

## 神経発生期の血管発生に關与するペリサイトのリクルートメント

山本 誠士<sup>1,7</sup> 村松 昌<sup>2</sup> 東 英梨月<sup>1,3</sup> 堂本 光子<sup>3</sup> 大澤 毅<sup>2</sup> 高橋 宏行<sup>4</sup>  
高野 健一<sup>1</sup> 浦壁 聡美<sup>1</sup> 新飯田俊平<sup>5</sup> 澁谷 正史<sup>2</sup> 松田 直之<sup>6</sup> 服部 裕一<sup>1</sup>

**要 旨：**近年、脳微小血管に付着するペリサイトが血流を制御することが報告され、その生理学的重要性が示された。しかし、発生期のペリサイトリクルートメントの詳細な検討はなされていない。我々は、脳血管発生を詳細に観察した結果、血球系マーカー陽性細胞がリクルートされることを見出し、これらがペリサイトに分化することを明らかにした。これより、発生期におけるペリサイトの一部の起源は、血球系由来であることが強く示唆された。(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 197-201)

**Key words:** pericyte, angiogenesis, brain blood vessel

### 序 言

動脈と静脈の間に存在する血管網である毛細血管は、血管内皮細胞の周囲をペリサイトが被覆し、さらに基底膜に覆われた構造を有する<sup>1,2</sup>。毛細血管に存在するペリサイトは、血管増殖の調整作用を有するとされる。糖尿病性網膜症や未熟児網膜症では、網膜血管のペリサイトが欠損し、その部分の血管内皮細胞が病的血管新生をおこすことが知られている<sup>3,4</sup>。一般的に、ペリサイトは血管周囲の結合組織に存在する未熟な間葉系細胞から発生するとされる<sup>5</sup>。また、脳血管は他の組織の血管とは異なり、血液脳関門を有することが知られている。血液脳関門の形成にはグリア細胞が重要であるとされるが、ペリサイトもまた血管内皮細胞のタイトジャンクション形成を促すとされ、微小血管の血流量や血管透過性の制御も行っている<sup>2,5-8</sup>。また、血液脳関門や血液網膜関門などに代表される微小血管のバリア形成において、ペリサイト

数と血管のカバー率が重要であるとの見解もある<sup>5</sup>。しかしながら、中枢神経系の発生過程におけるペリサイトのリクルートや脳血管への定着過程の詳細は未だ明らかにされていない。

### 対象と方法

#### (1) マウス胎仔脳の whole mount 免疫組織化学

E10.5 マウス胎仔脳を固定後、一次抗体として抗 CD31 抗体(BD Pharmingen)、抗 F4/80 抗体(Serotec)、抗 Collagen type IV 抗体(Chemicon)、抗 NG2 抗体(Chemicon)および抗 CD45 抗体(BD Pharmingen)を使用した。次に、一次抗体の動物種に対する蛍光色素結合二次抗体を反応させた。核の染色には Hoechst(Nacalai)または To-Pro-3(Molecular probes)を用いた。

#### (2) GFP-CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞の flow cytometry によるソーティング

GFP-E10.5 の胎仔より細胞を調整し、APC-抗 CD31 抗体(BD Pharmingen)、PE-抗 F4/80 抗体(Serotec)を 20 分反応させた後、flow cytometry で CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞画分を得た。

