

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15035

研究課題名(和文)脳卒中後再生モデルにおけるneurovascular unit再構築機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of neurovascular unit remodeling in repair model after stroke

研究代表者

西中 崇(Nishinaka, Takashi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50786184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中自然発症モデル動物において、再生誘導因子の候補としてdamage-associated molecular pattern(DAMP)の1つであるhigh mobility group box1(HMGB1)に着目し、HMGB1の変化や血管新生に対する関与を検討した。脳卒中発症に伴い脳病変部や血漿中HMGB1量の低下を認めた。HMGB1供給源の一つである血小板は脳卒中発症3週間前から容積の増大をきたすことを見出した。リンパ球数の減少も同様の時期から認められた。HMGB1自体には血管新生促進作用が認められなかったが、HMGB1と共通の受容体に作用する終末糖化産物は血管新生を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中発症に至る過程におけるHMGB1の挙動に関する知見を得た。脳卒中を自然発症するモデル動物の特性を生かし、HMGB1の供給源として検討を進めた血球系の解析において、脳卒中発症前の変動をとらえることができた。血小板の大型化とリンパ球の低下は脳卒中の発症を事前に予測するために有用な特徴であり、バイオマーカーとして利用できる可能性がある。これらのパラメーターは簡便でかつ低コストで測定可能であるため、今後、臨床研究への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP), we investigated the change of HMGB1, representative DAMPs and regenerative mediator, and the involvement of HMGB1 on angiogenesis. The decreased HMGB1 levels was observed in infarct area and serum after development of stroke. The increased volume of platelet, which one of source for HMGB1, were observed at 3 weeks before development of stroke. In addition, the decreased lymphocytes count was observed at 3 weeks before development of stroke. Although HMGB1 has no pro-angiogenic activity, advanced glycation end products, which activate same receptors with HMGB1, facilitated angiogenesis.

研究分野：血管、再生

キーワード：脳卒中 neurovascular unit 血管内皮細胞 マクロファージ 終末糖化産物 血管新生 HMGB1 血小板

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中に対するリスク因子の管理、血栓溶解療法や血管内治療が進み、発症率や5年生存率は改善した。しかし、急性期治療が十分に行われず、後遺症によりQOLが損なわれた患者数も依然として多い。急性期治療を充実して、機能回復を目的とする治療法の開発が強く望まれる。

脳組織再生治療法開発には、神経・グリア・血管系から構成されるneurovascular unit(NVU)による異なる細胞間の相互作用のメカニズムを理解し、機能的ネットワーク障害に対してNVUを進展させることによる包括的なネットワーク再構築誘導法の発見の必要があると提唱されている。血管内皮細胞は、軸索伸長の足場となり、さらに伸長を促すメディエーターを遊離する。よって、脳障害部位における血管内皮細胞新生が脳組織再生の目的となる。

Damage-associated molecular pattern (DAMP)は近年注目される免疫調節因子であり、DAMPsに含まれるHMGB1は条件に応じて脳組織障害と再生を促進する因子である。HMGB1による血管内皮細胞新生に対する効果は明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、HMGB1による脳卒中後の血管内皮細胞の新生機序を明らかにし、脳卒中後の機能回復に向けた新規治療薬開発のための基礎的研究を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳卒中動物モデル

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(stroke-prone spontaneously hypertensive rat、SHRSP)を使用した。体重・血圧の変化を経時的に測定し、脳卒中に起因する神経症状(過敏、四肢の持ち上げ行動、けいれん、片麻痺)の出現を観察した。

#### (3) 血管透過性の評価

エバンスブルー(2%、3.0 mL/kg)を尾静脈から投与し、1時間後に深麻酔下にて灌流を行い、脳を摘出した。取り出した脳は、ブレインスライサーを使用して2 mm厚の切片を作製した。

