

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)

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

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)*

Reprint request to: Itaru NINOMIYA

Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, 1-757
Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-
8585, Japan

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。著者らのグループらは、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（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化を反映している 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-beta(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)。このことから単球・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, 18, 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°C 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ティング法で比較した。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ティングでは、OGD-PBMCは、

Normoxic-PBMC よりも iNOS は少なかった (P = 0.01) (図 3 A)。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 3 B)。

5. OGD 条件下では、PPAR γ 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 (PPAR γ) の発現をウェ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 PPAR γ 発現は 6 倍高かった (P < 0.001) (図 3 C)。

6 . 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 4 A) (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 4 B)。

次に走化性タンパク質 MCP-1 について、馴化培地のウエスタンブロッ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 3 B)。

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、PPAR γ の発現を亢進させること、2. VLA-4 及び MCP-1 の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、 $\alpha 4$ インテグリンに対するヒト化モノクローナル抗体を用いて、 $\alpha 4\beta 1$ 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、畠山公大特任助教、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。

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 のデンシ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 のデンシ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

ンシ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ルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) に対するウェスタンブロッティング。アクチンに対する PPAR γ 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 PPAR γ の発現亢進が認められた (N = 7)。* P < 0.05。 ** P < 0.01。

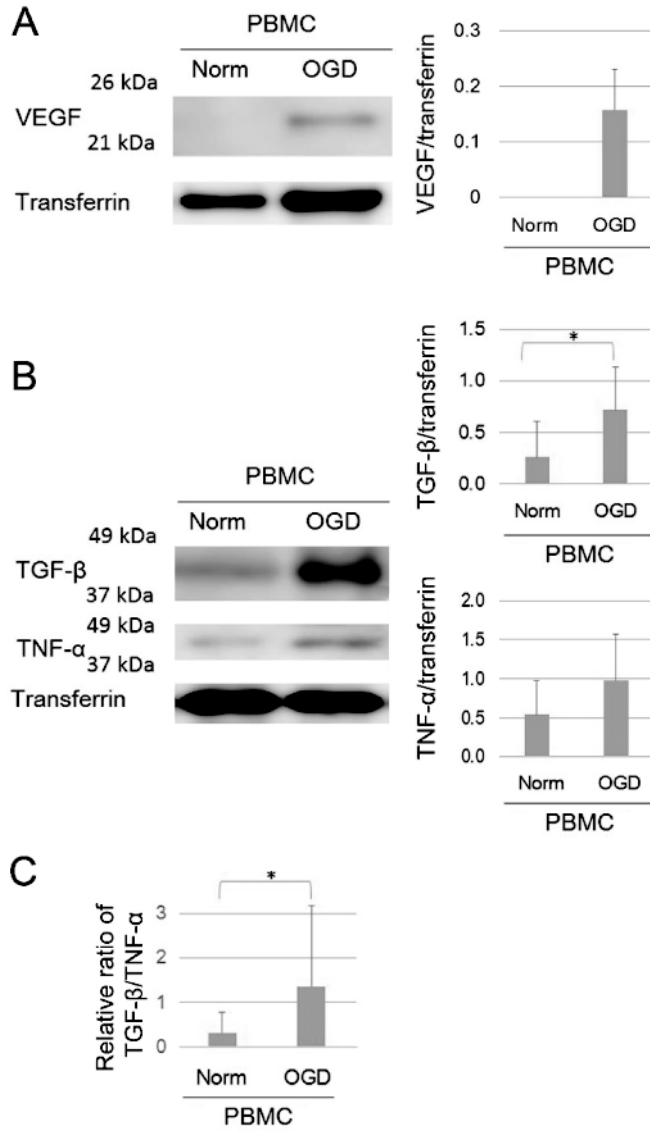
図 4 OGD 刺激による PBMC の血液脳関門透過性の獲得

- 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、

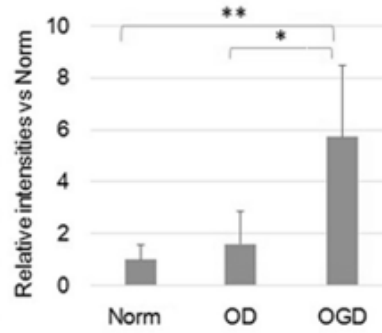
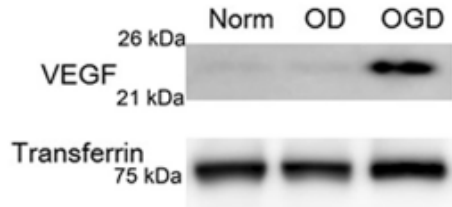
Normoxic PBMC に比し、有意に VLA-4 陽性細胞が増加していた (** $p < 0.001$)。