<sup>1</sup>富山大学大学院分子医薬理学講座

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院分子腫瘍医学

<sup>3</sup>金沢工業大学ゲノム生物学研究所

<sup>4</sup>東京大学保健・健康推進本部

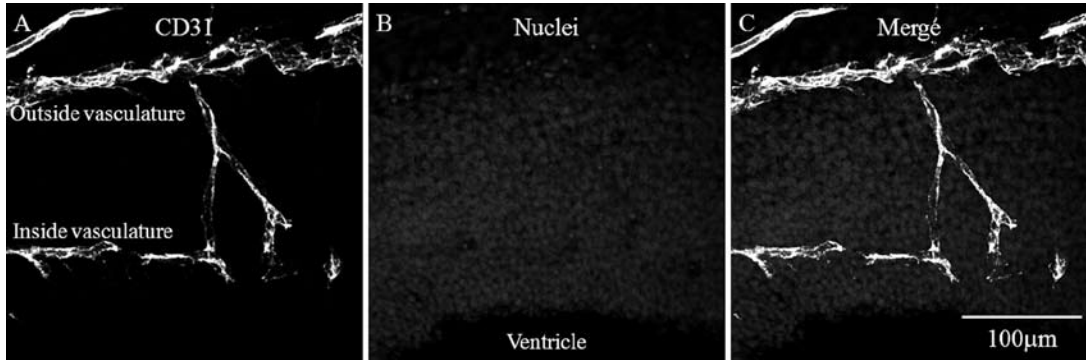
<sup>5</sup>国立長寿医療センター研究所遺伝子蛋白質解析室

<sup>6</sup>京都大学医学部初期診療・救急医学

(現 名古屋大学大学院救急・集中治療医学分野)

<sup>7</sup>公益信託石津俊記念奨学基金

2009年10月1日受付 2009年11月24日受理



**Figure 1** Confocal images of the midbrain sagittal sections.

A: CD31 positive cerebral blood vessels.

B: The dye, To-pro-3, indicates nuclei of the neuroepithelium.

C: A merged image of A and B. Brain surface vascular networks are termed outside vasculature. Outside vasculature forms secondary vascular networks, termed inside vasculature, in the deep part of the neuroepithelium.

### (3) Matrigel in vivo assay

GFP マウス胎仔から flow cytometry により CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞画分を得、matrigel に混和した後に、4 週齢のマウスに 500 µl 皮下注射した。2 週間後、matrigel plug を取り出し、免疫染色を行った。一次抗体として抗 CD31 抗体 (Chemicon) を使用した。次に、一次抗体の動物種に対する蛍光色素結合二次抗体を反応させた。

## 結 果

### (1) E10.5 の vascular ridge に局在する CD31 陽性細胞の由来の検討

中枢神経系の血管発生は、E9.5 から E12.5 にかけて脳の血管形成が劇的に進行する。脳表面の血管網(outside vasculature)から血管が発芽し、神経上皮へ垂直に進入し、脳のある領域に達したときに血管が分岐を開始し、神経上皮内部の血管網(inside vasculature)を形成する(Fig. 1A~C)。E10.5 の inside vasculature を詳細に観察した結果、vascular ridge において、CD31 陽性細胞が観察された(Fig. 2A, arrowheads)。それらの細胞の一部は血管に結合しており、すべての細胞は血管の細胞外マトリックスである Collagen type IV に陰性であった。

E10.5 の vascular ridge に存在する CD31 陽性細胞は、形態が一定ではなく大きさにもばらつきがみられたため(Fig. 2A)、macrophage 系の細胞であることが疑われた。Macrophage マーカーである F4/80 で染色を試みたところ、CD31 陽性細胞は F4/80 にも陽性であり、貪食細胞様の形態を示す macrophage 系の細胞群であることが明らかと

なった(Fig. 2B)。

CD31 陽性細胞の一部は、血管に付着していることが観察されたことから、ペリサイトの前駆細胞ではないかと考えられた。ペリサイトマーカーである NG2 に対する抗体を用い E10.5 の中脳を whole mount 染色し観察したところ、中脳背側部の avascular area に多くの CD31 陽性細胞が観察され、それらの一部は NG2 にも陽性であった(Fig. 2C)。さらに、汎血球系マーカーの CD45 に対する抗体を用いて免疫染色を行った結果、CD31 陽性細胞は CD45 をも発現していることが明らかとなった(Fig. 2C)。

