことを明らかにした。ECM蛋白が脳梗塞後の各細胞間相互作用を制御することが内因性機能回復に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

脳梗塞によって運動機能障害が生じると、寝たきりの状態となり介護が必要な状況に陥る。脳梗塞急性期以降の機能回復を促進させる治療はリハビリテーションのみであり、機能回復をもたらす治療の開発は喫緊の課題である。脳梗塞発症後は、脳組織の神経系細胞や血管系細胞、傷害後に局所動員される血球系細胞が相互に作用して内因性機能回復機構が働く。本研究課題では脳梗塞後に再構築された細胞外マトリックス蛋白が、細胞間相互作用に重要な役割を果たし、内因性機能回復を誘導する機序の一端を担うことを明らかにした。今後細胞外マトリックスをターゲットとした新規治療法開発の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project is to investigate the mechanism of functional recovery mediated by an extracellular matrix (ECM) remodeling after stroke, which controls intercellular interaction. Within the infarct area, pericytes produced fibronectin and promoted macrophage-mediated clearance of necrotic tissue. Furthermore, pericytes within the infarct area regulated the production of astrocytic laminin 2 in peri-infarct areas, which led to the differentiation and remyelination of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), resulting in functional recovery through a reorganization of neural network. We conclude that reciprocal interactions among pericytes, macrophages, astrocytes, and OPCs and the ECM proteins-mediated microenvironment that facilitates these cell-cell interactions are important for endogenous functional recovery.

研究分野：神経科学

キーワード：脳梗塞 内因性機能回復 fibronectin ペリサイト マクロファージ laminin 2 アストロサイト
オリゴデンドロサイト前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、rt-PA 静注治療および脳血管内カテーテル治療による再灌流療法の確立と普及により、脳梗塞に対する超急性期治療は劇的な進歩を遂げたことで、救命率の向上や後遺症の軽減がもたらされた。しかし、超急性期治療は時間的制約により多くの症例が適応から外れてしまい、後遺症として運動機能障害が残る場合が多く、寝たきりとなり介護を必要とする最大の要因となっている。一方、脳血管障害発症後は、脳組織の神経系細胞や血管系細胞、傷害後に局所動員される血球系細胞が相互に作用して内因性機能回復機構が働くため、多くの脳梗塞患者では発症後数ヶ月の経過で、ある程度の機能回復が得られる。脳梗塞後、急性期以降に後遺した運動機能障害に対する治療は現時点ではリハビリテーション治療のみであるが、内因性機能回復を誘導する病態機序を解明することで、脳梗塞患者を寝たきり・要介護にさせない、ADL を向上させるための機能回復促進治療の開発は喫緊の課題である。

申請者らは、脳微小血管の壁細胞ペリサイトに着目し、脳梗塞後の組織修復と神経ネットワーク再構築による内因性機能回復について検討してきた。これまでに、脳梗塞後にペリサイトが、(1) 梗塞内部へ血球系マクロファージの動員を誘導して壊死組織(ミエリンデブリス)の処理(=梗塞内部の組織修復)に関わること、¹ (2) 梗塞周囲ペナンプラ領域のアストロサイトに作用してオリゴデンドロサイト前駆細胞(oligodendrocyte precursor cells, OPC)の再髄鞘化(=神経系ネットワーク再構築)を促進させ、内因性機能回復を誘導することを報告してきた。² その細胞間の作用機序には不明な点が多いが、近年脳梗塞や認知症、脱髄疾患の病態における種々の細胞の相互作用において細胞周囲の微小環境を制御する細胞外マトリックス(Extracellular matrix: ECM)蛋白質が介在する可能性が注目されている。

脳梗塞では発症直後から ECM によって形成される基底膜が分解されて blood-brain barrier (BBB)が破綻し、さらなる病態増悪に繋がる。脳梗塞後に ECM が再構築されることは、組織修復や内因性機能回復機構にとって必要不可欠である。しかし、これまでの脳血管障害における ECM に関する研究では、ほとんどが急性期の BBB 破綻や梗塞サイズに関するものであり、亜急性期以降における基底膜 ECM の再構築や、各細胞との相互作用の制御に着目した研究は、申請者らの独自の視点と言える。これまでに申請者および研究協力者らは脳梗塞後に再構築される ECM のうち、ペリサイト由来の fibronectin が梗塞内部の線維化に関与すること、³ 内皮細胞由来の perlecan が BBB 修復とペリサイト遊走に関与すること、⁴ など ECM が脳梗塞後の組織修復に関連する可能性について報告してきた。そこで申請者らは、脳梗塞後の内因性機能回復における細胞間相互作用においてどのような ECM がどのように内因性機能回復機構をもたらすのかを明らかにしたいと考え、ECM が果たす役割を解明し、ECM をターゲットとした新規機能回復治療の糸口にできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

