
原 著

末梢血単核球の、低酸素低糖刺激による 脳組織保護的特性獲得機序の解明

二 宮 格

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：小野寺 理教授)

**Therapeutic Aspects Against Neural Tissue Using Peripheral Mononuclear Cells Preconditioned
by Oxygen-glucose Deprivation**

Itaru NINOMIYA

*Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science/ Course for Molecular and Cellular Medicine/
Molecular Neuroscience and Brain Disease/ Neurology
(Director: Prof. Osamu ONODERA)*

要 旨

近年、細胞療法の研究が盛んに行われているが、その治療メカニズムは多面的と考えられている。著者らのグループは、ミクログリアや末梢血単核球 (PBMC) に軽度の脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖刺激 (OGD) により、これらの細胞が保護的な極性に変化することを見出した。また、OGD 刺激を施した PBMC (OGD-PBMC) を、脳梗塞 7 日後のラットに、頸動脈投与することで、機能予後を著明に回復させることを報告した。しかし、OGD-PBMC が血液脳関門 (BBB) を透過し、脳組織保護的に作用する機序が明確ではなかった。今回 OGD-PBMC の、BBB 透過と脳組織保護作用獲得機序の分子機構について検討した。

ラット末梢血から PBMC を遠心分離し、18 時間 OGD 刺激 (OGD-PBMC)、あるいは 18 時間通常培養 (Normoxic-PBMC) を行った。培養馴化培地または細胞溶解物を用い、ウエスタンブロッティングによる半定量評価にて、保護作用獲得機序を解明するために次の要因について評価した。血管新生、軸索進展を誘導する血管内皮増殖因子 (VEGF)、抗炎症性サイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)、抗炎症性因子を誘導する転写因子 PPAR γ 、炎症性 PBMC の細胞表面マーカーである iNOS、さらに組織保護的 PBMC の細胞表面マーカーである CD206。脳内移行性獲得の評価のため、細胞接着因子である $\alpha 4 \beta 1$ -インテグリン

Reprint requests to: Itaru NINOMIYA
Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科学教室内

二 宮 格

(VLA4)について、PBMCの免疫染色を行った。また、単球化学誘引物質タンパク質-1 (MCP-1)についてウエスタンブロッティングによる半定量評価を行った。

各々の細胞の培養馴化培地のVEGFの分泌は、OGD-PBMCでは認められたのに対し、Normoxic-PBMCでは認められなかった。またTGF- β の分泌は、OGD-PBMCではNormoxic PBMCと比較して、亢進していた ($p = 0.044$)。各々の細胞溶解物では、PPAR γ は、OGD-PBMCで発現が増加していた ($p = 0.001$)。炎症性の単球/マクロファージに対する、抗炎症性の保護的な単球/マクロファージの極性を反映しているCD206/iNOS比は、Normoxic PBMCと比してOGD-PBMCでは6倍に増加していた ($p = 0.023$)。

VLA4陽性PBMC細胞数は、Normoxic PBMCと比し、OGD-PBMCでは増加していた ($p < 0.001$)。また、MCP-1はNormoxic-PBMCに比しOGD-PBMCで分泌が亢進していた ($p = 0.006$)。

以上からOGD-PBMCでは、PPAR γ 上昇により細胞保護的な特性をもつ種々の成長因子、サイトカインの分泌を亢進することを示した。また、OGD-PBMCの脳内への細胞移行の促進は、細胞接着因子VLA-4の発現増加及び走化性因子MCP-1の分泌の亢進を介している可能性が示唆された。

キーワード：脳梗塞、細胞移植療法、末梢血単核球、低酸素低糖刺激、PPAR γ 、VLA-4、MCP-1

緒 言

脳血管障害は本邦の死亡原因の第4位であり、全死亡の7.9%を占める。また、65歳以上の要介護となる原因疾患の15.1%と最多であり¹⁾、重度の後遺症は社会復帰を困難とする。現在、脳梗塞後遺症の機能回復療法として確立されたものは、リハビリテーションのみで、機能回復療法の開発が望まれている。

脳卒中後遺症の機能回復療法として、細胞療法が期待されている。著者らは、この療法としてミクログリアの保護的作用に注目して研究を進め、軽度の脳梗塞類似の刺激、すなわち低酸素低糖刺激 (oxygen-glucose deprivation, OGD) が、ミクログリアを保護的な極性に変えることを報告した³⁾。OGD刺激したミクログリア (OGD-ミクログリア)は、脳梗塞境界部に移行し、血管内皮増殖因子 (VEGF) やトランスフォーミング因子- β (TGF- β) の発現を亢進し、分泌を増加させる。さらにOGD-ミクログリアは、周囲の血管内皮細胞やアストロサイトからもVEGFやTGF β の分泌も亢進させる。これらの作用により、OGD-ミクログリアの投与は、血管新生⁴⁾⁻⁶⁾や

