

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592092

研究課題名(和文) 浸潤細胞を使って脳梗塞を治す

研究課題名(英文) New treatment method of cerebral infarction with infiltrating cells

研究代表者

久門 良明 (KUMON, YOSHIKI)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80127894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞巣に浸潤するBINCs (Brain Iba1+/NG2 Cells：Iba1とNG2 proteoglycanを同時発現するマクロファージ様細胞)は、多能性前駆細胞としての役割も期待される。BINCsの梗塞巣侵入機序へのchemokine (MCP-1とFractalkine)の関与を検討した。

その結果、虚血早期に先ずMCP-1を高発現した血管内皮細胞にCCR2+のBINCsが接着し、その後CX3CR1陽性のBINCsが脳梗塞巣の血管を取り巻くFractalkine陽性の astrocyteのendfeetに向かって侵入するという機序が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells) accumulate in the ischemic core (IC), and may play neuroprotectively. The chemokine-based mechanisms underlying the invasion of BINCs were investigated.

We found isolated BINCs expressed mRNA encoding CCR2 and CX3CR1 at high levels. Cultured astrocytes expressed mRNA encoding their ligands, MCP-1 and fractalkine (FK). Recombinant MCP-1 and/or FK, as well as astrocytes, induced the migration of BINCs in vitro. The mRNA for MCP-1, FK, CCR2, and CX3CR1 was expressed in the IC during the acute phase. Immunohistochemical studies revealed vascular endothelial cells and astrocytic endfeet expressed MCP-1 and FK. CCR2+/Iba1+ monocytes attached to the inside of vascular wall at 1 day post-ischemia (dpi), and there were CCR2+/CX3CR1+ macrophage-like cells in the parenchyma of the IC at 2 dpi, which may be progenitors for BINCs. These results suggest CCR2+ monocytes are first attracted to the IC by MCP-1+ endothelial cells and migrate toward FK+ astrocytic endfeet.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 脳神経外科学

キーワード：脳血管障害学

1. 研究開始当初の背景

我々は、*in vitro*の実験で、マイクログリアがニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトになるポテンシャルを有することを確認した (Yokoyama A et al. GLIA 45:96-104, 2004)。また、ラット局所脳虚血モデルを用いた *in vivo* 実験でも、虚血中心部に虚血後7日目をピークに、抗 anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)陽性細胞および NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (幹細胞に発現するとされる) 陽性細胞が出現することを観察し、これらの細胞のなかには、両者が陽性の細胞が多数含まれることを明らかにした (J Neurosci Res, 2007)。さらに、Iba1陽性細胞の一部は nestin ないし glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性であることを見だし、虚血中心部に出現してくるマイクログリアには *in vitro*と同様に、多能性前駆細胞の役割を有する可能性を示した (Neurosci Lett, 2007)。また、これが骨髄由来細胞であり、虚血脳より採取した多分化能をもつマイクログリアを虚血負荷後の虚血脳中心部に注入することにより、脳梗塞が軽減されることを明らかにした (J Cereb Blood Flow and Metab, 2010)。つまり、浸潤する多分化能を有するマイクログリアを増やすことが治療につながると考えられた。

2. 研究の目的

以下を目的とした。(1) 多分化能をもったマイクログリアの前駆細胞が、虚血脳内へ浸潤する機序に関わるケモカインと多分化能をもつに到る過程を明らかにする。(2) その後、骨髄からの多分化能マイクログリア前駆細胞の脳内浸潤を高めるケモカインを虚血脳内に注入し、浸潤細胞を増加させて、多分化能をもったマイクログリアに変わる過程を観察する。(3) さらに、ケモカインの注入が、既報した多分化能をもったマイクログリア注入に

よる効果と同等に、脳梗塞を縮小させることを確認する。

3. 研究の方法

(1) 多分化能をもつマイクログリアの前駆細胞が虚血脳に浸潤し、多分化能をもつに到る過程を明らかにする。そのために、[1] ラットに脳梗塞を作製し、梗塞巣より多分化能をもつマイクログリアを採取し、MCP-1, Fraktalkine 等と CCR2, CX3CR1 等の mRNA の発現量を、一次培養アストロサイト、マイクログリアとともに RT-PCR で評価する。[2] Boyden chamber 法を用いて、MCP-1 や Fraktalkine 等のケモカインが、多分化能をもつマイクログリアの浸潤能を高めるかを明らかにする。[3] 梗塞巣における MCP-1、Fraktalkine (浸潤細胞を集積するケモカイン) と CCR2、CX3CR1 (ケモカインに対する浸潤細胞に発現するレセプター) の mRNA 発現量を RT-PCR で経時的に評価し、同様に免疫組織学的にもその局在を検討する。さらに CCR2、CX3CR1 等を発現する浸潤細胞が、Iba1, NG2 を用いて、多分化能を有する過程を観察する。

