

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650159

研究課題名（和文） 血管内皮細胞が白質梗塞を劇的に回復する機構の解析

研究課題名（英文） How do vascular endothelial cells ameliorate white matter damage?

## 研究代表者

石崎 泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90183003

研究成果の概要（和文）：脳微小血管内皮細胞を白質梗塞巣に移植するといった脱髄した軸索の再髄鞘化が劇的に促進されること、脳微小血管内皮細胞をオリゴデンドロサイト前駆細胞と共培養すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が促進されることを明らかにした。脳微小血管内皮細胞の馴らし培地でも、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖促進効果が認められたので、脳微小血管内皮細胞が合成・分泌する液性因子がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進することが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：I found that transplantation of cerebral microvascular endothelial cells ameliorates white matter damage. I also found that cerebral microvascular endothelial cells stimulate proliferation of oligodendrocyte precursor cells in vitro. The conditioned medium from microvascular endothelial cell culture also stimulates proliferation of oligodendrocyte precursor cells, indicating that a humoral factor produced and released by endothelial cells acts as a mitogen for oligodendrocyte precursor cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：移植・再生医療、神経科学、脳神経疾患、再生医学、細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 系統発生学的に見て血管系は神経系よりも遅く発達したため、血管系の発生に関わる分子は、神経系の発生に関わる分子を利用しており、神経系の発生は血管系の発生と相互に依存していると考えられている。

(2) 研究代表者は連携研究者の今井英明博士（東京大学医学部附属病院脳神経外科）と共に、様々な白質障害疾患に対応すべく、新たな治療法の開発を目的として、細胞移植により白質障害の機能を改善させる治療法の実現を目指してきた。その過程で、脳微小血

管内皮細胞を梗塞巣に移植するといった脱髄した軸索の再髄鞘化が劇的に促進されるという予備実験結果を得た。しかしその分子・細胞基盤は全く明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

上記のように研究代表者は脳微小血管内皮細胞が脱髄した軸索の再髄鞘化を劇的に促進するという予備実験結果を得た。本研究は、まずこの予備実験結果を確認すると共に、その分子・細胞基盤を明らかにし、血管系細胞と神経系細胞の未知の相互作用

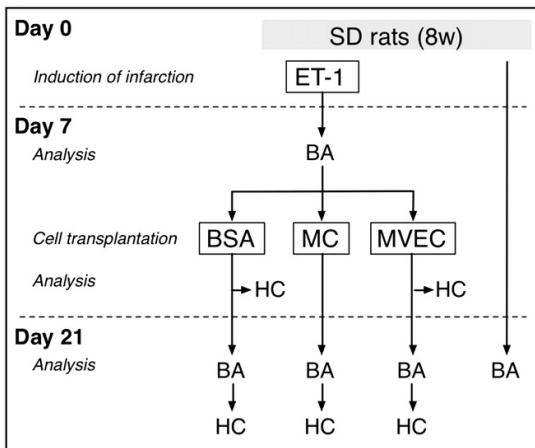
用を明らかにすることを目的とした。そのため本研究では研究期間内に、以下の3点の解明を目指した。

(1) 成体ラット脳から調製・培養した微小血管内皮細胞を、エンドセリンの定位的注射により誘導した白質梗塞巣に移植、梗塞巣における脱髄軸索の再髄鞘化が促進されるか否か、また運動機能の回復を促進するか否かを明らかにする。

(2) 血管内皮細胞が直接働きかける標的が神経軸索か、あるいはオリゴデンドロサイト前駆細胞かを決定する。軸索の再髄鞘化が起きるためには、軸索そのものが健全に保たれていることが必要である。その上で、不活化状態にあるオリゴデンドロサイト前駆細胞が活性化・増殖し、髄鞘化オリゴデンドロサイトに最終分化して再髄鞘化を行うと考えられるが、血管内皮細胞がこの一連のステップのどの段階に関与するのかを明らかにする。

(3) 血管内皮細胞が軸索の再髄鞘化を促進する分子基盤を明らかにする。(2)で血管内皮細胞の標的を明らかにした上で、その分子基盤を明らかにする。軸索の維持に関わることが明らかになった場合は、血管内皮細胞由来の軸索維持因子を同定する。オリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖、あるいは最終分化に関与していることが明らかになった場合は、血管内皮細胞由来でオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖、あるいは最終分化に関与する因子を同定する。