軸索伸長⁷⁾⁸⁾を促し、機能回復に寄与した³⁾。この結果は、脳虚血に対し、細胞療法が有効であることを示した。

しかし、ミクログリアを採取する事は困難であり、同等な可能性を持つ採取可能な細胞の方が臨床応用として適している。このような細胞とし、骨髄由来の細胞が報告されている²⁾。しかし、骨髄穿刺は侵襲性が強く、特に脳梗塞二次予防のため抗凝固薬や抗血小板薬を内服している患者にとっては出血のリスクが懸念される。また、ES細胞を用いた幹細胞療法は、倫理面での問題、iPS細胞を用いた細胞療法は癌化や、細胞の均一性の懸念がある。さらに、他家由来の細胞では、拒絶反応、移植片対宿主病GVHDの危険性もある。以上から安全に採取可能で、自己由来の細胞が望ましい。

著者らは、この候補として、単球・マクロファージに着目した。単球・マクロファージは、ミクログリアに機能が類似し、中枢神経の炎症や脳虚血後の神経にて重要な役割を果たす⁹⁾¹⁰⁾。この事から単球・マクロファージを豊富に含む末梢血の単核球 (PBMC) が用いられている¹²⁾⁻¹⁶⁾。実際、PBMCは脳虚血後にVEGF、塩基性線維芽細胞成長因

子、TGF- β などの組織リモデリング因子の発現が亢進し、組織保護的な性質を持つ^{14) 17) -19)}。また、PBMCは、脳虚血後に血液脳関門 (BBB) を通過する^{9) 14) 20)}。これらの結果から、ミクログリアと同様に、OGD 刺激により PBMC の治療効果が増強すると考え、一過性局所脳虚血モデルラットを作成し、脳梗塞 7 日後の OGD-PBMC 投与により運動感覚機能の改善効果を認めることを報告した¹¹⁾。

しかし、OGD 刺激後の PBMC の組織保護的特性及び脳内移行性の獲得の分子機序が不明であった。今回、OGD 刺激後の PBMC について、OGD-ミクログリアと同様の分子機序があると仮定し、この仮説をラット PBMC を用いて検討した。

材料と方法

本研究は、新潟大学動物実験倫理委員会の承認を受け (# SD00931)、新潟大学動物実験指針および ARRIVE (Animal Research: Reporting *In vivo* Experiments) ガイドラインに従って実施した²¹⁾。

1. 初代細胞培養

体重 290~320g の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。イソフルラン吸入で麻酔を維持し、開胸下に心腔穿刺を行い、末梢血を採取した。Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare, 17-5446-02) を用いて、PBMC を遠心分離した。

2. 低酸素低糖刺激 (OGD)

PBMC を低グルコース培地とともに低酸素チャンバー (Billups-Rothenburg, Del Mar, CA, USA) に入れ、95%N₂ と 5%CO₂ のガスを 1 時間充填し、その後チャンバーを閉鎖して 18 時間培養した。チャンバー内は、数分内に酸素濃度が、1% 未満となり、閉鎖後も 1% 未満に維持される閉鎖系である。

3. ウェスタンブロッティング

培養した細胞から RIPA バッファー (Santa Cruz) を用いて、タンパク質を抽出した。また、OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) および、通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC) の培養馴化培地を採取した。これらに対して 2-メルカプトエタノールを加えて煮沸した。Tris-glycine SDS-PAGE で電気泳動し、その後 PVDF 膜に転写し、5% スキムミルクと 0.1% Tween-20 でブロッキングした。一次抗体でプローブし、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体でプローブした。一次抗体はウサギポリクローナル抗 VEGF 抗体 (Abcam, ab46154, 100 倍希釈)、ヤギポリクローナル抗 CD206 抗体 (R&D, AF2523, 250 倍希釈)、ウサギポリクローナル抗 iNOS 抗体 (Abcam, ab15323, 50 倍希釈)、ウサギポリクローナル抗 MCP-1 抗体 (Abcam, ab7202, 2000 倍希釈)、ウサギポリクローナル抗 PPAR γ 抗体 (Abcam, ab59256, 500 倍希釈)、ウサギポリクローナル抗 TGF- β 抗体 (Torrey Prince Biolabs, TP254, 500 倍希釈)、ラットポリクローナル抗 TNF- α 抗体 (Peprotech, 500-P72, 500 倍希釈) を用いた。シグナルを化学発光 (GE Healthcare) によって検出した。その後 PVDF 膜をストリッピングし、アクチンまたはトランスフェリン抗体でプローブし、デンシトメトリーによって半定量評価を行った。

4. ELISA

OGD 後の PBMC からの VEGF 分泌量を測定するために、PBMC 培養後の馴化培地内の VEGF 濃度を、Rat VEGF Quantikine ELISA Kit (RRV00, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で測定した。

5. 培養細胞免疫染色

ガラスカバースリップ上に播種した細胞を、室温で 5 分間、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。固定後、細胞を 0.3% Triton X-100 で室温 15 分間インキュベートした。次いで、1% ウシ血清アルブミン-PBS で 30 分間ブロッキング

