

脳梗塞後の修復応答により誘導される梗塞周囲再髄鞘化および機能回復の分子細胞機構についての研究

吾郷哲朗

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学

【研究の背景】

我々はヒト脳梗塞の臨床疫学研究およびマウス脳梗塞モデルを用いた基礎研究を通して、脳梗塞後機能転帰に影響を及ぼす因子の同定に努めてきた。ヒト臨床疫学研究では、2007 年に開始した多施設共同・前向き・急性期脳梗塞患者登録研究である Fukuoka Stroke Registry (FSR: 現在 17,000 名超の患者登録) を用いた検討を行っている。脳梗塞サイズや発症時の重症度は 3 ヶ月後の機能転帰を左右する重要な因子であることに間違いはないが、これらを多変量調整しても転帰に影響を及ぼす因子は様々に存在する。特に糖代謝と機能回復の是非には密接な関係があり、糖質が脳における最大のエネルギー源であることを裏付けている。また脳梗塞発症時のタンパク尿¹⁾やインスリン抵抗性²⁾の有無が機能転帰に重大な影響を及ぼすことを FSR により報告した。糖尿病は機能回復過程における組織修復を阻害する重要な因子であることから、脳梗塞組織修復の是非と脳機能回復の是非が密接に関連する可能性を考慮して我々は継続的な基礎研究を行っている。マウス脳梗塞モデルを用いた我々の長年の検討により、脳梗塞後の組織修復にペリサイトが重要な役割を果たすことが明らかとなってきた³⁻⁷⁾。糖尿病性網膜症の本体がペリサイト機能障害であることは周知の事実である。脳虚血病態でも、梗塞内部の内皮細胞が比較的強い虚血耐性を示すのに対しペリサイトは容易に脱落する。近年臨床的に可能となった早期再灌流療法によって、脳梗塞が生じた後であっても梗塞内部のペリサイト死を回避できる可能性を我々は基礎的に証明した³⁾。また脳梗塞回復過程では、微小血管周囲のペリサイトから形質転化・増殖した線維芽細胞によって梗塞内部が充填されること、これらの細胞は豊富な神経栄養因子・増殖因子を分泌すること、などをこれまでに報告してきた^{3,5,6)}。梗塞周囲アストログリオーシスの神経機能回復における役割には賛否あるが、近年の成果からは機能回復を補助・促進する重要な因子である可能性も示唆されている³⁾。我々は脳梗塞発症後に生じる内因性機能回復機構に注目し、再生医療の標的となりうる細胞と分子を探索している。ペリサイト由来因子およびアストログリオーシスにより、脳梗塞周囲の再髄鞘化反応が促進され、そのことによって有効な神経機能回復がもたらされる可能性があると考えている。

【目 的】

脳梗塞機能回復過程において、梗塞内部の線維性修復の是非が、梗塞周囲におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC) のオリゴデンドロサイトへの分化および再髄鞘化応答にどのような影響を及ぼすか、また、これらの応答は機能回復に関与しうるのか否か、を明らかにし、その分子細胞機構について検討する。

【方 法】

1. 光凝固によるマウス中大脳動脈遠位部閉塞・脳梗塞モデル (C57BL/6 マウスを使用) を用いて、梗塞周囲領域 OPC の増殖、OPC からオリゴデンドロサイトへの分化、髄鞘化反応、および、運動機能回復の経時的変化を観察し、梗塞内部修復過程との関連を検討した。ペリサイト機能減弱モデルマウス (= 組織修復抑制マウス) として PDGFR β heterozygous knockout マウス (PDGFR $\beta^{+/-}$) を用い、同腹子野生型マウスとの比較検討を行った。
 - ・ 2 次元レーザー血流計 (Omegazone-2) を用いて、脳梗塞作製 7・14・21・28 日後に経時的な脳血流を評価した。
 - ・ 脳組織評価: ペリサイト由来細胞を PDGFR β 染色で評価し、梗塞内部組織修復の是非を評価した。アストロサイトの