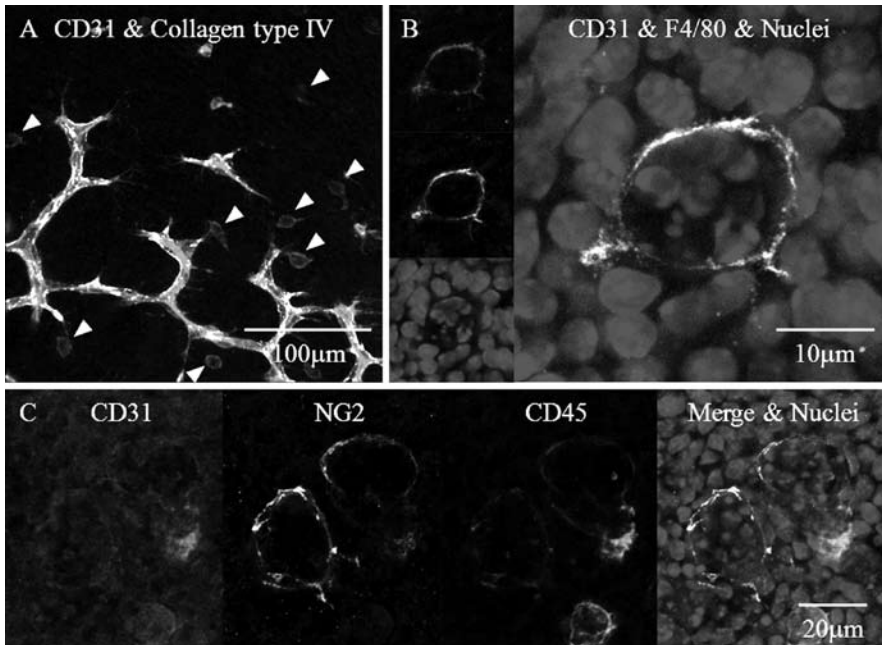
### (2) CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞画分の matrigel in vivo assay

CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞が新生血管に付着し、ペリサイトに分化するかを確認するために、GFP-E10.5 胎仔の頭部より flow cytometry にて CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞画分を得(Fig. 3A)、マウスの皮下に注入した。Matrigel in vivo assay 開始から 14 日目の matrigel には多くの新生血管が侵入していた。GFP の発現を指標に CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> 細胞の動態のトレースが可能であるが、matrigel 中の新生血管には GFP 陽性細胞が付着していることが明らかとなった(Fig. 3B, arrowheads)。また、GFP 陽性細胞は Desmin 陽性のペリサイトであることが確認された(Fig. 3C)。

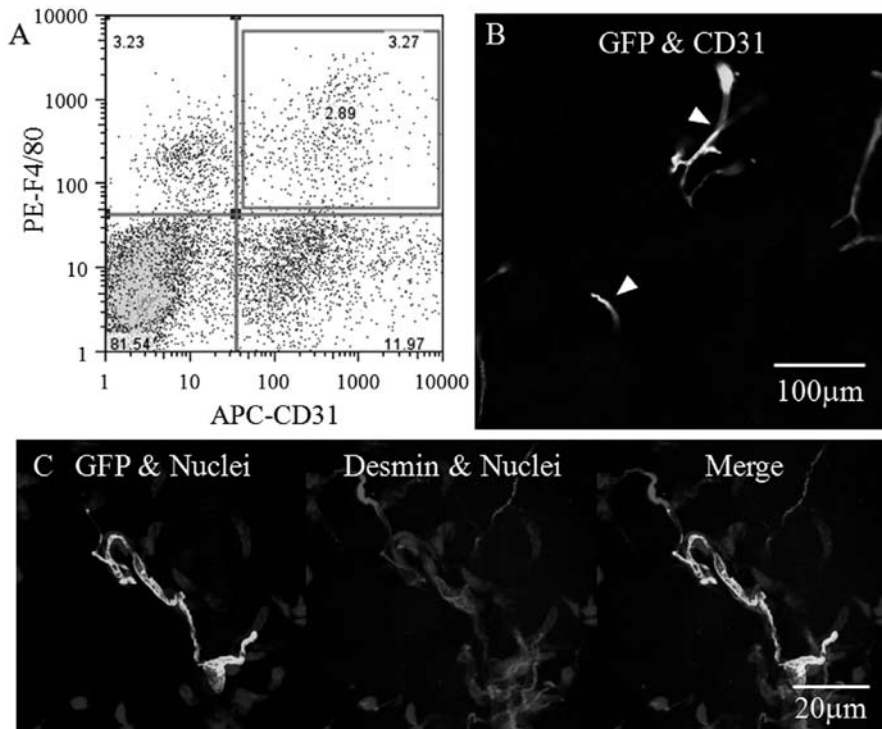
## 考 察

### (1) 血管新生における macrophage 系マーカー陽性細胞の関与

近年、血管新生またはリンパ管新生における macrophage



**Figure 2**  
 CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells infiltrate around the vascular ridge and dorsal mid-line.  
 A: CD31 positive cells infiltrate around the developing vascular ridge at E10.5 mouse brain (arrowheads). Some of them can be adhered to the developing brain microvasculature.  
 B: CD31 positive cells express F4/80, and exhibit the phagocyte-like morphology.  
 C: CD31 positive phagocyte-like cells express NG2, a pericyte marker, and CD45, a pan-marker for blood cells.