#### (4) 血球系の解析

SHRSPの尾静脈から採血を行い、自動血球解析装置((XT-1800i、シスメックス)を用いて各血球パラメーターを測定した。

#### (5) 組織染色

SHRSPから凍結切片を作製し、各種抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

#### (6) 血漿中HMGB1の定量

SHRSPの下大動脈からEDTA入りシリンジにて採血を行い、得られた血液を遠心して血漿を得た。HMGB1測定試薬(シノテスト)を用いてHMGB1量を測定した。

#### (7) 血管新生 in vitro モデル

マイクロプレート上のマトリゲルにマウス由来血管内皮細胞株 b.End5 を播種することによる細胞培養系血管新生モデルを使用した。管腔形成の形態は、Calcein AMと反応させることで蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡で解析した。

#### (8) 終末糖化産物(AGEs)の細胞内取り込みと受容体発現の解析

マウス単球由来マクロファージ様細胞のRAW264.7細胞を24 well プレートに播種した後、蛍光標識AGEsを処置した。細胞内に取り込まれたAGEsならびにAGEs受容体の一つであるスカベンジャー受容体(SR-A)の発現をFlow cytometry法(FACS Cantoll、BD Biosciences)で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) SHRSPにおけるHMGB1の挙動

脳卒中自然発症モデル動物(SHRSP)において、脳卒中発症による異常行動の発現と一致して、血液脳関門の破綻、すなわち、NVUの障害を確認した(図1)。脳卒中発症後、異常行動が自然消失したSHRSPでは血液脳関門の破綻も回復しており、脳病変は軽度であった。脳障害領域においてマクロファージのマーカーであるCD68陽性ならびにCD163陽性細胞の浸潤が認められた。一方、脳障害領域ではHMGB1陽性細胞が低下しており、血漿中HMGB1量の低下も認められた(図2)。

図1  
脳卒中発症後の  
血管透過性の亢進

発症前



発症後  
(神経症状発現)  
色素の漏出が  
認められる

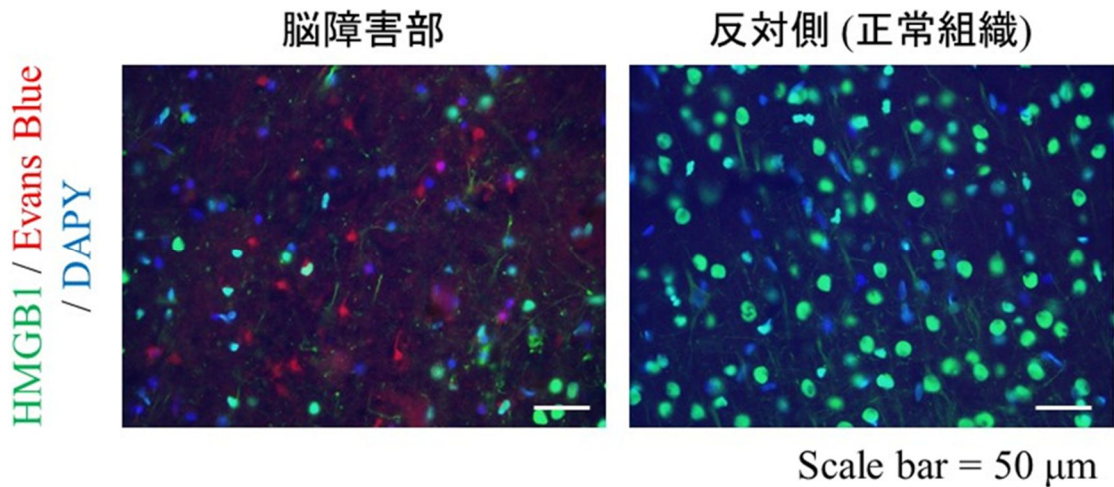


図2 脳障害部における血管透過性の亢進と HMGB1 陽性細胞の低下

(2) SHRSP における脳卒中発症と血球系の連関

血小板は HMGB1 の供給源として報告されている。そこで、SHRSP の発症前から発症後にわたり各血球系の変動について解析を行った。血小板関連のパラメーターに関して、脳卒中発症の3週間前から血小板容積の増加が認められ、脳卒中発症直前から血小板数が低下していた(図3 上段)。同様に、リンパ球の減少も脳卒中発症の3週間前に認められた(図3 下段)。一方、赤血球関連パラメーターは脳卒中発症に関する変化は認められなかった。