### 3. 研究の方法



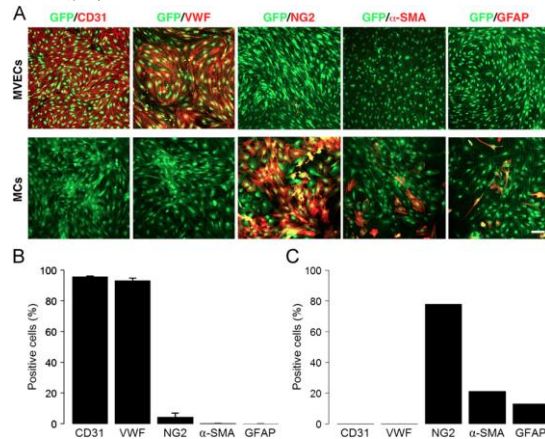
(1) 8週齢のSDラット内包に定位的にエンドセリン-1 (ET-1) を注射し、白質梗塞を誘導した。7日後に行動解析 (BA、フットプリント試験) を行った後、3週齢のE-GFP-SDラット大脳から調製した脳微小血管内皮細胞 (MVECs) を定位的に梗塞部位に移植した。対照としては1日齢のE-GFP-SDラット大脳から調製した髄膜細胞 (MC) 及び0.2%BSAを

含むHBSS (BSA) を用いた。細胞移植14日後 (梗塞誘導21日後) にフットプリント試験を行った後、大脳を摘出して組織学的解析 (HC) を行った。組織学的解析は免疫蛍光染色法により GLUT-1、ED-1、dBMP の検出を行い、ミエリンはLuxol fast blue (LFB) で染色した。

(2) オリゴデンドロサイト前駆細胞は3週齢のSDラット大脳から調製し、同じく3週齢のSDラット大脳から調製した脳微小血管内皮細胞ないし周皮細胞 (pericytes)、Rat-1細胞 (繊維芽細胞系の細胞株) と無血清培地中で共培養した。オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖はBrdU取り込み能により評価した。

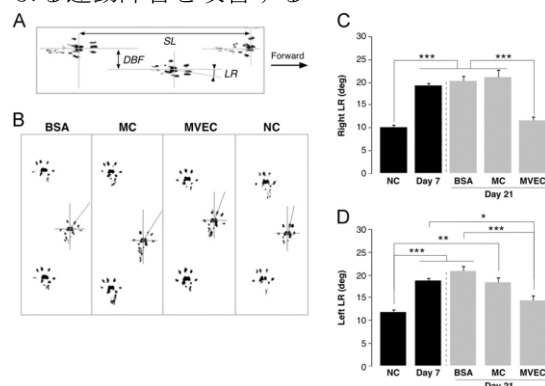
### 4. 研究成果

(1) 細胞移植用の高純度脳微小血管内皮細胞の調製



上図に示すように、E-GFP-SDラット大脳から調製した脳微小血管内皮細胞標品 (MVECs) はCD31、von Willebrand factor (VWF) 陽性で、NG2、 $\alpha$ -SMA、GFAP 陰性の高純度のものであった。一方対照として用いた髄膜細胞標品 (MCs) は80%程度がNG2陽性で、内皮細胞は含まれていなかった。

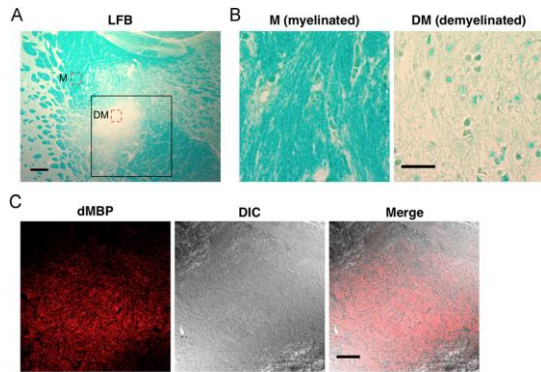
(2) 脳微小血管内皮細胞移植は白質梗塞による運動障害を改善する



白質梗塞誘導後7日目及び21日目にフットプリント試験を行った。梗塞7日後ではstride length (SL) 及び distance between feet (DBF) は、梗塞誘導群 (Day 7) と対照

群 (NC) の間に差異は認められなかったが、limb rotation (LR)は梗塞誘導群 (Day 7) が対照群 (NC) と比べて有意に増大していた。梗塞 21 日後では、BSA 注射群 (BSA) 及び MC 移植群 (MC) では有意な LR 増大改善は認められなかったが、MVEC 移植群 (MVEC) では LR 増大が有意に改善していた。これらの結果は右側だけでなく左側でも同様であった。