した後、一次抗体を用いて4℃で一晩反応させた。一次抗体はマウスモノクローナル抗VLA-4抗体(Abcam, ab22858, 20倍希釈)を用いた。翌日、PBSで洗浄を行い、蛍光標識された二次抗体(Alexa Fluorを100倍希釈し、室温で1時間反応させ、Vectashield 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)で封入した。共焦点二光子走査顕微鏡(LSM710; カールツァイス, オーバーコッペン, ドイツ)で観察を行った。

各サンプルに対してランダムに10個の視野(200倍)でVLA4陽性細胞をカウントした(N=3×10視野)。

6. 統計分析

すべての統計分析は、IBM SPSS Statisticsバージョン25.0を使用して実行した。定量的データは、平均±標準偏差(SD)として表した。定量的データは、対応のないt検定を行った。定性的データはフィッシャーの正確検定を使用して評価した。すべての検定は、P値<0.05で統計的に有意とした。

結 果

1. OGD刺激によりPBMCからVEGF及びTGF-βの分泌が亢進する

OGD-PBMCからのリモデリング因子の分泌を調べるために、通常培養条件(Normoxic)およびOGD条件でPBMCを培養し、その馴化培地を用いてVEGFおよびTGF-βをウエスタンブロット法で比較した。VEGFはOGD-PBMCで検出されたが、Normoxic-PBMCでは検出できなかった(P=0.029)(図1A)。またTGF-βは、OGD-PBMCではNormoxic-PBMCより3倍高かった(P=0.044)(図1B)。TNF-αには、OGD-PBMCとNormoxic-PBMCの間で差は認めなかった(P=0.19)(図1B)。TNF-αに対するTGF-βの比は、高いほど単球/マクロファージ²⁸⁾及びミクログリア³⁾の極性が保護的になることを意味する。この比率もNormoxic-PBMC

よりもOGD-PBMCのほうが4倍高かった(P=0.044)(図1C)。

2. 低酸素条件より、OGD刺激では、PBMCのVEGFが発現・分泌が亢進する

通常培養条件、低酸素条件、OGD条件の培養方法で、それぞれのPBMCのVEGF分泌量をウエスタンブロット法で比較した。通常培養及び低酸素条件に比して、OGD条件下では、培養馴化培地内のVEGFは有意に高く検出された(各々p<0.008)(p<0.018)(図2A)。細胞溶解液でも、OGD条件下では通常培養と比してVEGFは有意に高く検出された(p<0.019)(図2B)。また、馴化培地内のVEGF濃度は、ELISAにても、通常培養及び低酸素条件に比してOGD条件下では有意に高かった(各々P=0.012, P=0.015)(図2C)。

3. OGD-PBMCは、保護的に極性が変化する

細胞表面マーカーである誘導性一酸化窒素シンターゼ(iNOS, 炎症誘発性マーカー)およびCD206(抗炎症性組織保護的マーカー)に対する抗体を用いて、OGD-PBMCの極性変化の検討を行った。細胞溶解物のウエスタンブロット法では、OGD-PBMCは、Normoxic-PBMCよりもiNOSは少なかった(P=0.01)(図3A)。CD206は両者で有意差を認めなかった(P=0.94)。炎症性の単球/マクロファージに対する、抗炎症性の保護的な単球/マクロファージ²⁸⁾の極性化を反映しているとされる、iNOSに対するCD206発現の比率を検討した。OGD-PBMCのほうがNormoxic-PBMCよりもCD206/iNOS比は6倍高かった(P=0.023)(図3B)。

4. OGD条件下では、PPARγ発現は亢進する

次に、強力な抗炎症作用を発揮し、単球/マクロファージを保護的極性へと分化させる、転写因子、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体-γ(PPARγ)の発現をウエスタンブロット法により細胞溶解物で検討した²⁴⁾。Normoxic-PBMCよりもOGD-PBMCにてPPARγ発現は6倍高

