

炎症惹起シグナル IL-33/ST2 による脳梗塞内ペリサイト動員と組織修復の分子機構

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】

2005 年以降、脳梗塞超急性期の再灌流療法(rt-PA 静注/血管内カテーテル血栓除去)が確立し神経保護療法は概ね達成された。しかしながら治療適応時間による制限もあり、その恩恵を受けることができるのは全脳梗塞患者の 10%に満たない。現状、脳梗塞急性期の薬物治療は再発予防に限定され、機能回復促進治療はリハビリテーション療法に依存している。高齢化社会の到来により脳梗塞患者は今後も増加することが予想され、機能回復促進に対する薬物治療の開発が強く望まれている。近年、間葉系幹細胞などを用いた再生医療の有効性が報告されているが普及には至らず、機能回復を誘導する機序も完全には解明されていない。

脳梗塞発生後の機能回復は概ね 1-3 ヶ月の間に生じる。脳梗塞周囲領域における神経ネットワークの再構築が一定の役割を担うと考えられる¹⁾。我々を含む国内外の研究成果により「梗塞内壊死物(デブリス)の除去」が脳梗塞周囲の神経ネットワーク再構築・アストロサイト活性化・オリゴデンドロサイト新生(=再髄鞘化)などの機構を介して機能回復に寄与することが明らかとなってきた^{2,3)}。脳梗塞内部では内皮細胞に比し、その周囲に局在するペリサイトが細胞死を生じやすいため⁴⁾、脳梗塞発生後は内皮細胞の新生とともに内皮細胞周囲へのペリサイト再動員が、脳梗塞内部の血流再開、マクロファージ動員によるデブリス除去に不可欠となる⁵⁾。実際、ペリサイト機能不全マウスではマクロファージの局所動員が抑制されることにより²⁾、また、マクロファージ機能不全マウスではデブリス除去不全により⁶⁾、脳梗塞後の機能回復が有意に抑制される。脳梗塞後機能回復においてはペリサイト-マクロファージの協同作業による組織修復が重要な役割を果たしており、その最初のステップとなる内皮細胞周囲へのペリサイト動員は極めて重要な生体応答と考えられる。

【目 的】

脳梗塞発生後、その周囲領域に血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell, EPC)として知られる CD34 陽性細胞が集簇し、内皮のみならずペリサイトへ分化する可能性を我々は見出している。加えて、この CD34 陽性細胞が組織障害により放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs)の一つである Interleukin-33 (IL-33)の受容体 ST2 を発現していることを見出した。脳梗塞局所で産生される炎症惹起物質 IL-33 が CD34 陽性細胞に発現する ST2 を介してペリサイトの発生・動員を誘導している可能性があり、本研究では培養細胞およびマウス脳梗塞モデルを用いてこの可能性を検証する。

【方 法】

1. 脳梗塞モデル

C57BL/6J マウスに Rose Bengal 色素(20 mg/kg)を静注後、561nm 波長のレーザー光を中大脳動脈遠位部に照射して永久閉塞させ灌流域に脳梗塞を作製する(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)。脳梗塞作製 3・7・14・28 日後に、脳断片を取り出し免疫組織染色による評価を行う。内皮細胞を CD31、ペリサイトを PDGFR β もしくは CD13、浸潤マクロファージを F4/80 もしくは IBA1、血管内皮前駆細胞を CD34 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行う。

2. FACS による解析

脳梗塞を作製したマウスから脳を摘出してホモジネートを作製し、パーコール遠心により血球系細胞を除いた後、FACS サンプルとして用い検討を行う。

3. 培養細胞実験

FACS を用いて脳および骨髄より CD34 陽性細胞を回収し、内皮細胞およびペリサイトへの分化能、IL-33 に対する細胞応答について検討する。

【結 果】

1. マウス pMCAO モデルにおいて脳梗塞周囲領域に CD34 陽性細胞が集簇する

pMCAO によりマウスに脳梗塞を作製すると、脳梗塞後 7 日目前後より脳梗塞周囲領域に CD34 陽性細胞が集簇することを免疫組織染色により同定した。CD34 陽性細胞は PDGFR β を発現しながら梗塞内へ浸潤することが免疫組織染色により観察された。脳梗塞を生じさせた脳ホモジネートから FACS により CD34 陽性細胞を回収すると、梗塞半球における CD34 陽性細胞は経時的に増加していた。その一方で、健常マウスにおいても CD34 陽性細胞が脳に局在していることが明らかとなった。

2. 脳に局在する CD34 陽性細胞は ST2 を発現する

FACS により回収した脳局在 CD34 陽性細胞の遺伝子発現を調べると、PDGFR β に加えて ST2 を発現していた。また、脳梗塞マウスの免疫組織染色においても、梗塞周囲に局在する CD34 陽性細胞は PDGFR β および ST2 を発現していた。