N = 30

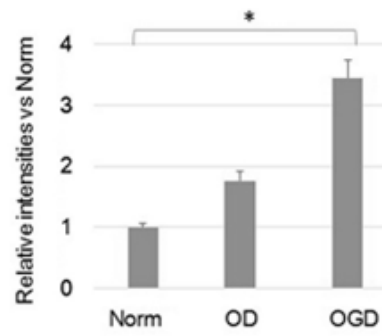
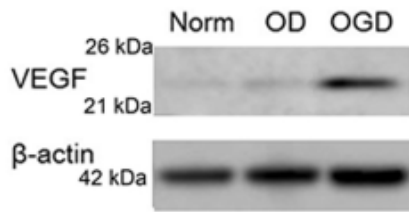
C) Normoxic-PBMC と OGD-PBMC の培養馴化培地に対する走化性タンパク質 (MCP-1) のウェスタンブロッティング。トランスフェリンに対する MCP-1 のデンストメトリーの結果から、OGD-PBMC では Normoxic-PBMC に対して有意に MCP-1 の分泌亢進が認められた (** $p < 0.01$) (N = 5)。



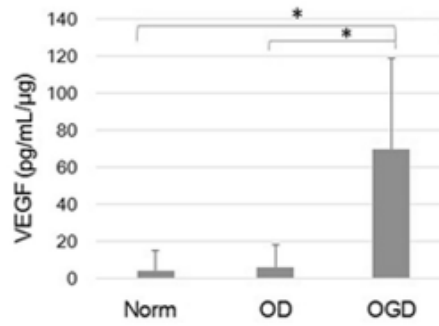
A

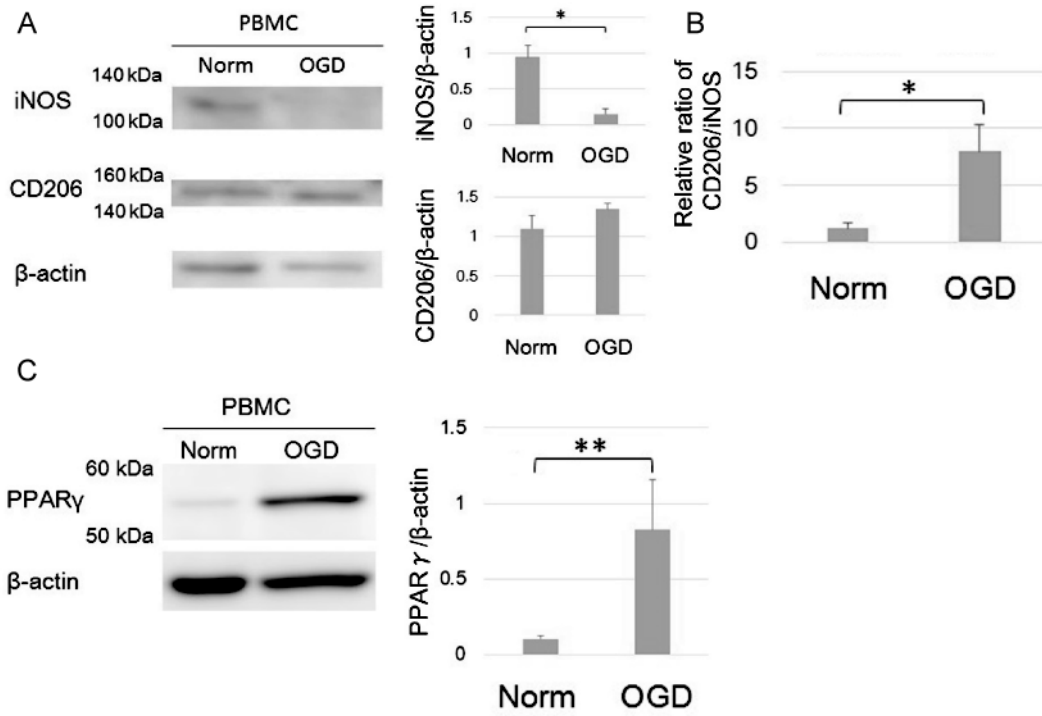


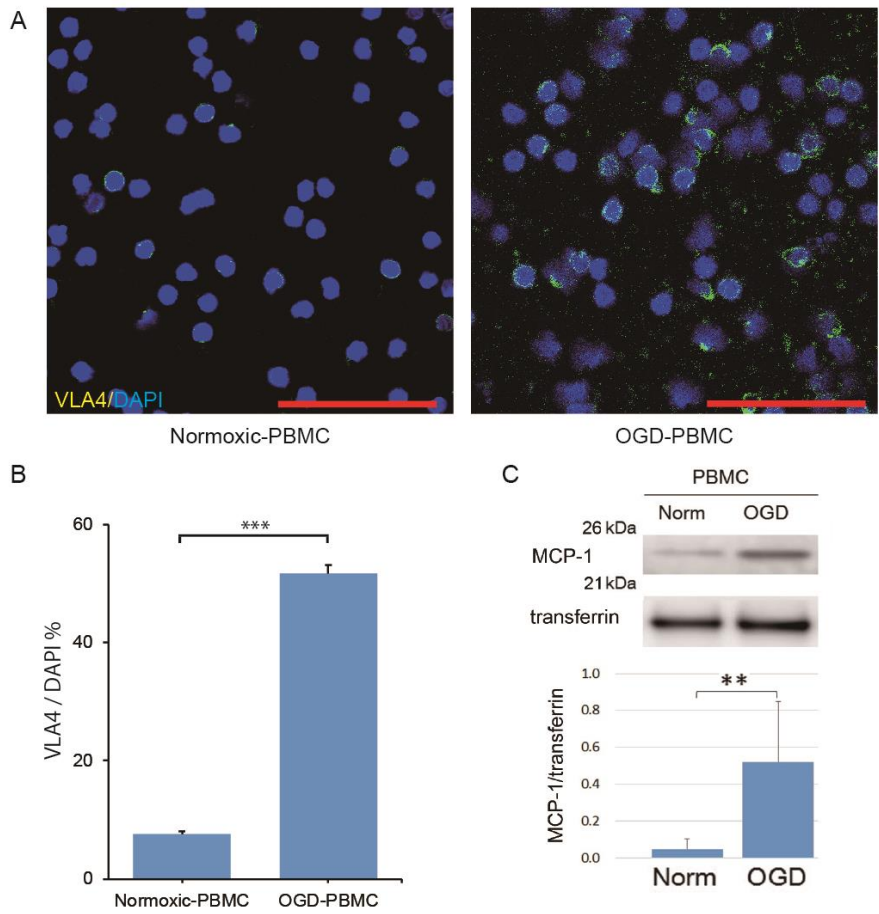
B



C







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, Chen J. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside. *Prog Neurobiol.* 2014 Apr;115:92-115.
3. Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, Koyama M, Hatakeyama M, Ishikawa M, Nakajima T, Onodera O, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep.* 2017 Feb 14;7:42582.
4. Li Q, Ford MC, Lavik EB, 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.* 2006 Dec;84(8):1656-68.
5. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke.* 2013 Mar;44(3):720-6.
 6. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(12):4167-71.
 7. Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor stimulates

- neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling. *J Neurobiol.* 2006 Feb 15;66(3):236-42.
8. Yi JJ, Barnes AP, Hand R, Polleux F, Ehlers MD. TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell.* 2010 Jul 9;142(1):144-57
9. Wattananit S, Tornero D, Graubardt N, Memanishvili T, Monni E, Tatarishvili J, Miskinyte G, Ge R, Ahlenius H, Lindvall O, Schwartz M, Kokaia Z. Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J Neurosci.* 2016 Apr 13;36(15):4182-95.
10. Chernykh ER, Shevela EY, Starostina NM, Morozov SA, Davydova MN,

Menyaeva EV, Ostanin AA. Safety and Therapeutic Potential of M2 Macrophages in Stroke Treatment. Cell Transplant. 2016;25(8):1461-71.

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 畠山公大 2020 in press
12. Zucker-Franklin D. The percentage of monocytes among "mononuclear" cell fractions obtained from normal human blood. J Immunol. 1974 Jan;112(1):234-40.
13. Ukai R, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. J Neurotrauma. 2007 Mar;24(3):508-20.
14. Liu YX, Guo XM, Li JF, Meng Y, Zhang HT, Liu AJ, Li SC, Liu YL, Zhu H, Xue JH, Zhang Y, Zhang ZW. Restoration of

tissue damage, and never activity after hypoxia-ischemia by implantation of peripheral blood mononuclear cells. Brain Res. 2014 Feb 10;1546:34-45.

15. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res. 2000;2(6):477-88.

16. Hori E, Hayakawa Y, Hayashi T, Hori S, Okamoto S, Shibata T, Kubo M, Horie Y, Sasahara M, Kuroda S. Mobilization of Pluripotent Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells in Ischemic Stroke. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Jun;25(6):1473-81.

17. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nat Med. 2011 Jul

7;17(7):796-808.

18. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res.* 1999 Mar;5(3):487-91.
19. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2012 Nov;43(11):3063-70.
20. Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Mar;22(3):308-17.
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.* 2011 Apr;31(4):991-3

22. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol.* 2003 Oct;14(5):459-68.

23. Zhou D, Ji L, Chen Y. TSPO Modulates IL-4-Induced Microglia/Macrophage M2 Polarization via PPAR- γ Pathway. *J Mol Neurosci.* 2019 Dec 26.

24. Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S,

Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. 2007 Aug;6(2):137-43.

25. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. Int J Mol Sci. 2017 Oct 13;18(10). pii: E2135.

26. Arai K, Jin G, Navaratna D, Lo EH. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. FEBS J. 2009 Sep;276(17):4644-52

27. Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M,

- Onodera O, Shimohata T, Del Zoppo GJ. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 May;39(5):753-769.
28. Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I, Vunjak-Novakovic G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2013 Jan;114(1):220-9.
29. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert WE, Flügel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H, Flügel A. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 2009 Nov 5;462(7269):94-8.
30. Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. Monocyte

chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jun;27(6):1213-24.

31. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 26;91(9):3652-6.

32. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11946-50.

33. Xu XE, Liu L, Wang YC, Wang CT, Zheng Q1, Liu QX, Li ZF, Bai XJ, 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.
2019 Aug;80:859-870.