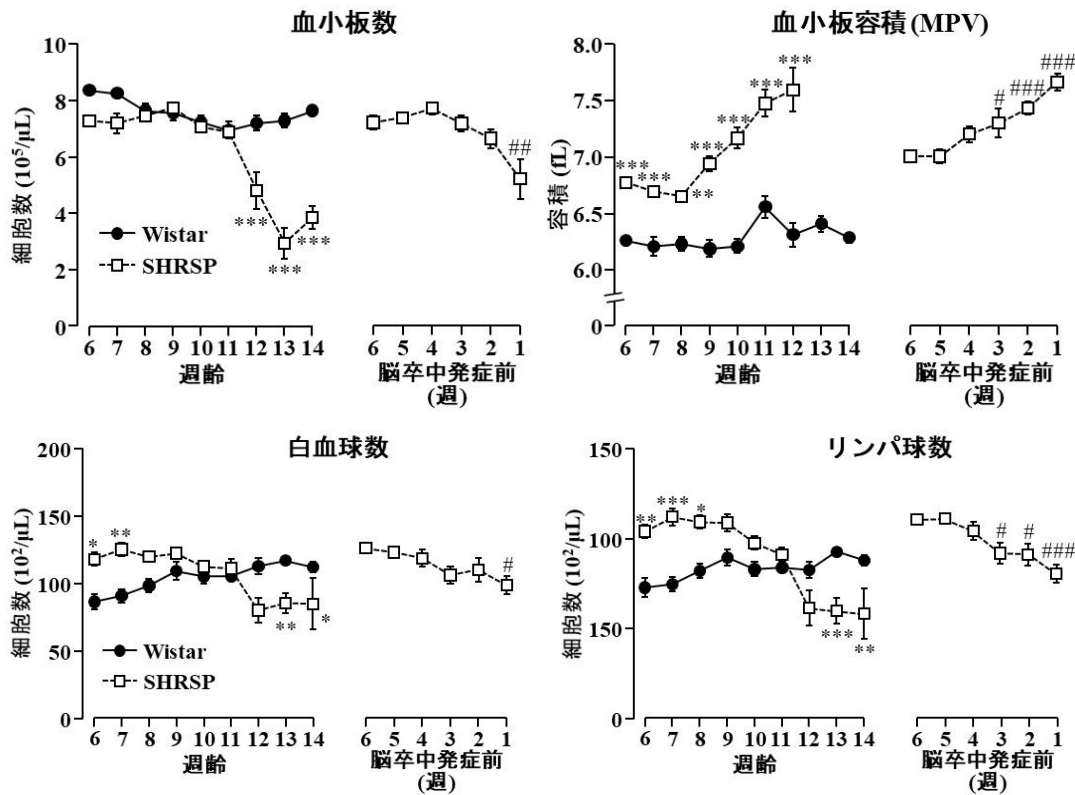


図3 SHRSP における脳卒中発症前の血小板並びに白血球関連パラメーターの変動

SHRSP は成長とともに内皮細胞の機能低下などヒトの臨床像を模倣するようになり、高血圧症を呈し、脳卒中を自然発症する動物モデルである。患者を対象にした臨床研究において、脳卒中発症後では血小板容積が増加していることが報告されている。今回の結果は、脳卒中を発症する以前から血小板容積の増加とリンパ球の減少が誘導されていることを示唆する(図4)。したがって、血小板の大型化とリンパ球の低下は脳卒中の発症を事前に予測するために有用な特徴であり、バイオマーカーとして利用できる可能性がある。今後、血小板容積・リンパ球数の変動と脳卒中発症の相関を明らかにする臨床研究が望まれる。