活性化は GFAP、神経細胞死については MAP2 で評価した。梗塞周囲領域における髄鞘化反応の是非を MAG/MOG/PLP 染色で評価した。OPC を Olig2、Olig2 陽性細胞の増殖能を EdU で評価した。梗塞領域を摘出して homogenate を作製し、OPC 増殖、オリゴデンドロサイトへの分化、髄鞘化応答の 3 つの事象に関連する分子について immunoblot および real-time PCR を用いて定量的に評価した。

- ・神経機能評価については、Cylinder test、Rota-rod test、mNSS の 3 つの異なる方法で脳梗塞作製 7・14・21・28 日後に評価を行った。

2. 培養ペリサイト、アストロサイト、OPC を用いた検討

- ・培養ペリサイトの上清を、培養アストロサイトに添加して、細胞内シグナル伝達(STAT3/Akt/Erk)の変化、細胞増殖・遊走能を評価した。
- ・培養ペリサイトの上清を直接 OPC、もしくは、培養アストロサイトに添加した後のアストロサイト上清を OPC に添加して、OPC の増殖を OLIG2 免疫細胞染色、また、髄鞘タンパク質 MAG/MOG/PLP の発現変化を mRNA の定量 PCR および免疫細胞染色で評価した。

【結 果】

我々の既報告に一致して、PDGFR $\beta^{+/-}$ では梗塞内部の組織修復および梗塞周囲アストログリオーシスは減弱していた。培養ペリサイトの上清を培養アストロサイトの培地に添加すると、アストロサイトにおける STAT3/Akt のリン酸化および細胞増殖・遊走が促進され、ペリサイト培地に PDGF-B を添加しておくことこれらの応答は有意に増強された。この *in vitro* の結果に一致して、PDGFR $\beta^{+/-}$ では脳梗塞周囲領域アストロサイトにおける STAT3 リン酸化は抑制されていた。アストロサイトの STAT3 リン酸化を促進する分子として IL-6 があるが、ペリサイトは PDGF-B 依存性に IL-6 を分泌し、培養ペリサイトの培地に IL-6 中和抗体を処理しておくことアストロサイトの増殖反応は減弱した。これらの結果はペリサイト由来分子がアストロサイトの活性化=グリオーシス応答を促進するとしたコンセプトを支持するものであった。OPC のマーカーである OLIG2 の抗体を用いて、脳梗塞後の脳を評価すると、発症 7 日目に梗塞周囲領域における OLIG2 陽性細胞の数は Peak となり少なくとも 28 日目まで増加は維持された。その程度は野生型マウスと PDGFR $\beta^{+/-}$ マウスで有意差を認めず、脳梗塞後・梗塞巣周囲における OPC の増加(増殖)そのものに梗塞内部の修復の是非は関与しないことが示唆された。一方、APC で評価した脳梗塞巣周囲の分化オリゴデンドロサイトの数は PDGFR $\beta^{+/-}$ で有意に低下していた。また SMI 312 抗体で染色される神経軸索の周囲に局在するミエリン塩基性タンパク質 MBP も PDGFR $\beta^{+/-}$ で有意に減弱していた。ペリサイト培養上清を、培養アストロサイトに添加し、その培養上清を培養 OPC に添加すると、MBP/MOG/PLP の発現(=髄鞘化反応)が誘導されたが、この応答は PDGF-B でペリサイトを刺激していた場合にさらに強く認められた。ペリサイト培地を培養アストロサイトに添加せず、直接培養 OPC に添加した場合においても MBP/MOG/PLP の発現増加を認めたが、その程度はアストロサイトの培養上清を経由した場合に比べると軽微なものであった。つまり、ペリサイト由来分子によってアストロサイトが活性化され、さらに活性化アストロサイトによって分泌される分子群によって OPC 分化、髄鞘化反応が誘導されている可能性が高いと考えられた。実際、脳梗塞周囲領域の免疫組織染色においても新規 MBP の発現は PDGFR β 陽性ペリサイトとの直接的な接触はなく GFAP を強発現した活性化アストロサイトに囲まれたオリゴデンドロサイトにおいて生じていることが確認された。今回我々が用いた脳梗塞モデルでは、脳梗塞内部における組織修復応答は 7 日目前後から生じ、ペリサイト由来細胞における梗塞巣の充填は 14 日前後で概ねプラトーに達し、OPC 分化・再髄鞘化応答は 14~28 日目に強く生じていた。野生型マウスではこの過程に一致して神経機能の回復がみられたが、PDGFR $\beta^{+/-}$ では概ね 14 日目以降の運動機能回復が有意に抑制されており、これに一致して OPC 分化・再髄鞘化反応も有意に抑制されていた。これらの結果は、組織修復の是非と機能回復の是非がよく相関することを支持するものと思われた⁸⁾。