(2) 多分化能をもつマイクログリアの前駆細胞の浸潤を高めるケモカインを虚血脳に直接注入し、経時的に脳を摘出し、浸潤細胞の増加と多分化能をもったマイクログリアへ変化する過程を観察する。そのために、[1] ラットに虚血負荷を加え、直後と2日目に、ケモカインを脳内に注入する。2日目以降、経時的に脳を摘出し、浸潤した細胞の多分化能をもつマイクログリアへの変化を観察するため、抗 Iba1 抗体、抗 NG2 抗体、抗 nestin 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いて、Iba1 陽性細胞が、その他の抗体の同時発現についての経時的变化を免疫組織学的に明らかにする。[2] 多分化能をもつマイクログリア出現の経時的検討のため、同抗体を用いて、ウェスタンブロットで、経時的に各種細胞の発現の有無と程度について半

定量的に検討する。[3] マイクログリアの多能性幹細胞としての可能性の検討するため、各時期の脳より分離した Iba-1 陽性のマイクログリアを培養し、各種抗体を用いて染色し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドログリアーマへの分化の有無について観察する。

(3) 多分化能をもつマイクログリアの前駆細胞の浸潤を高めるケモカインを虚血脳内に直接注入することで、神経学的変化や行動学的評価を行い、その神経保護効果を確認する。そのために、[1] ラットに虚血負荷を加え、直後と 2 日目でのケモカイン注入群と vehicle 注入群とを作製する。[2] 各群ラットに対して、経時的に神経学的所見や行動学的検査を行う。[3] 行動学的評価を行った後、脳を摘出し、梗塞の範囲を組織学的に観察する。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞巣へのマイクログリア前駆細胞の浸潤機序について明らかにした。

[1] 脳梗塞巣から分離した BINCs と一次培養 astrocyte、microglia において、MCP-1 と Fractalkine、その receptor である CCR2、CX3CR1 の mRNA 発現量を real time PCR 法を用いて検討した結果、MCP-1、Fractalkine は astrocyte で、CCR2 と CX3CR1 は BINCs で高発現していた (図 1)。

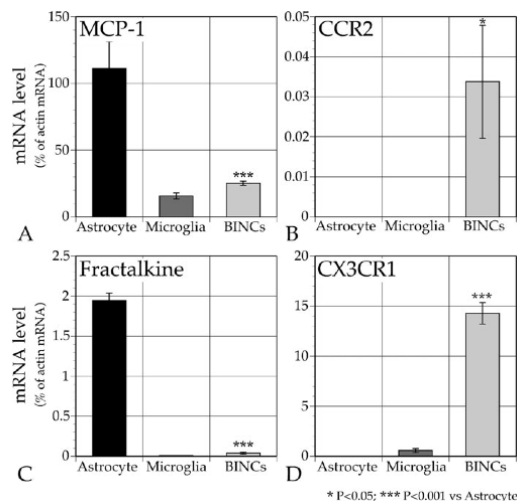


図 1 : 各細胞での mRNA の発現

[2] Boyden chamber 法にて、astrocyte、microglia、fibroblast、混合した MCP-1 と Fractalkine (各々 1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml) に対する BINCs の migration 能を評価した結果、astrocyte および MCP-1 と Fractalkine の混合 (各々 10ng/ml) に対して migration が促進された (図 2)。

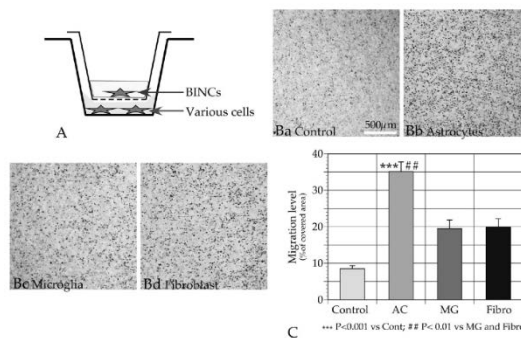


図 2 : BINCs の浸潤能

[3] 虚血 1、2、3、5、7 日目の脳梗塞巣における MCP-1、Fractalkine、CCR2、CX3CR1 の mRNA の発現量を評価した結果、MCP-1、CCR2 では虚血後初期からの発現が高く、その後減少し、Fractalkine、CX3CR1 は経時的に上昇し、5 日目と 7 日目で高くなっていた (図 3)。

