

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590937
 研究課題名（和文） 脳梗塞後の神経再生における脳血管ペリサイトの機能に関する研究
 研究課題名（英文） Functional roles of brain pericytes during brain ischemia
 研究代表者
 鴨打 正浩（KAMOUCHI MASAHIRO）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：80346783

研究成果の概要（和文）：培養脳血管ペリサイトにおいて、細胞外酸性化は形質膜の輸送体（NHE1）を逆回転モードで活性化し、細胞内 Ca 振動（Ca oscillation）を起こした。Ca oscillation は Ca 結合タンパク質（CaMKII）をリン酸化し、核内に移行したリン酸化 CaMKII は転写因子 CREB をリン酸化することで、遺伝子発現を制御した。ラット／マウス中大脳動脈閉塞モデルにおいて、脳血管ペリサイトは虚血巣周囲に集簇し、CREB を発現するとともに種々の神経栄養因子を分泌し脳虚血時には神経保護作用を有すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Extracellular acidification caused Ca oscillation via activation of NHE1 in reverse mode and subsequently phosphorylated CaMKII. Phosphorylated CaMKII translocated into nuclei and phosphorylated CREB, leading to initiation of gene transcription. In rat or mouse middle cerebral artery occlusion model, brain pericytes migrated into peri-infarct areas. They expressed CREB and secreted a variety of nerve growth factors, indicating that pericytes may play a neuroprotective role during brain ischemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2022年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学 1A

キーワード：脳血管、神経再生、脳梗塞、ペリサイト、Ca シグナル

1. 研究開始当初の背景

脳血管ペリサイトは、脳の毛細血管を取り囲むように存在する細胞である。以前から多彩

な生理的機能を有していることが示唆されてきたが、その詳細は明らかではなかった。我々は、脳血管ペリサイトが脳虚血において

重要な役割を果たしていると考え、in vitro および in vivo で脳虚血におけるペリサイトの動態を解析し、その機序について検討を行った。

2. 研究の目的

脳虚血における脳血管ペリサイトの応答、動態を解析することで、脳虚血におけるペリサイトの役割について明らかにする。

3. 研究の方法

培養ヒト脳血管ペリサイトを用いて、細胞外刺激を加え、発現するmRNA、タンパク質、細胞内Ca濃度変化を検討した。RNA干渉法を用いて、発現するタンパク質を抑制し、その作用を確認した。マウスあるいはラット中大脳動脈閉塞モデルにおいて、免疫染色を用いて脳梗塞巣周囲に発現するタンパク質を検討した。

(1) 細胞培養：ヒト脳微小血管ペリサイトを継代培養した(3-10世代)。

(2) 細胞内Ca測定法：fura-2 (2 μ M) を細胞に負荷し、励起波長340/380 nm・蛍光510nmで細胞内Ca濃度の測定を行った。

(3) 細胞内 pH 測定法：BCECF (1 μ M) を細胞に負荷し、励起波長 450/490 nm・蛍光 510nmで細胞内 pH の測定を行った。

(4) RT-PCR 法、real-time PCR 法を用いて mRNA の発現を検討した。

(6) Western blotting を用いてタンパク質の発現を検討した。

(7) RNA 干渉：siRNA を electroporation (電気穿孔法) により培養細胞内に導入し、mRNA 発現抑制した。

(8) 細胞外酸性化に対する脳血管ペリサイトにおける RNA 発現をマイクロアレイ用いて網羅的に検討した。

(9) マウス中大脳動脈閉塞モデルにおいて脳梗塞巣を作成した。

(10) 免疫染色によりタンパク質の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞外酸性化は細胞形質膜に存在する NHE1 を逆回転モードで活性化し、細胞内Ca振動を惹起した (Ca oscillation)。

(2) 周期的に上昇する細胞内Caは、CaMKII のリン酸化をおこし、さらにリン酸化した CAMKII は各内に移行した。

(3) 核内に移行した CAMKII は CREB をリン酸化し、CRE領域に結合することで、遺伝子発現を制御した。

(4) マイクロアレイで検討すると、細胞外の酸性化刺激は、CREBにより制御される IL-6 などの様々な遺伝子の発現が増加した。

(5) PDGFR β を発現する培養脳血管ペリサイトにおいて、PDGF-B は NGF、NT-3 などの神経栄

養因子を分泌した。

(6) 培養脳血管ペリサイトにおいて、PDGF-B は Akt を介して細胞増殖、抗アポトーシス作用を示した。

(7) ラットの中大脳動脈閉塞モデルでは、脳血管ペリサイトは傷害数日後に梗塞巣周囲に高度に集簇した。同部位では PDGF-B が内皮細胞に高度に発現していた。

(8) 細胞外酸性化により発現調節される IL-6 等の遺伝子は、脳梗塞巣周囲で脳血管ペリサイトに発現していた。

脳虚血時に起こるアシドーシスは脳血管ペリサイトにおいて、種々の遺伝子の発現を変化させ神経保護作用を発揮する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. J Neurochem. 2012;123 Suppl 2:29-38. 査読あり

(2) Nakamura K, Kamouchi M, Arimura K, Nishimura A, Kuroda J, Ishitsuka K, Tokami H, Sugimori H, Ago T, Kitazono T. Extracellular acidification activates cAMP responsive element binding protein via Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-mediated Ca²⁺ oscillation in central nervous system pericytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(11):2670-7. 査読あり