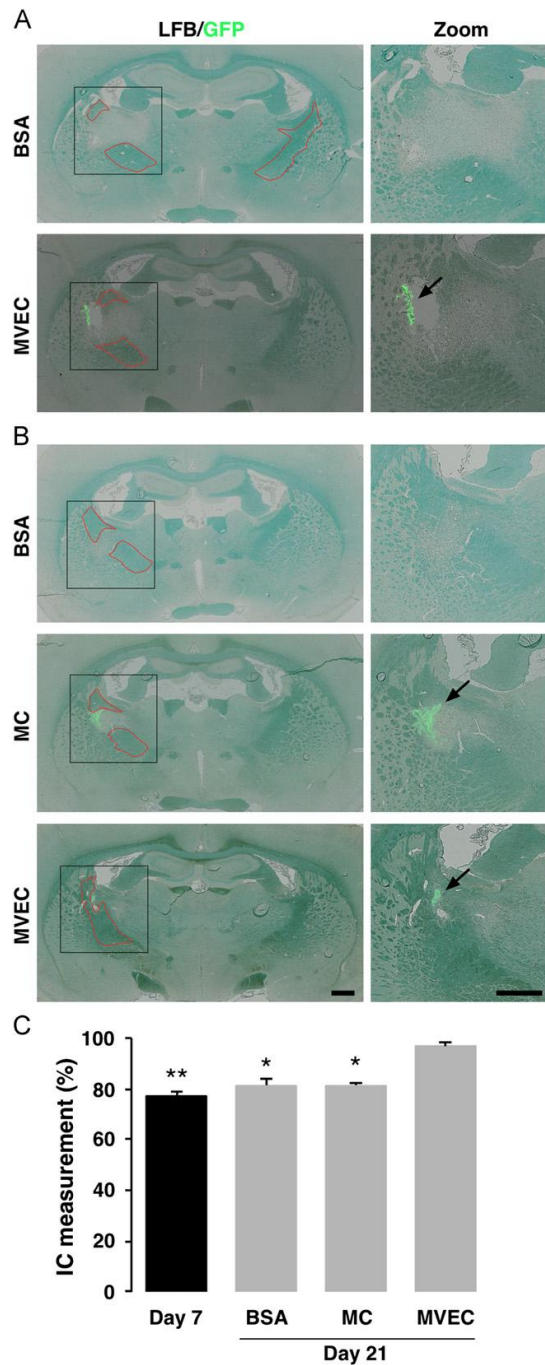
(3) 内包の白質梗塞では軸索の脱髄が生じている



梗塞 21 日後に LFB 染色を行ったところ、梗塞部位では LFB で染まらない部分 (DM) があることが明らかになった。この部分で脱髄が起きていることを確かめるために、分解された MBP (myelin basic protein, 髄鞘の構成タンパク質) を検出する抗 dMBP (degraded myelin basic protein) 染色を行ったところ、LFB 陰性の部分は dMBP 陽性であること、すなわち脱髄が起きていることが明らかになった。

(4) 内皮細胞移植は脱髄軸索の再髄鞘化を促進する

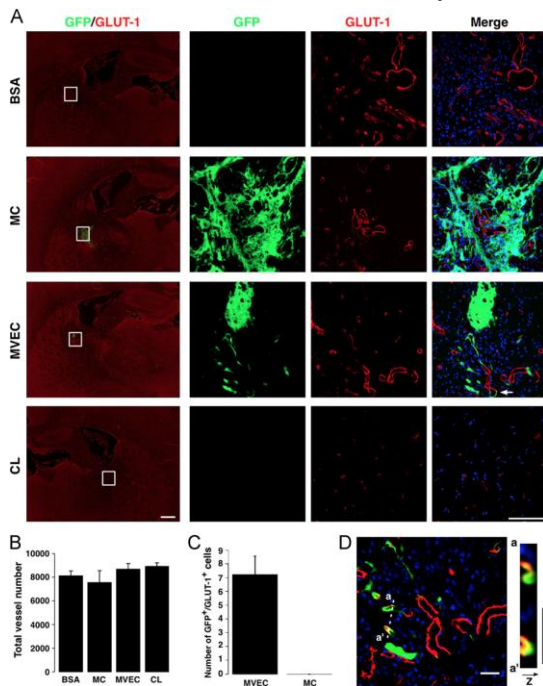
白質梗塞誘導後 7 日目及び 21 日目 (細胞移植後 14 日目) に大脳を摘出、薄切切片を作製し、LFB 染色を行ったところ、7 日目では BSA 注射群、MC 移植群、MVEC 移植群ともに内包に大きな脱髄巣が生じていることが明らかになった。21 日目では BSA 注射群及び MC 移植群では 7 日目と比べて脱髄巣の有意な縮小は認められなかったが、MVEC 移植群では 7 日目と比べて有意に脱髄巣が縮小していた。すなわち脳微小血管内皮細胞移植により脱髄軸索の再髄鞘化が促進されることが明らかになった。またこの時 (細胞移植後 14 日目)、内包の体積を連続切片の LFB 染色により算出すると (IC measurement)、BSA 注射群及び MC 移植群では対側に比べて有意に減少したままであったが、MVEC 移植群ではほぼ対側 (健常側) のレベルにまで回復していることが明らかになった。