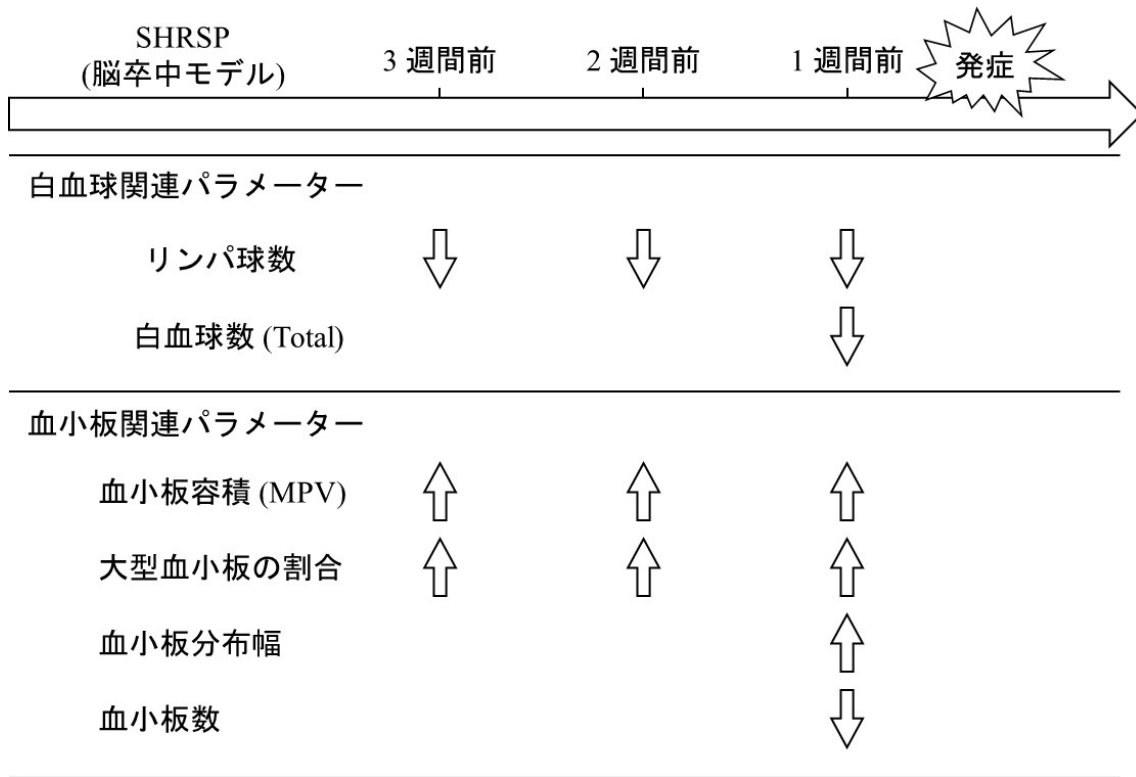


図4 SHRSPにおける血球パラメーターの変動と脳卒中発症の関係

(3) 血管内皮細胞新生の促進因子

in vitro 実験系において、HMGB1 単独処置では血管新生に影響しなかった。HMGB1 の対照実験として共通の受容体に作用する終末糖化産物(advance glycation end products、AGEs)を検討したところ、血管新生の促進作用が認められた。さらに、AGEs の細胞内取り込みと取り込みに関与するスカベンジャー受容体の受容体発現変化を指標にして、AGEs の作用を抑制する硫酸化多糖類の比較検討を行い、海藻由来 Fucoidan の AGEs 抑制作用を確認した。以上の成果は、今後、生体内における AGEs の血管新生に対する影響を解析していくうえで有用な知見である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kitaura Atsuhiko, Nishinaka Takashi, Hamasaki Shinichi, Hatipoglu Omer Faruk, Wake Hidenori, Nishibori Masahiro, Mori Shuji, Nakao Shinichi, Takahashi Hideo	4. 巻 16
2. 論文標題 Advanced glycation end-products reduce lipopolysaccharide uptake by macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0245957 ~ 0245957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishinaka Takashi, Yamazaki Yui, Niwa Atsuko, Wake Hidenori, Mori Shuji, Yoshino Tadashi, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 25
2. 論文標題 Alterations of lymphocyte count and platelet volume precede cerebrovascular lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomarkers	6. 最初と最後の頁 305 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1354750X.2020.1750703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishinaka T, Mori S, Yamazaki Y, Niwa A, Wake H, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H.	4. 巻 17
2. 論文標題 A comparative study of sulphated polysaccharide effects on advanced glycation end-product uptake and scavenger receptor class A level in macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diab Vasc Dis Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1479164119896975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hamasaki Shinichi, Kobori Takuro, Yamazaki Yui, Kitaura Atsuhiko, Niwa Atsuko, Nishinaka Takashi, Nishibori Masahiro, Mori Shuji, Nakao Shinichi, Takahashi Hideo	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of scavenger receptors-1 class A stimulation on macrophage morphology and highly modified advanced glycation end product-protein phagocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5901-5901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24325-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobori Takuro, Hamasaki Shinichi, Kitaura Atsuhiko, Yamazaki Yui, Nishinaka Takashi, Niwa Atsuko, Nakao Shinichi, Wake Hidenori, Mori Shuji, Yoshino Tadashi, Nishibori Masahiro, Takahashi Hideo	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-18 Amplifies Macrophage Polarization and Morphological Alteration, Leading to Excessive Angiogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 334-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山崎由衣、西中崇、丹羽淳子、森秀治、和氣秀徳、劉克約、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 Advanced glycation end productsによる血管新生促進機序に対するエンドサイトーシスの関与
