

脳血管障害後の組織修復に細胞外マトリックス perlecan が与える影響に関する研究

中村晋之

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学

【研究の背景】

脳梗塞や血管性認知症など血液脳関門(Blood-brain barrier; BBB)が破綻する病態では、BBB 構成因子だけでなく、細胞間の相互作用や微小環境を考慮し修復機構を解明する必要がある。中でもペリサイトは PDGF シグナルを介して脳梗塞巣周囲に増加し、周囲の細胞との相互作用を介して組織修復に関与する¹⁻⁴⁾。一方で、上皮・間質細胞間あるいは血管周囲に存在する基底膜/細胞外マトリックス(Extracellular matrix; ECM)は、細胞との相互作用により増殖や分化を制御するが、BBB における役割については不明な点が多い。ECM タンパク質の一つヘパラン硫酸プロテオグリカン perlecan は、血管内皮細胞から産生される脳血管基底膜の重要な構成成分で、種々の成長因子と結合し多彩な生物機能を有する。

【目 的】

我々は perlecan が脳血管において内皮細胞・ペリサイト間の基底膜に存在することに着目し、脳虚血病態における両細胞間の密な相互作用すなわち BBB の維持に関与しているのではないかと考えた。本研究では脳梗塞モデルを用いて perlecan が BBB の再構築に与える影響および機序を解明し、さらには治療応用の可能性について検討した。

【方 法】

Perlecan knockout (conventional) マウスは軟骨形成不全により胎生致死となるが、軟骨特異的に *Perlecan* transgene を発現させた lethality rescue *Perlecan* KO-TG (以下 *Perlecan* KO) マウスでは、軟骨を除く各臓器における perlecan の機能解析が可能である⁵⁾。本研究では *Perlecan* KO マウスに対して一過性中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルを用いて BBB の組織修復過程を解析した。また、perlecan C 末端側の domain V (DV) は血管に対する生理活性が高いことが報告されており⁶⁾、その recombinant 蛋白を精製し、ペリサイトに及ぼす影響について検討した。

【結 果】

Perlecan は脳において、脳血管内皮細胞に発現し、内皮・ペリサイト間の基底膜に存在していた。*Perlecan* KO マウスでは梗塞サイズおよび BBB 破綻の程度が有意に増悪した。コントロールマウスでは梗塞巣を中心としてペリサイトマーカー CD13、PDGFR β 、desmin、NG2 などが上昇したのに対し、*Perlecan* KO マウスではこれらが抑制されていた。機序として、ペリサイトに多く発現する integrin $\alpha 5 \beta 1$ の関与を考慮し、野生型マウスで検討したところ、梗塞巣内部・周辺における perlecan および integrin $\alpha 5$ の発現が増加していたことから、integrin $\alpha 5$ を介したペリサイト動員の可能性が考えられた。そこで、perlecan DV を作成し、ペリサイトにおける増殖・遊走能に及ぼす影響について検討した。培養脳血管ペリサイトは perlecan DV に対する接着能を示し、integrin $\alpha 5$ または $\beta 1$ の blocking 抗体によってその接着は抑制された。Perlecan DV によって PDGF-BB による PDGFR β 、SHP-2、FAK のリン酸化が増強し、integrin $\alpha 5$ の抑制によって PDGF-BB による SHP-2/FAK のリン酸化が抑制された。Perlecan DV はペリサイトの増殖能に影響を及ぼさなかったが、アクチン線維および focal adhesion を増加させ、遊走能を促進した。最後に、脳梗塞後に perlecan DV を投与したところ、梗塞巣内部・周辺に分布し、梗塞巣周辺で

のペリサイト増加をさらに促し、梗塞サイズが縮小する傾向がみられた。

【考 察】

Perlecan は、内皮・ペリサイト間に存在し、脳梗塞後の BBB 破綻に対して保護的な役割を担っていると考えられる。とくに、perlecan DV は PDGFR β および integrin $\alpha 5 \beta 1$ の協調作用によって脳血管ペリサイトの遊走を促進し、脳梗塞後の BBB 修復に寄与している可能性が考えられた⁷⁾。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

脳血管障害は超急性期以降、神経症状を改善させうる有効な治療法は、リハビリを除いて皆無であるのが現状である。Perlecan DV は脳梗塞亜急性期に BBB の修復を促しうる新規脳梗塞治療薬として期待される。臨床研究につなげるには量・時期・剤型など投与方法の詳細や、integrin 経路を特異的に活性化させるペプチドの開発など、今後更なる検討が必要である。

【参考・引用文献】

1. 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.
2. 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.
3. Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, Tachibana M, Yoshikawa Y, Makihara N, Wakisaka Y, Kuroda J, Kamouchi M, Ooboshi H, Kitazono T, Ago T. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR β in pericytes after ischemic stroke. *Brain Res*. 2016;1630:98-108.
4. 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*. 2017;48(8):2222-2230.
5. Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet*. 199;23(3):354-8.
6. Lee B, Clarke D, Al Ahmad A, Kahle M, Parham C, Auckland L, Shaw C, Fidanboyly M, Orr AW, Ogunshola O, Fertala A, Thomas SA, Bix GJ. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3005-23.
7. Nakamura K, Ikeuchi T, Nara K, Rhodes CS, Zhang P, Chiba Y, Kazuno S, Miura Y, Ago T, Arikawa-Hirasawa E, Mukouyama YS, Yamada Y. Perlecan regulates pericyte dynamics in the maintenance and repair of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. 2019;218(10):3506-3525.