脳梗塞後の組織修復過程で再構築される ECM を探索し、梗塞内部のミエリンデブリス処理に重要なペリサイト/マクロファージの相互作用に関わる ECM、および梗塞周囲の神経系ネットワーク再構築に重要なペリサイト/アストロサイト/OPC の相互作用に関わる ECM の分子細胞機構を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) マウス脳梗塞モデル：生後 8~15 週齢の C57BL/6 野生型マウスおよびペリサイト機能が減弱した *PDGFRβ*^{+/-}マウスを用いて、ローズベンガル色素を経静脈的に注入し、レーザー照射により中大脳動脈遠位部を凝固永久閉塞させる(光凝固血栓法)ことで脳梗塞を作製した。脳梗塞作製後、神経機能評価を行うことで機能回復過程を評価するとともに、脳切片を取り出し、免疫組織学的評価を行った。

(2) 培養細胞を用いた分子細胞機序の検討：脳血管ペリサイトに加えて、マクロファージ、アストロサイト、OPC を培養し、各種刺激下における細胞内シグナル伝達、遺伝子発現変化、接着能、貪食能などを評価した。また、培養上清を他の細胞培地に添加することで細胞間相互作用を、さらに ECM 上で各細胞を培養することで ECM の効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞後に再構築される基底膜 ECM の経時変化

基底膜を構成する ECM のうち、①collagen type IV、②fibronectin、③laminin $\alpha 2$ は、いずれも健常脳組織では内皮細胞周囲に局在した。しかし脳梗塞後にはその局在は大きく異なり、①collagen type IV は血管内皮細胞周囲に留まっていたが、②fibronectin は経時的に梗塞辺縁から梗塞中心部にかけて集積し、その局在はペリサイトに一致していた。③laminin $\alpha 2$ は梗塞内部の発現が徐々に減弱する一方、梗塞/健常境界領域のアストロサイトと局在が一致した(図 1)。

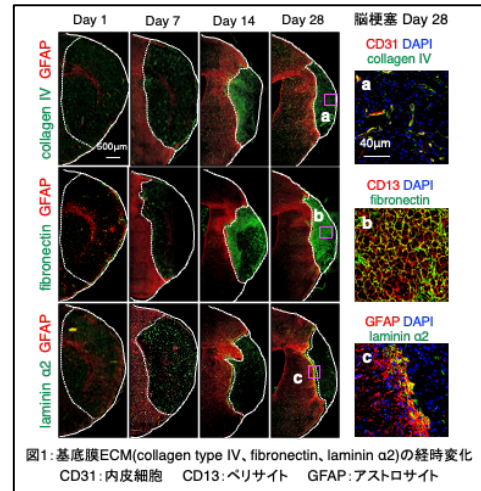


図1：基底膜ECM(collagen type IV、fibronectin、laminin $\alpha 2$)の経時変化
CD31：内皮細胞 CD13：ペリサイト GFAP：アストロサイト

(2) PDGFR β 陽性ペリサイトが梗塞内部で産生する fibronectin はマクロファージのミエリンデブリス処理を促進する

脳梗塞後の梗塞内部では、ペリサイトとマクロファージが近接して存在(図 2A)しており、両者が相互作用することでミエリンデブリスの処理(=梗塞内部の組織修復)に関わることを申請らは *Stroke* 誌に報告した。¹そこで、ペリサイトとマクロファージの相互作用に関わる ECM として、ペリサイトが梗塞内部で産生する fibronectin に注目した。ペリサイト機能が減弱した *PDGFR β* ^{+/-}マウスでは、野生型と比較して、梗塞内部における fibronectin の集積が抑制される(図 2B)だけでなく、梗塞内部のミエリンデブリスの処理が減弱した(図 2C)。また、培養マクロファージは fibronectin と接着し、貪食に関わるサイトカイン産生やスカベンジャー受容体の発現が増加し、ミエリンデブリスの貪食が促進された(図 2D)。すなわち、ペリサイトとマクロファージによる梗塞内部の組織修復には、ペリサイトが産生する fibronectin が重要な役割を担う可能性が示唆された。