3. 脳に局在する CD34 陽性細胞はペリサイトへの分化能を有する

FACS を用いて脳および骨髄から回収した CD34 陽性細胞の培養を行った。脳由来 CD34 陽性細胞を、内皮細胞分化培地で培養すると CD31 陽性内皮細胞へ、また、ペリサイト分化培地で培養すると Notch3 や Fibronectin の発現を伴いながら PDGFR β 陽性ペリサイトに分化した。CD34 陽性細胞は内皮細胞もしくはペリサイトへの分化に際して CD34 の発現が著明に低下していた。また、分化ペリサイトでは ST2 の発現を認めなかった。他方、骨髄由来 CD34 陽性細胞は同一の培養条件下においても、内皮細胞およびペリサイトに分化しなかった。

4. 脳梗塞巣内部における IL33 の発現

脳梗塞半球の免疫組織染色およびホモジネートを用いた RT-PCR により、脳梗塞局所において IL33 が発現していることを確認した。脳梗塞内部に局在する細胞のうち、内皮細胞、ペリサイト、マクロファージが IL33 を発現していた。

5. IL33 に対する CD34 陽性細胞の応答

CD34 陽性細胞に IL33 を投与すると速やかに NF κ B が活性化され、PDGFR β の発現増加が観察された。他方、ST2 を発現しないペリサイトは IL33 投与に対し、調べた限りの範囲において細胞応答・遺伝子発現変化を認めなかった。

6. 脳梗塞後ペリサイトの分化・発生に CD34 陽性細胞の IL33/ST2 シグナルが寄与するか？

培養細胞を用いた検討や脳梗塞モデルにおける免疫組織染色の成果から、脳梗塞後ペリサイト発生における CD34 陽性細胞 IL33/ST2 シグナリングの寄与が示唆されたが、本シグナリングの意義を確立するため、慶応大学・吉村昭彦教授より ST2 ノックアウトマウスの提供を受け、九州大学におけるクリーニング操作を経て同マウスの飼養を開始した。ST2 ノックアウトマウスに pMCAO を行い、梗塞内ペリサイト発生 (=血管新生)、組織修復および機能回復の是非について検討を行っている。

【考 察】

近年、組織在住 CD34 陽性細胞の組織修復への寄与を示唆する報告が増えている⁷⁾。健常脳においても CD34 陽性細胞が在住し、内皮細胞に加えてペリサイトへの分化能を有していることから、脳の組織傷害に反応して CD34 陽性細胞が血管新生・組織修復に寄与する可能性がある。培養細胞を用いた検討においても、IL-33/ST2 シグナルが CD34 陽性細胞のペリサイト分化に寄与する可能性が示唆されており、ST2 ノックアウトマウスを用いてこれを証明する必要があると考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

脳梗塞発生後の機能回復の分子メカニズムは未だ完全には解明されていない。我々は内皮細胞周囲へのペリサイト動員を契機とする血管新生・血流再開・組織修復が脳梗塞機能回復の鍵を握ると考えている。本研究を始めとする脳梗塞発生後のペリサイト発生・動員機構の解明は、脳梗塞機能回復治療の薬物開発に貢献するものと期待している。

【参考・引用文献】

1. Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol* 2006; 59(5):735-42.
2. Shibahara T, Ago T, Nakamura K, Tachibana M, Yoshikawa Y, Komori M, Yamanaka K, Wakisaka Y, Kitazono T. Pericyte-Mediated Tissue Repair through PDGFRbeta Promotes Peri-Infarct Astrogliosis, Oligodendrogenesis, and Functional Recovery after Acute Ischemic Stroke. *eNeuro* 2020; 7(2):ENEURO.0474-19.2020.
3. Ting SM, Zhao X, Sun G, Obertas L, Ricote M, Aronowski J. Brain Cleanup as a Potential Target for Poststroke Recovery: The Role of RXR (Retinoic X Receptor) in Phagocytes. *Stroke* 2020; 51(3):958-66.
4. Tachibana M, Ago T, Wakisaka Y, Kuroda J, Shijo M, Yoshikawa Y, Komori M, Nishimura A, Makihara N, Nakamura K, et al. Early Reperfusion After Brain Ischemia Has Beneficial Effects Beyond Rescuing Neurons. *Stroke* 2017; 48(8):2222-30.
5. Shibahara T, Ago T, Tachibana M, Nakamura K, Yamanaka K, Kuroda J, Wakisaka Y, Kitazono T. Reciprocal Interaction Between Pericytes and Macrophage in Poststroke Tissue Repair and Functional Recovery. *Stroke* 2020; 51(10):3095-106.
6. Hidaka M, Nakamura K, Yoshino F, Takashima M, Kiyohara T, Wakisaka Y, Kitazono T, Ago T. Macrophage infiltration is required for pericyte recruitment in poststroke tissue repair. *Neuroscience 2023 in Washington, D.C.*
7. Jiang L, Chen T, Sun S, Wang R, Deng J, Lyu L, Wu H, Yang M, Pu X, Du L, et al. Nonbone Marrow CD34(+) Cells Are Crucial for Endothelial Repair of Injured Artery. *Circ Res* 2021; 129(8):e146-e65.