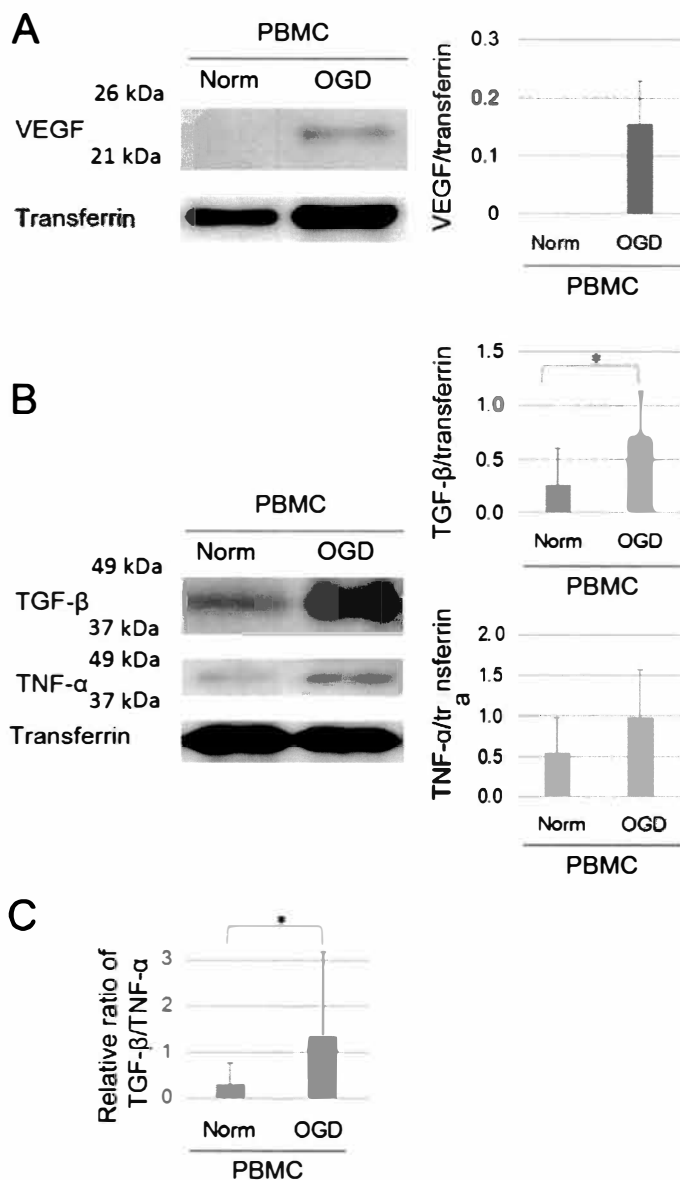


図1 低酸素低糖刺激 (OGD) を受けた末梢血単核球 (PBMC) の保護的極性の獲得

- A) 通常培養を行った PBMC (Normoxic-PBMC) と 18 時間 OGD 刺激を加えた PBMC (OGD-PBMC) の培養馴化培地に対する VEGF のウェスタンブロットティング (N = 4). トランスフェリンはローディングコントロール. VEGF の発現結果から, OGD-PBMC では VEGF の分泌が認められたのに対し, Normoxic-PBMC では認められなかった (N = 4). PBMC: peripheral blood mononuclear cells, OGD: oxygen-glucose deprivation, VEGF: vascular endothelial growth factor.
- B) Normoxic-PBMC と OGD-PBMC の培養馴化培地に対する TGF-β と TNF-α のウェスタンブロットティング. トランスフェリンに対する TGF-β 及び TNF-α のデンストメトリーの結果から, OGD-PBMC では Normoxic-PBMC に対して有意に TGF-β の発現亢進が認められた (N = 7). TNF-α は発現に有意差を認めなかった (N = 7).
- C) TNF-α に対する TGF-β の比は OGD-PBMC では Normoxic-PBMC に対して有意に高値であった.