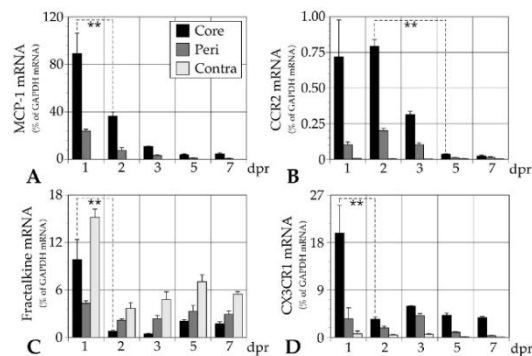


図 3 : 梗塞巣での mRNA の経時的発現

[4] 虚血 1、2 日目の脳梗塞組織を免疫組織学的に検討した結果、虚血後 1 日目に、MCP-1 は血管内皮細胞での発現が高く、2 日目には発現が弱くなっていた (図 4)。虚血 1 日目に Fractalkine は GFAP 陽性細胞で強発現しており、GFAP 陽性の astrocyte の endfeet が血

管周囲を取り巻いているのが観察された。2日目には、虚血巣で mRNA の経時的変化と一致するように、その発現がほぼ見られなくなった (図 5)。また、虚血 1 日目の脳梗塞巣には、血管周囲脳実質に、CCR2 陽性の BINCs が侵入しているのが観察され、2 日目にはさらに脳実質内に侵入している様子が確認された。同様に CX3CR1 陽性の BINCs も観察されたが、虚血 2 日目の方の発現がより強いことが確認された (図 6, 7)。

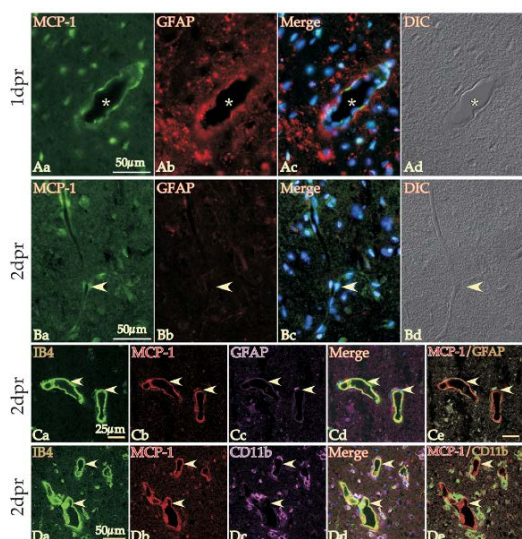


図 4 : 梗塞巣の MCP-1 発現 (1, 2 日目)

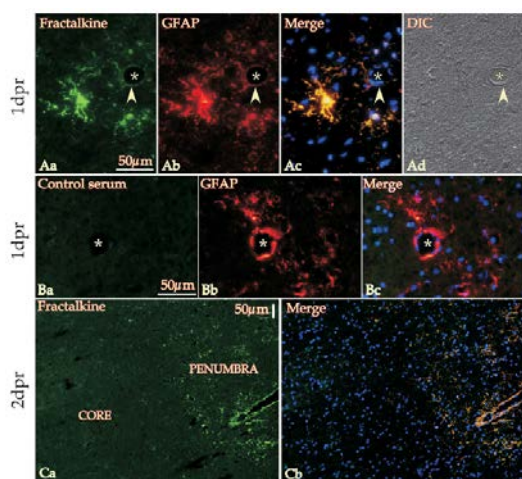


図 5 : 梗塞巣の Fractalkine 発現 (1, 2 日目)

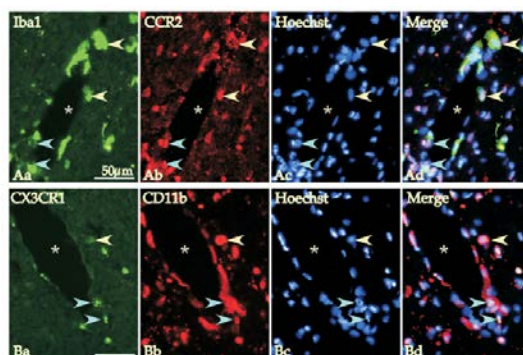


図 6 : 梗塞巣での BINCs の局在 (1 日目)