**Figure 3** In vivo matrigel plug assay of the GFP-CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells.  
 A: CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells are fractionated from GFP mouse embryos. The cells are mixed into matrigel, then injected into mice.  
 B: GFP positive explanted cells (arrowheads) can be adhered to the newly formed blood vessels.  
 C: GFP positive cells express desmin, a pericyte marker.

(または CD11b などの macrophage 系マーカー陽性細胞)の関与が重要であるとの報告がなされている。Grunewaldらは、tet-on/off 系を用いて組織 Vegf-a の誘導を制御したマウスを作出し、recruited bone marrow-derived circulating cells(RBCCs)のホーミングが血管新生に重要で、RBCCsあるいはRBCCsのconditioned mediumはマウス大動脈片のex vivo培養で血管の発芽促進効果を有することを示した<sup>9)</sup>。RBCCsは単核のmyeloid系細胞とされているが、CD11b陽性細胞である。また、De Palmaらは、遺伝子改変を施し自殺遺伝子を導入した骨髄由来前駆細胞移植モデルにおいて腫瘍移植実験を行った<sup>10)</sup>。腫瘍血管にはTie2-expressing mononuclear(TEM)細胞が相互作用を及ぼし、血管形成をサポートしていることを報告し、そしてTEM細胞を特異的に除去することによって、腫瘍血管形成を抑制し、腫瘍の増大を抑えることに成功した。RBCCs、TEM細胞は、共にmyeloid系の細胞とされ、CD11b陽性細胞である。本研究で見出された、E10.5の脳に存在するCD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞もまたmacrophage系であり(Fig. 2B)、脳血管に付着し、脳血管の成熟に何らかの作用を及ぼしていることが強く示唆される。

### (2)脳におけるペリサイトの起源

本研究で見出されたCD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞は、NG2陽性であり(Fig. 2C)、血管に付着している形態(Fig. 3B)からペリサイトの前駆細胞である可能性が強く示唆される。一般的に、ペリサイトは血管周囲の結合組織に存在する未熟な間葉系細胞から発生するとされる<sup>5)</sup>。また、ニワトリとウズラの異種移植実験において、血管内皮細胞は宿主に、ペリサイトは移植組織に由来することより、内皮細胞とは異なった細胞系に由来することが示唆されている<sup>11)</sup>。しかしながら、ペリサイトの起源、血管への定着、血管に及ぼす生理作用に関する知見は少なく、未だ詳細は明らかではない。本研究で見出されたCD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞が、脳血管のペリサイトの起源であるとするれば、CD31、CD45、F4/80などの血球系マーカーを発現し、貪食細胞様の形態を示すことより、ペリサイトの新しい起源を提唱することとなり、血管発生学的にも細胞生物学的にも非常に興味深い知見である。

### (3)疾病に関連するペリサイトの異常

ペリサイトの異常に関連する多くの疾病が報告されている。糖尿病性網膜症や未熟児網膜症においては、網

膜の血管のペリサイトが欠損し、その部分の血管内皮細胞が病的血管増殖をおこすことが知られている<sup>12-15)</sup>。また、アルツハイマー病への関与や、脳腫瘍の増殖、脳浮腫、高血圧にも関連性がみられると報告されている<sup>12, 15-20)</sup>。CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>細胞の脳血管への関与やその起源が明らかになれば、上記の疾病の治療に新しい道が開ける可能性が期待できるほか、血管再生療法の実現に貢献できる可能性がある。