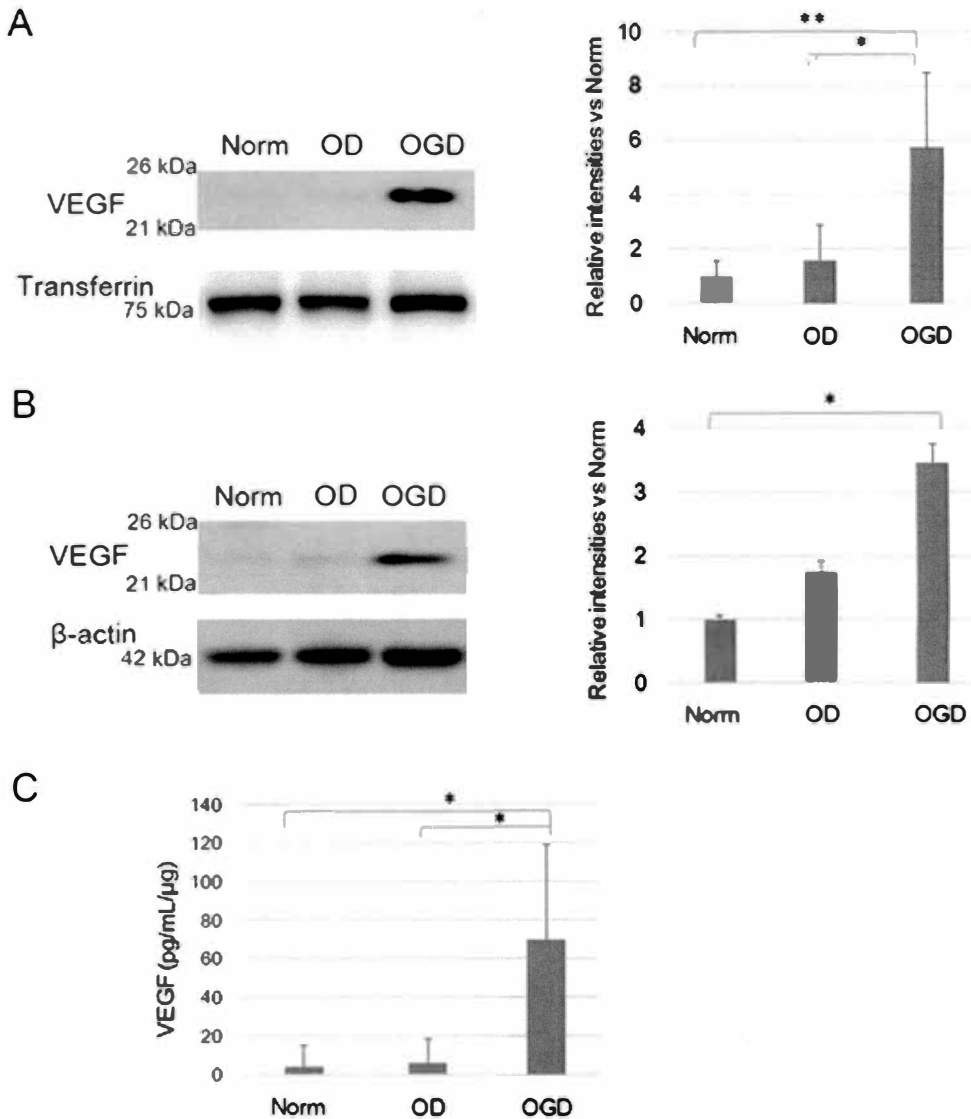


図2 通常培養、低酸素培養、OGD培養におけるVEGF濃度の比較

- A) それぞれの培養条件における馴化培地のVEGFに対するウェスタンブロッティング。トランスフェリンに対するVEGFのデンストメトリーの結果から、OGD培養では低酸素培養及び通常培養に対して有意にVEGFの発現亢進が認められた(N=6)。(*P<0.05, **P<0.01) OD: oxygen deprivation.
- B) それぞれの培養条件における培養細胞溶解物のVEGFに対するウェスタンブロッティング。アクチンに対するVEGFのデンストメトリーの結果から、OGD培養では通常培養に対して有意にVEGFの発現亢進が認められた(N=6)。(*P<0.05).
- C) PBMCにおけるそれぞれの培養条件の馴化培地に対してVEGF濃度をELISA法により測定した。OGD培養(70.0 ± 49.2 pg/mL/μg)では通常培養(4.3 ± 10.6 pg/mL/μg)、低酸素培養(6.2 ± 12.0 pg/mL/μg)に比べて有意にVEGF分泌が増加していた(N=6)。(*P<0.05).