(5) 移植された内皮細胞の一部は宿主の血管系に取り込まれる

移植された内皮細胞が宿主の血管に取り込まれ、血管数及び血流を増加させて脱髄軸索の再髄鞘化を促進している可能性を検証するために、MVEC 移植後 14 日目に大脳を摘出し、血液脳関門 (blood-brain barrier) を形成している血管内皮細胞が発現している GLUT-1 に対する抗体を用いて染色したところ、移植した細胞 (GFP 陽性) の一部は GLUT-1 陽性で宿主の血管系に取り込まれていることが明らかになったが、大部分は移植部位に塊として存在し、宿主の血管系には取り込まれていないことも明らかになった。またこの

時、MVEC 移植群でも内包の血管数は有意に増加していないことが明らかになった。



(6) 内皮細胞移植は神経軸索の変化には影響を与えない

MVEC 移植時に神経軸索が MC 移植時に比べて正常に保たれるか否かを抗タウ抗体染色、抗ニューロフィラメント染色を用いて解析したところ、MVEC 移植群と MC 移植群の間で有意な差異は認められなかった。このことから、MVEC 移植時に脱髄軸索の再髄鞘化が促進されるのは、血管内皮細胞により神経軸索が対照群に比して正常に近く保たれるためではないことが強く示唆された。

(7) in vitro の培養系で脳微小血管内皮細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進する

脳微小血管内皮細胞をオリゴデンドロサイト前駆細胞と無血清培地中で共培養すると、BrdU 取り込みが対照群 (周皮細胞、Rat-1 細胞) に比べて有意に増加した。脳微小血管内皮細胞の馴らし培地 (conditioned medium) でも対照群と比べてオリゴデンドロサイト前駆細胞による BrdU 取り込みを有意に増加させた。このことから内皮細胞が合成・分泌する液性因子がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進することが強く示唆された。

## 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 5 件)

① Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M., Ishizaki, Y.: Dynamic

Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. *PLoS one* 査読有 8: e53109 (2013)

② Matsumoto, H., Shibasaki, K., Uchigashima, M., Koizumi, A., Kurachi, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Watanabe, M., Kishi, S., Ishizaki, Y.: Localization of acetylcholine-related molecules in the retina: implication of the communication from photoreceptor to retinal pigment epithelium. *PLoS one* 査読有 7: e42841 (2012)

③ Puentes, S., Kurachi, M., Shibasaki, K., Naruse, M., Yoshimoto, Y., Mikuni, M., Imai, H., Ishizaki, Y.: Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic white matter damage. *Brain Res.* 査読有 1469: 43-53 (2012).

④ Yamada, H., Akahoshi, N., Kamata, S., Hagiya, Y., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Takano, N., Mori, M., Ishizaki, Y., Izumi, T., Kumagai, Y., Kasahara, T., Suematsu, M., Ishii, I. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine gamma-lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic. Biol. Med.* 査読有 52: 1716-1726 (2012).

⑤ Cai, N., Kurachi, M., Shibasaki, K., Okano-Uchida, T., Ishizaki, Y.: CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *Cerebellum* 査読有 11: 181-193 (2012).

[学会発表] (計 2 件)

① 石崎泰樹、脳微小血管内皮細胞移植は白質梗塞巣における再髄鞘化を促進する、第 85 回日本生化学会大会、2012. 12. 15、福岡国際会議場 (福岡県)

② Ishizaki, Y.、Astrocyte precursor cells in the developing mouse cerebellum、the 23<sup>rd</sup> Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) and the European Society for Neurochemistry (ESN)、2011. 8. 29、アテネ国際会議場 (アテネ、ギリシア)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/neurosci/neurosci-development/109.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90183003

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：20399554

今井 英明 (IMAI HIDEAKI)  
東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号：70359587

成瀬 雅衣 (NARUSE MASAE)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60455219