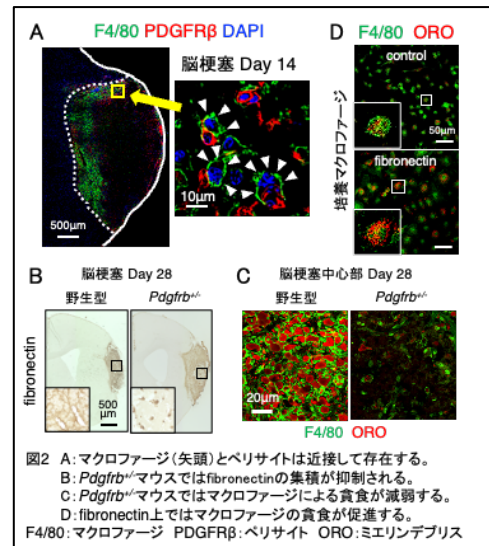


図2 A: マクロファージ(矢頭)とペリサイトは近接して存在する。
B: *Pdgfrb*^{+/-}マウスではfibronectinの集積が抑制される。
C: *Pdgfrb*^{+/-}マウスではマクロファージによる貪食が減弱する。
D: fibronectin上ではマクロファージの貪食が促進する。
F4/80: マクロファージ PDGFR β : ペリサイト ORO: ミエリンデブリス

(3) 梗塞内部の PDGFR β 陽性ペリサイトが梗塞/健常境界領域におけるアストロサイトの laminin $\alpha 2$ 産生を促進して OPC の再髄鞘化を誘導する

梗塞/健常境界領域ではペリサイトがアストロサイトと近接して存在し、脳梗塞亜急性期(Day 14~28)には主にアストロサイトが梗塞/健常境界領域の laminin $\alpha 2$ を産生した(図 3A)。また、ペリサイトが TGF $\beta 1$ を介してアストロサイトの laminin $\alpha 2$ 産生を促進する可能性が示唆された。さらにアストロサイト由来 laminin $\alpha 2$ は OPC と接着し、OPC の分化/再髄鞘化(図 3B)を促進した。*PDGFR β* ^{+/-}マウスでは、野生型と比較して、laminin $\alpha 2$ が減少し(図 3C)、梗塞周囲領域における OPC の分化/再髄鞘化が抑制され、これに一致して脳梗塞後の神経機能回復が減弱した。

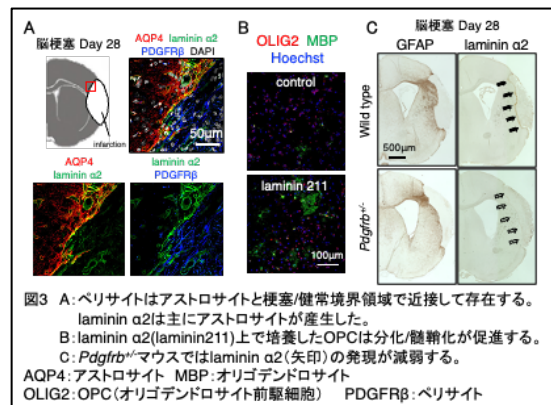
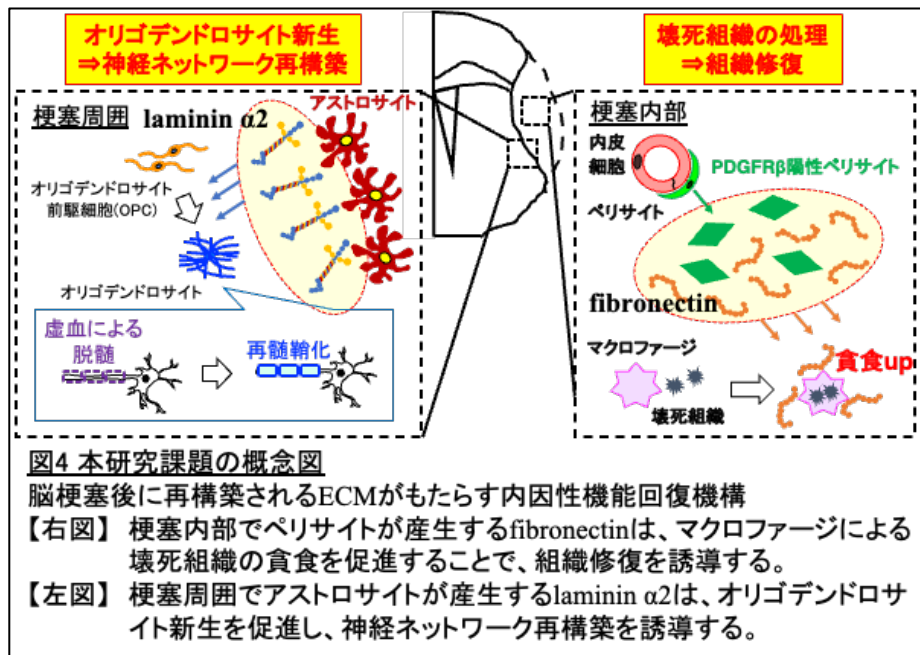