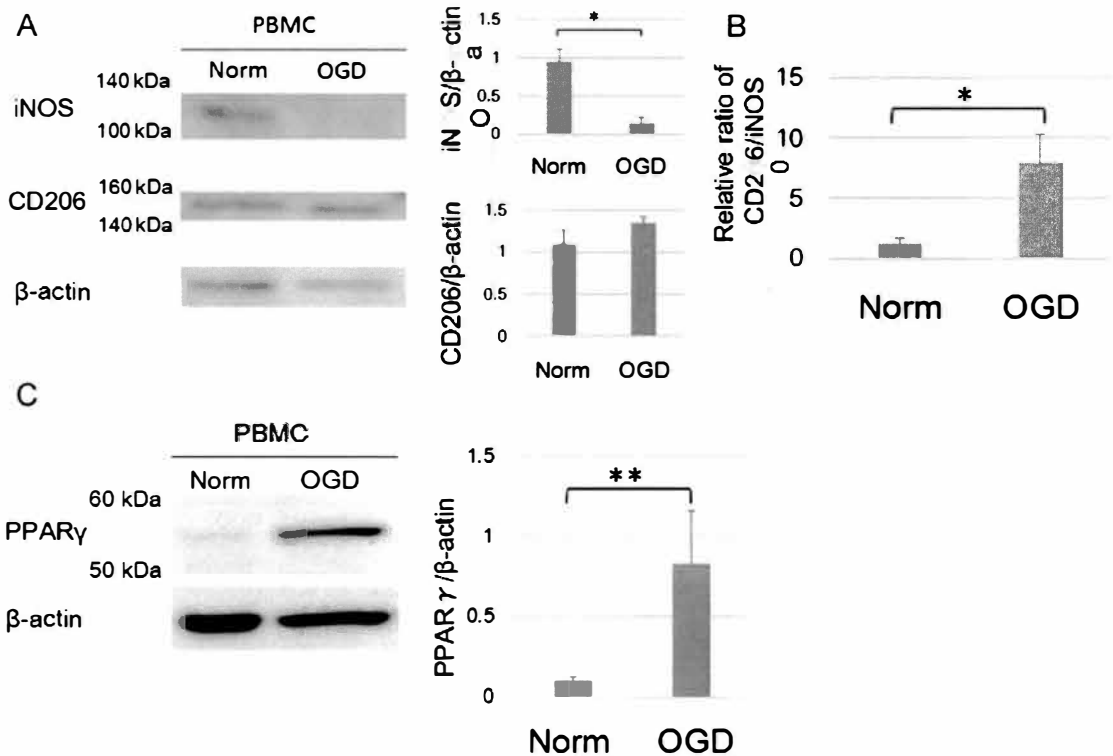


図3 OGD刺激によるPBMCの極性変化の機序

- A) Normoxic-PBMCとOGD-PBMCの細胞溶解物におけるiNOS及びCD206に対するウェスタンブロットティング。アクチンに対するiNOS及びCD206のデンシトメトリーの結果から、Normoxic-PBMCではOGD-PBMCに対して有意にiNOSの発現亢進が認められた(N=6)。CD206は発現に有意差を認めなかった(N=6)。
- B) iNOSに対するCD206の比率。OGD-PBMCではNormoxic-PBMCに対して有意にCD206/iNOS比が高値であった。
- C) Normoxic-PBMCとOGD-PBMCの細胞溶解物におけるペロキシソーム増殖因子活性化受容体γ(PPARγ)に対するウェスタンブロットティング。アクチンに対するPPARγのデンシトメトリーの結果から、OGD-PBMCではNormoxic-PBMCに対して有意にPPARγの発現亢進が認められた(N=7)。*P<0.05。**P<0.01。

かった(P<0.001)(図3C)。

5. OGD-PBMCでは、VLA-4やMCP-1の発現が亢進する

我々のグループはOGD-PBMCがBBBを通過することを報告している¹¹⁾。その機序を解明するため、BBBにおける血管内皮細胞との接着に重要な因子であるVLA-4の細胞染色を行った(図4A)²⁹⁾。OGD-PBMCではNormoxic-PBMCよりもVLA-4陽性細胞数が有意に増加していた(p<0.001)(図4B)。

次に走化性タンパク質MCP-1について、馴化培地のウェスタンブロットティングによる半定量評価を行った。OGD条件下では、通常条件下よりも、MCP-1発現は、約6倍高値であった(P=0.006)(図3B)。