(3) 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;83(3):352-9. 査読あり

(4) 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;9(1):1-9. 査読あり

- (5) Kamouchi M, Ago T, Kuroda J, Kitazono T. The possible roles of brain pericytes in brain ischemia and stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2012;32(2):159-65. 査読あり
- (6) Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/NOX family proteins in the vascular system. -Review and perspective-. *Circ J*. 2011;75(8):1791-800. 査読あり
- (7) Kamouchi M, Ago T, Kitazono T. Brain pericytes: emerging concepts and functional roles in brain homeostasis. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31(2):175-93. 査読あり
- (8) Shono Y, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Nakamura K, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Change in intracellular pH causes the toxic Ca²⁺ entry via NCX1 in neuron- and glia-derived cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(3):453-60. 査読あり

[学会発表] (計13件)

- (1) 西村中, 吾郷哲朗, 黒田淳哉, 杉森宏, 鴨打正浩, 佐々木富男, 北園孝成: 脳虚血病態におけるペリサイト NADPH oxidase 4 の役割, 第 38 回日本脳卒中学会総会, 2013. 3
- (2) 有村公一, 吾郷哲朗, 黒田淳哉, 鴨打正浩, 西村中, 佐々木富男, 北園孝成: 内皮細胞 NADPH oxidase 4 の過剰発現は脳虚血を増悪させる, 第 38 回日本脳卒中学会総会, 2013. 3
- (3) Koichi Arimura, Tetsuro Ago, Ataru Nishimura, Junya Kuroda, Hiroshi Sugimori, Masahiro Kamouchi, Tomio Sasaki, Takanari Kitazono: Endothelial NADPH Oxidase 4 Worsens Ischemic Stroke by Suppressing eNOS Activity. *International Stroke Conference 2013*. 2 Hawaii
- (4) Himiko Tokami, Tetsuro Ago, Masahiro Kamouchi, Ryu Matsuo, Junya Kuroda, Kenji Fukuda, Seiji Gotoh, Tetsu Isomura, Hideo Awano, Kazuo Suzuki, Yasushi Okada, Yutaka Kiyohara, Takanari Kitazono: RANTES is a Key

- Chemokine Produced in the Brain During Ischemic Stroke. *Asia Pacific Stroke Conference, 2012*. 9 Tokyo
- (5) 吾郷哲朗, 有村公一, 石東光司, 牧原典子, 黒田淳哉, 鴨打正浩, 佐々木富男, 北園孝成: 脳虚血病態におけるペリサイトの役割, 第 37 回日本脳卒中学会総会, 2012. 4
- (6) 黒田淳哉, 吾郷哲朗, 鴨打正浩, 中村麻子, 有村公一, 石東光司, 砥上妃美子, 牧原典子, 西村中, 北園孝成: 脳血管周皮細胞における活性酸素生成酵素 Nox4 を介したシグナル伝達経路の検討, 第 37 回日本脳卒中学会総会, 2012. 4
- (7) 有村公一, 吾郷哲朗, 黒田淳哉, 杉森宏, 鴨打正浩, 佐々木富男, 北園孝成: 脳虚血における PDGF-B シグナルを介したペリサイトの神経保護作用, 第 37 回日本脳卒中学会総会, 2012. 4
- (8) Koichi Arimura, Tetsuro Ago, Masahiro Kamouchi, Hiroshi Sugimori, Junya Kuroda, Koji Ishitsuka, Tomio Sasaki, and Takanari Kitazono: Neuroprotective Role of Brain Pericytes through PDGFR{beta}-Akt Signaling in Ischemic Stroke, *International Stroke Conference 2012*. 2
- (9) Koichi Arimura, Tetsuro Ago, Junya Kuroda, Koji Ishitsuka, Ataru Nishimura, Hiroshi Sugimori, Masahiro Kamouchi, Tomio Sasaki, and Takanari Kitazono: Role of NADPH oxidase 4 in Brain Endothelial Cells after Ischemic Stroke. *International Stroke Conference 2012*. 2
- (10) 石東光司, 吾郷哲朗, 砥上妃美子, 有村公一, 中村晋之, 牧原典子, 鴨打正浩, 北園孝成, 低酸素時の Neurovascular Unit におけるニューロトロフィンを介した細胞間相互作用, 第 36 回日本脳卒中学会総会, 2011. 08. 01.
- (11) 有村公一, 吾郷哲朗, 黒田淳哉, 杉森宏, 鴨打正浩, 佐々木富男, 北園孝成, 脳微小血管内皮細胞における活性酸素産生酵素 Nox4 の役割解析, 第 36 回日本脳卒中学会総会, 2011. 08. 01.
- (12) 中村晋之, 吾郷哲朗, 鴨打正浩, 有村公一, 石東光司, 砥上妃美子, 中村麻子, 牧原典子, 北園孝成, 低酸素環境におけ

る脳血管周皮細胞の遺伝子発現の変化、
第 52 回日本神経学会総会、2011. 05. 19.

- (13) Koichi Arimura, Tetsuro Ago, Masahiro Kamouchi, Hiroshi Sugimori, Kuniyuki Nakamura, Koji Ishitsuka, Tomio Sasaki, Takanari Kitazono, Roles of PDGF-PDGF-R β Signaling in Brain Pericytes in Ischemic Stroke, International Stroke Conference 2011. 02. 09.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴨打 正浩 (KAMOUCHI MASAHIRO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80346783

(2) 連携研究者

吾郷 哲朗 (AGO TETSURO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30514202