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Nishinaka, Yui Yamazaki, Atsuko Niwa, Hidenori Wake, Shuji Mori, Tadashi Yoshino, Masahiro Nishibori, Hideo Takahashi
2. 発表標題 Enhanced M2 polarization of macrophage and angiogenesis by interleukin-18
3. 学会等名 第9回国際DAMPsとAlarminsシンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西中崇、山崎由衣、丹羽淳子、和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 Advanced glycation end products の細胞内取り込みによる血管新生の調節機構
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西中崇、丹羽淳子、和氣秀徳、森秀治、西堀正洋、高橋英夫
2. 発表標題 脳卒中易発症性高血圧ラットにおいてリンパ球数と血小板容積の変動は脳卒中症状の発現よりも先行する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Nishinaka, Takuro Kobori, Yui Yamazaki, Shinichi Hamasaki, Atsuhiko Kitaura, Atsuko Niwa, Shuji Mori, Masahiro Nishibori, Hideo Takahashi
2. 発表標題 Screening of sulfated polysaccharide and sugar-related compounds as the regulator of advanced glycation end-products uptake by macrophage.
3. 学会等名 WCP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 75.西中 崇, 山崎 由衣, 丹羽 淳子, 森 秀治, 和氣 秀徳, 西堀 正洋, 高橋 英夫
2. 発表標題 マクロファージによる終末糖化産物の取り込みに対する硫酸化多糖類の影響
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 77.西中 崇, 山崎 由衣, 丹羽 淳子, 森 秀治, 和氣 秀徳, 西堀 正洋, 高橋 英夫
2. 発表標題 マクロファージにおけるscavenger receptors-1 class A を介した終末糖化産物の取り込み
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西中 崇, ハテポールオメルファルク, 和氣 秀徳, 森 秀治, 西堀 正洋, 高橋 英夫
2. 発表標題 脳卒中易発症性高血圧ラットにおいて血小板容積とリンパ球数の変化は脳卒中発症を予測するバイオマーカーである
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Omer Faruk Hatipoglu, Ikemura Kentaro, Ohtsuki Takashi, Inagaki Junko, Nishinaka Takashi, Takahashi Hideo, Hirohata Satoshi
2. 発表標題 Molecule X siRNA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Nishinaka, Omer Faruk Hatipoglu, Hidenori Wake, Shuji Mori, Masahiro Nishibori, Hideo Takahashi
2. 発表標題 Relationship between AGE scavenging and angiogenesis in endothelial cell
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>近畿大学医学部薬理学教室  <a href="https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/">https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/</a>          薬理学教室   近畿大学医学部・大学院医学研究科  <a href="https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/">https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/</a>          近畿大学医学部薬理学教室  <a href="https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/">https://www.med.kindai.ac.jp/pharma/</a>          薬理学教室   近畿大学医学部・大学院医学研究科  <a href="https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/">https://www.med.kindai.ac.jp/laboratory/pharmacology/</a></p>
---



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------