【考 察】

脳傷害、とくに脱髄疾患における OPC 分化・再髄鞘化応答による機能回復機構は徐々に解明されつつある。海馬や側脳室周囲に限局して存在する神経幹細胞と異なり、OPC は白質を中心に脳全体に分布している。脳梗塞内部では OPC は細胞死に陥るが、脳梗塞後その周囲領域で OPC は速やかに増殖して再髄鞘化応答スタンバイの状態になると考えられる。し

かしながら実際オリゴデンドロサイトへの分化・髄鞘タンパク質発現という行程へ進むには、有効な血流と活性化アストロサイトの存在が不可欠と考えられる。脳梗塞後ペリサイトにおける PDGFR β 発現誘導は、虚血領域内部における血流維持・再開に極めて重要であり⁸⁾、またペリサイト由来細胞増殖の是非を規定するため、脳梗塞周囲において生じる応答の程度にも有意な影響を及ぼすようである。速やかに脳梗塞巣の組織修復を完了させることは、梗塞周囲に存在する活性化アストロサイトを介した OPC 分化・再髄鞘化反応を促進し、機能回復にも寄与するものと考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

脳梗塞における機能回復治療は今なおリハビリテーション治療のみに依存した状態であり、有効な薬物治療は存在しない。近年、神経幹細胞や間葉系幹細胞を使った治療の有効性が検証され、臨床応用への可能性が検討されているが広く普及するためには障壁も少なくない。梗塞内部の組織修復が機能回復をもたらす機構を分子細胞レベルで明らかにすることにより、実現可能な機能回復治療の概念を提唱し、新しい治療法とくに薬物治療の探索につなげたいと考えている。

【参考・引用文献】

1. Kumai Y, Kamouchi M, Hata J, Ago T, Kitayama J, Nakane H, Sugimori H, Kitazono T. Proteinuria and clinical outcomes after ischemic stroke. *Neurology* 78: 1909–15, 2012
2. Ago T, Matsuo R, Hata J, Wakisaka Y, Kuroda J, Kitazono T, Kamouchi M. Insulin resistance and clinical outcomes after ischemic stroke. *Neurology* 90: e1470–7, 2018
3. Tachibana M, Ago T, Wakisaka Y, Kuroda J, Shijo M, Yoshikawa Y, Komori M, Nishimura A, Makihara N, Nakamura K, Kitazono T. Early reperfusion after brain ischemia has beneficial effects beyond rescuing neurons. *Stroke* 48: 2222–30, 2017
4. Nishimura A, Ago T, Kuroda J, Arimura K, Tachibana M, Nakamura K, Wakisaka Y, Sadoshima J, Iihara K, Kitazono T. Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 1143–54, 2016
5. 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* 264: 127–34, 2015
6. 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* 9: 1–9, 2012
7. Komori M, Ago T, Wakisaka Y, Nakamura K, Tachibana M, Yoshikawa Y, Shibahara T, Yamanaka K, Kuroda J, Kitazono T. Early initiation of a factor Xa inhibitor can attenuate tissue repair and neurorestoration after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1718, 201–11, 2019
8. Shibahara T, Ago T, et al. Pericyte-mediated tissue repair through PDGFR β promotes peri-infarct astrogliosis, oligodendrogenesis and functional recovery after acute ischemic stroke. *eNeuro*, in press.