考 察

本論文では、OGD刺激は、ラットPBMCに対し、1. VEGFとTGF-βの分泌、PPARγの発現を亢進させること、2. VLA-4及びMCP-1の

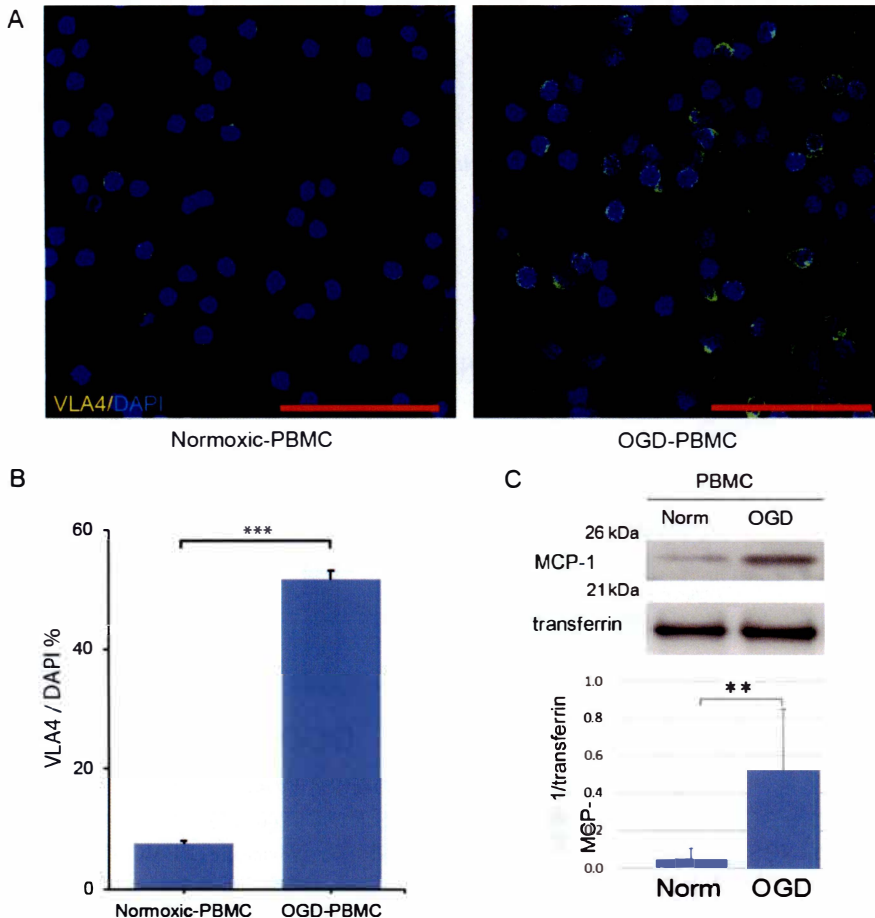


図4 OGD刺激によるPBMCの血液脳関門透過性の獲得

- A) Normoxic PBMCあるいはOGD-PBMCの培養細胞に対する抗VLA-4抗体を用いた免疫染色。VLA-4: very late antigen-4, スケールバー 50 μ m。
- B) 培養細胞の免疫染色ではOGD-PBMCは、Normoxic PBMCに比し、有意にVLA-4陽性細胞が増加していた (***) $p < 0.001$ 。N = 30。
- C) Normoxic-PBMCとOGD-PBMCの培養馴化培地に対する走化性タンパク質(MCP-1)のウェスタンブロッティング。トランスフェリンに対するMCP-1のデンストメトリーの結果から、OGD-PBMCではNormoxic-PBMCに対して有意にMCP-1の分泌亢進が認められた (** $p < 0.01$) (N = 5)。

発現を亢進させること、を明らかにした。これらの分子機序によりOGD-PBMCは、保護的極性を獲得し、BBBを通過すると推察した。

まず保護的極性の獲得機序について考察する。OGD刺激によりPBMCではVEGFとTGF- β の分泌が亢進した。これらはリモデリング因子であり血管新生や軸索伸長を促進し、組織再生に寄与する^{4) 7) 32)}。脳梗塞後の虚血巣ではこれらのリ

モデリング因子を分泌する保護的なPBMCが増加することが知られている¹⁴⁾。以上の点から、今回検討した条件のOGD-PBMCの保護的特性獲得の背景には、これらの因子の分泌の亢進が関与すると結論した。先に、著者らの研究グループは、OGD刺激により、ミクログリアがVEGFとTGF- β の分泌を亢進させ、保護的極性へと変化することを報告している³⁾。本知見は、それを

PBMCに拡張した。

また、これらの因子の分泌亢進の背景には、OGD刺激によるPPAR γ 発現の亢進が背景にあると推察した。PPAR γ は炎症性マクロファージにおいて、アクチベータータンパク質1 (AP-1)、核内因子 κ B (NF- κ B)、シグナル伝達兼転写活性化因子3 (STAT-3)などの炎症誘発性のシグナル伝達を阻害する²²⁾。これにより、PPAR γ は、炎症誘発性特性から保護的特性への極性化を促進する^{23) 24)}。この保護的な極性の獲得により、リモデリング因子の分泌を増加させる。さらに組織にもともと局在する細胞のパラクリン作用で、リモデリング因子がさらに増加する。このようにOGD-PBMCは、多面的な作用により、脳梗塞の虚血部での血管新生と軸索伸長を促進し、機能回復に資すると考えた^{3) 26) 27)}。以上からOGD刺激によるPPAR γ 転写因子の発現の亢進により、PBMC表現型が保護的極性へと変化することで、脳組織再生を促進する可能性が示唆された。

最後に、OGD-PBMCがBBBを越える機序について考察する。著者らのグループはOGD-PBMCが、実験的なラット脳梗塞モデルにおいて、BBBを通過し脳実質虚血部位に到達することを報告している¹¹⁾。またPBMCは脳実質やBBBが障害を受けた際に、BBBを越える^{9) 14) 20)}。しかし、これらの分子機序は不明であった。今回、著者はOGD-PBMCでは、VLA-4発現の亢進及びMCP-1の分泌が増加することを示した。VLA4はBBBの血管内皮細胞に存在する血管細胞接着タンパク質1 (VCAM-1)と強固に接着し、結果的に脳内への移行性を強める。実際、 α 4インテグリンに対するヒトモノクローナル抗体を用いて、 α 4 β 1インテグリンとVCAM-1の結合を阻害することにより、多発性硬化症の再発率を低下しうる³³⁾。一方、MCP-1は単球の脳組織への移行と浸潤を調節する重要なケモカインの1つである^{20) 30) 31)}。今回、著者が見出したVLA-4発現亢進、in vitroでのMCP-1の分泌増加は、PBMCの脳内移行性を高める分子機序である可能性がある。

OGD-PBMCは脳組織保護的特性とBBB透過

性を併せ持つ。PBMCは、採取も容易であるため、有力な新規細胞療法となる可能性がある。OGD刺激によりPBMCが保護的極性を獲得し脳組織再生を促すことは、中枢神経疾患への新しい治療法になる可能性がある。PPAR γ 上昇により細胞保護的な特性をもつ種々の成長因子、サイトカインの分泌を亢進させることを示した。また、PBMCにおける細胞接着因子VLA-4の発現増加及び走化性因子MCP-1を介して、脳内への細胞移行を促進する可能性が示唆された。