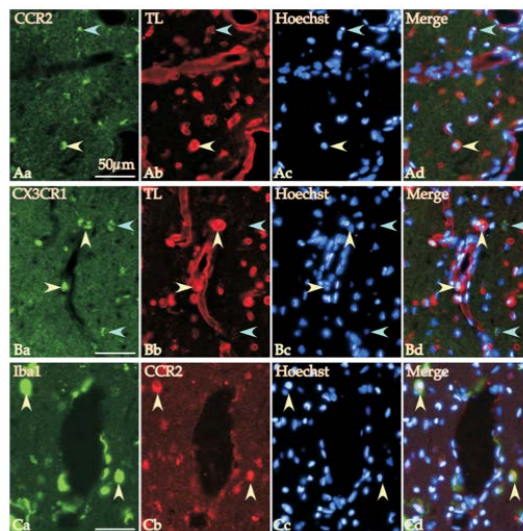


図 7 : 梗塞巣での BINCs の局在 (2 日目)

以上より、虚血早期にまずは MCP-1 を高発現した虚血巣の血管内皮細胞に CCR2+ の BINCs が接着し、その後 CX3CR1 陽性の BINCs が血液脳関門の破綻した脳梗塞巣の血管を取り巻く Fractalkine 陽性の astrocyte の endfeet に向かって侵入していくという機序が考えられ、虚血巣への BINCs の侵入には MCP-1、Fractalkine の両者が関与していると示唆された。この結果は、梗塞巣中心部への細胞浸潤が、血管破綻による受動的移動のみではなく、ケモカインを介した能動的移動であることを示している。BINCs の中には NG2、Nestin、GFAP 陽性細胞も含まれており、浸潤当初は神経再生に関与する可能性があるものの、通常的环境下では、それらの細胞に分化することができず、組織の貪食作用のみを示すと考えられた。当初の計画にあったケモカイン注入によるマイクログリア前駆細胞の脳梗塞巣への浸潤を高める効果や、それによる脳保護効果の検討には到らなかったが、なんらかの方法で BINCs 浸潤を高めれば、脳梗塞

巢の縮小効果が得られると推測される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) SUGIMOTO Kana, NISHIOKA Ryutaro, IKEDA Airi, MISE Ayano, TAKAHASHI Hisaaki, YANO Hajime, KUMON Yoshiaki, OHNISHI Takanori, TANAKA Junya: Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF- β 1. Glia, 査読有, 62, 2014, 185-198 (DOI:10.1002/glia.22598)

(2) TEI Nari, TANAKA Junya, SUGIMOTO Kana, NISHIHARA Tasuku, NISHIOKA Ryutaro, TAKAHASHI Hisaaki, YANO Hajime, MATSUMOTO Shirabe, OHUE Shiro, WATANABE Hideaki, KUMON Yoshiaki, OHNISHI Takanori: Expression of MCP-1 and Fractalkine on Endothelial Cells and Astrocytes May Contribute to the invasion and migration of brain macrophages in ischemic rat brain lesions. Journal of Neuroscience Research, 査読有, 91 巻, 2013, 681-693 (DOI: 10.1002/jnr.23202.Epub2013Feb 12.)

(3) NISHIHARA Tasuku, OCHI Michihisa, SUGIMOTO Kana, TAKAHASHI Hisaaki, YANO Hajime, KUMON Yoshiaki, OHNISHI Takanori, TANAKA Junya: Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats. Experimental Neurology, 査読有, 229 巻, 2011, 507-516 (DOI:10.1016/j.expneurol.2011.04.006)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 松本 調、渡邊英昭、久門良明、大西丘倫、田中潤也：脳梗塞巣に集結するマクロファージ様細胞における CD200 / CD200R の機能。第 39 回日本脳卒中学会総会，2014 年 3

月 13～15 日，大阪市

(2) 鄭 菜里、渡邊英昭、久門良明、大西丘倫、田中潤也：BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells) の脳梗塞巣への侵入機序の検討。第 71 回日本脳神経外科学会学術総会，2012 年 10 月 17 日～19 日，大阪市

(3) 鄭 菜里、渡邊英昭、久門良明、大西丘倫、田中潤也：BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells) の脳梗塞巣への侵入機序の検討。第 36 回日本脳卒中学会総会 2011 年 7 月 30 日～8 月 1 日、京都市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久門 良明 (KUMON, Yoshiaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80127894

(2) 研究分担者

渡邊 英昭 (WATANABE, Hideaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30322275

(3) 連携研究者 なし