## 文 献

- Gerhardt H, Betsholtz C: Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 2003, **314**: 15-23.
- Shepro D, Morel NM: Pericyte physiology. *FASEB J*, 1993, **7**: 1031-1038.
- Dodge AB, D'Amore PA: Cell-cell interactions in diabetic angiopathy. *Diabetes Care*, 1992, **15**: 1168-1180.
- Sims DE: Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol*, 1991, **7**: 431-443.
- Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE: Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 2000, **51**: 363-369.
- Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K et al: A pericyte-derived angiotensin-II multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem*, 2004, **89**: 503-513.
- Kim JH, Kim JH, Park JA et al: Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*, 2006, **39**: 339-345.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P et al: Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 2006, **443**: 700-704.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y et al: VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 2006, **124**: 175-189.
- De Palma M, Venneri MA, Roca C et al: Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2003, **9**: 789-795.
- Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM et al: The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, 2001, **128**: 1059-1068.
- Allt G, Lawrenson JG: Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 2001, **169**: 1-11.
- Cogan DG, Kuwabara T: The mural cell in perspective. *Arch Ophthalmol*, 1967, **78**: 133-139.
- Engerman RL, Kern TS: Retinopathy in animal models of

- diabetes. *Diabetes Metab Rev*, 1995, **11**: 109–120.
- 15) Thomas WE: Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev*, 1999, **31**: 42–57.
- 16) Castejon OJ: Submicroscopic changes of cortical capillary pericytes in human perifocal brain edema. *J Submicrosc Cytol*, 1984, **16**: 601–618.
- 17) Herman IM, Jacobson S: In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brains. *Tissue Cell*, 1988, **20**: 1–12.
- 18) Herman IM, Newcomb PM, Coughlin JE et al: Characterization of microvascular cell cultures from normotensive and hypertensive rat brains: pericyte-endothelial cell interactions in vitro. *Tissue Cell*, 1987, **19**: 197–206.
- 19) Verbeek MM, de Waal RM, Schipper JJ et al: Rapid degeneration of cultured human brain pericytes by amyloid beta protein. *J Neurochem*, 1997, **68**: 1135–1141.
- 20) Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ et al: Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995, **54**: 304–310.

## Pericyte Recruitment during the Neurogenesis Period of the Central Nervous System

Seiji Yamamoto,<sup>1,7</sup> Masashi Muramatsu,<sup>2</sup> Erika Azuma,<sup>1,3</sup> Mitsuko Dohmoto,<sup>3</sup> Tsuyoshi Osawa,<sup>2</sup> Hiroyuki Takahashi,<sup>4</sup> Ken-ichi Takano,<sup>1</sup> Satomi Urakabe,<sup>1</sup> Shumpei Niida,<sup>5</sup> Masabumi Shibuya,<sup>2</sup> Naoyuki Matsuda<sup>6</sup> and Yuichi Hattori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular and Medical Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medicine and Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Kanazawa Institute of Technology, Genome Biotechnology Laboratory, Ishikawa, Japan

<sup>4</sup>Division for Health Service Promotion, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Laboratory of Genomics and Proteomics, National Center for Geriatrics and Gerontology, Aichi, Japan

<sup>6</sup>Department of Primary Care & Emergency Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan  
 (Department of Emergency and Critical Care Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan)

<sup>7</sup>Ishitsu Shun Memorial Scholarship

**Key words:** pericyte, angiogenesis, brain blood vessel

**Background & Objective:** Recently it has been found that pericytes play an important role in blood flow regulation at the capillary level in the brain. It is believed that pericytes are originally derived from mesenchymal cells. However, little is known about the recruitment of pericytes to cerebral blood vessels. We examined the development of cerebral blood vessels at the neurogenesis period, with a major emphasis on pericyte recruitment.

**Methods:** In whole mount immunohistochemical analysis, mouse embryo heads were incubated with primary antibodies which were employed as markers of endothelial cells, macrophages and pericytes. In matrigel in vivo assay, GFP-CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells fractionated by flow cytometer were injected into mice. Two weeks later, matrigel plugs were observed using the confocal system.

**Results:** Immunohistochemical analysis showed that CD31<sup>+</sup> cells infiltrated around the vascular ridge at E10.5. Some of CD31<sup>+</sup> cells, which infiltrated into the dorsal mid-line region, merged with F4/80, CD45 and NG2. When GFP-CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells were injected into mice, they were associated with newly formed capillaries. Furthermore, injected GFP-CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells expressed pericyte markers.

**Conclusions:** We demonstrated that CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells which infiltrate into the neuroepithelium at E10.5 can adhere to cerebral capillaries and be identified as NG2<sup>+</sup> pericytes, suggesting that CD31<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells may serve as one of the sources of the cerebrovascular pericytes (J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 197–201)