結 論

OGD刺激は、PBMCにて、転写因子PPAR γ の発現を増加させ、組織保護的な特性をもつサイトカイン、成長因子の分泌を増加させる。また、細胞接着因子VLA-4、及び走化性因子MCP-1の増加を介して、脳内への細胞移行を促進する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただきました。新潟大学脳研究所神経内科小野寺理教授、金澤雅人准教授、岡山公大特任助教、岐阜大学大学院脳神経内科下畑享良教授、医療イノベーション推進センター尾前薫先生、木村泰子先生、福島雅典先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省：平成30年度人口動態統計、<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei18/index.html>
- 2) Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, Fan X, Jiang Y, Stetler RA, Liu G and Chen J: Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. *Prog Neurobiol.* Apr; 115: 92-115, 2014.
- 3) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M and Shimohata T: Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional

- recovery in ischemic rats. *Sci Rep.* Feb 14; 7: 42582, 2017.
- 4) Li Q, Ford MC, Lavik EB and Madri JA: Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J Neurosci Res.* Dec; 84: 1656-1668, 2006.
 - 5) Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N and Nagata I: Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke.* Mar; 44: 720-726, 2013.
 - 6) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH and Fauci AS: Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* Jun; 83: 4167-4171, 1986.
 - 7) Jin K, Mao XO and Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. *J Neurobiol.* Feb 15; 66: 236-242, 2006.
 - 8) Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F and Ehlers MD: TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell.* Jul 9; 142: 144-157, 2010.
 - 9) Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, Memanishvili T, Monni E, Tatarishvili J, Miskinyte G, Ge R, Ahlenius H, Lindvall O, Schwartz M and Kokaia Z: Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J Neurosci.* Apr 13; 36: 4182-4195, 2016.
 - 10) Chernykh ER, Shevela EY, Starostina NM, Morozov SA, Davydova MN, Menyaeva EV and Ostanin AA: Safety and Therapeutic Potential of M2 Macrophages in Stroke Treatment. *Cell Transplant.* 25: 1461-1471, 2016.
 - 11) 保護的末梢血単核球移植による脳梗塞に対する機能回復促進療法：新潟医学会雑誌 島山公大 2020 in press
 - 12) Zucker-Franklin D: The percentage of monocytes among "mononuclear" cell fractions obtained from normal human blood. *J Immunol.* Jan; 112: 234-240, 1974.
 - 13) Ukai R, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H and Kocsis JD: Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J Neurotrauma.* Mar; 24: 508-520, 2007.
 - 14) Liu YX, Guo XM, Li JF, Meng Y, Zhang HT, Liu AJ, Li SC, Liu YL, Zhu H, Xue JH, Zhang Y and Zhang ZW: Restoration of tissue damage, and never activity after hypoxia-ischemia by implantation of peripheral blood mononuclear cells. *Brain Res.* Feb 10; 1546: 34-45, 2014.
 - 15) Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA and Maini RN: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2: 477-488, 2000.
 - 16) Hori E, Hayakawa Y, Hayashi T, Hori S, Okamoto S, Shibata T, Kubo M, Horie Y, Sasahara M and Kuroda S: Mobilization of Pluripotent Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells in Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* Jun; 25: 1473-1481, 2016.
 - 17) Iadecola C and Anrather J: The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* Jul 7; 17: 796-808, 2011.
 - 18) Salven P, Orpana A and Joensuu H: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* Mar; 5: 487-491, 1999.
 - 19) Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y and Chen J: Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* Nov; 43: 3063-3070, 2012.
 - 20) Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK and Wiessner C: Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* Mar; 22: 308-317, 2002.

- 21) Kilkenney C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab.* Apr; 31: 991-993, 2011.
- 22) Chinetti G, Fruchart JC and Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol.* Oct; 14: 459-468, 2003.
- 23) Zhou D, Ji L and Chen Y: TSPO Modulates IL-4-Induced Microglia/Macrophage M2 Polarization via PPAR- γ Pathway. *J Mol Neurosci.* 2019 Dec 26.
- 24) Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B and Chinetti-Gbaguidi G: PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* Aug; 6: 137-143, 2007.
- 25) Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T and Shimohata T: Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *Int J Mol Sci.* Oct 13; 18. pii: E2135, 2017.
- 26) Arai K, Jin G, Navaratna D and Lo EH: Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J.* Sep; 276: 4644-4652, 2009.
- 27) Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, Onodera O, Shimohata T and Del Zoppo GJ: Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab.* May; 39: 753-769, 2019.
- 28) Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I and Vunjak-Novakovic G: Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* Jan; 114: 220-229, 2013.
- 29) Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert WE, Flügel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H and Flügel A: Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* Nov 5; 462: 94-98, 2009.
- 30) Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R and Dempsey RJ: Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jun; 27: 1213-1224, 2007.
- 31) Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS and Springer TA: Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA.* Apr 26; 91: 3652-3656, 1994.
- 32) Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L and Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo: *Proc Natl Acad Sci USA.* Sep 3; 99: 11946-11950, 2002.
- 33) Xu XE, Liu L, Wang YC, Wang CT, Zheng Q1, Liu QX, Li ZF, Bai XJ and Liu XH: Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis. *Brain Behav Immun.* Aug; 80: 859-870, 2019.

(令和2年1月20日受付)