図3 A: ペリサイトはアストロサイトと梗塞/健常境界領域で近接して存在する。laminin $\alpha 2$ は主にアストロサイトが産生した。
B: laminin $\alpha 2$ (laminin211)上で培養したOPCは分化/髄鞘化が促進する。
C: *Pdgfrb*^{+/-}マウスではlaminin $\alpha 2$ (矢印)の発現が減弱する。
AQP4: アストロサイト MBP: オリゴデンドロサイト PDGFR β : ペリサイト

以上より、我々は脳梗塞後に再構築された ECM が、内因性機能回復を誘導する機序の一端を担うことを明らかにした(図 4)。⁵ 本研究成果は ECM をターゲットとした新規治療法開発の基盤となることが期待される。



<引用文献>

1. [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*. 51(10):3095-3106. 2020.
2. [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*. 7(2):0474-19. 2020.
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, Ikeuchi T, Nara K, Rhodes CS, Zhang P, Chiba Y, Kazuno S, Miura Y, Ago T, Eri Arikawa-Hirasawa E, Mukoyama Y, Yamada Y. Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. 218(10):3506-25.
5. [Shibahara T](#), Nakamura K, Wakisaka Y, Shijo M, Yamanaka K, Takashima M, Takaki H, Hidaka M, Kitazono T, Ago T. PDGFR β -positive cell-mediated post-stroke remodeling of fibronectin and laminin $\alpha 2$ for tissue repair and functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab*. 43(4):518-30. 2023.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibahara, T. Nakamura, K. Wakisaka, Y. Shijo, M. Yamanaka, K. Takashima, M. Takaki, H. Hidaka, M. Kitazono, T. Ago, T.	4. 巻 43
2. 論文標題 PDGFR α -positive cell-mediated post-stroke remodeling of fibronectin and laminin 2 for tissue repair and functional recovery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 518-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0271678X221145092	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 Takashima M, Nakamura K, Kiyohara T, Wakisaka Y, Hidaka M, Takaki H, Yamanaka K, Shibahara T, Wakisaka M, Ago T, Kitazono T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Low-dose sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor ameliorates ischemic brain injury in mice through pericyte protection without glucose-lowering effects.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03605-4.	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 Yamanaka K, Nakamura K, Shibahara T, Takashima M, Takaki H, Hidaka M, Komori M, Yoshikawa Y, Wakisaka Y, Ago T, Kitazono T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Deletion of Nox4 enhances remyelination following cuprizone-induced demyelination by increasing phagocytic capacity of microglia and macrophages in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 541-559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24292. Epub 2022 Nov 2.	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

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 α 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 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Shibahara, Kei Yamanaka, Kuniyuki Nakamura, Yoshinobu Wakisaka, Junya Kuroda, Hiroshi Nakane, Takanari Kitazono, Tetsuro Ago
2. 発表標題 PDGFR -positive cell-mediated post-stroke remodeling of fibronectin and laminin 2 for tissue repair
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村晋之、吾郷哲朗、高島正光、芝原友也、清原卓也、脇坂義信、北園孝成.
2. 発表標題 ペリサイトを標的とした脳梗塞治療戦略.
3. 学会等名 第48回日本脳卒中学会学術集会, シンポジウム卒中S5 脳血管障害の基礎研究, 2023/3/16, 横浜. (招待講演)
4. 発表年 2023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
---------	---------