大脳皮質における血管・神経の協調的な発生制御機構 ～VEGF シグナルの緻密な調節～

水谷 健一

Neuro-vascular Interactions during Neocortical Development —Systematic and Accurate Regulatory Mechanisms of VEGF Signaling—

Ken-ichi Mizutani

*Laboratory of Stem Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kobe Gakuin University; 1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan.*

(Received September 24, 2019)

Blood vessels supply oxygen and nutrients to all the cells in a living body, and provide essential transport routes for collecting waste products. For these functions, blood vessel networks should be appropriately formed in each tissue. Therefore, blood vessels are one of the earliest organs formed during the developmental process. Development of the blood vessel system promotes tissue differentiation and organ morphogenesis, allowing each organ to maintain its unique functions under changing metabolic conditions. Blood vessels have a relatively simple structure, consisting of endothelial cells covering the inner layer, and pericytes or smooth muscle cells surrounding the outside. The structure of the vascular network is extremely diverse, with blood vessels uniquely organized depending on the tissues they serve, to create tissue-specific microenvironments. How are such tissue-specific vascular environments generated? Over the years, anatomical findings have accumulated to confirm this vascular diversity. However, the molecular basis for this diversity has remained unclear. In the present article, we review the mechanisms of coordinated developmental control of the vascular and neural systems in the cerebral cortex from the viewpoint of the accurate expression control of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling, and describe future perspectives.

Key words—angiogenesis; neocortex; development; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor; neural stem cell

1. VEGF による血管・リンパ管の形成機構

血管とリンパ管の発生を調節する最も基本的なシグナル系は、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) ファミリーと (Fig. 1), それらに対する受容体が発生初期から中心的な役割を果たし、大脳皮質の形成過程においても、例外ではない。発生学的には、VEGF-A が血管を制御し、¹⁾ VEGF-A のノックアウトマウスは、ホモ型ばかりでなく、ヘテロ型においても血管系の異常により胎生致死となること²⁾が知られている。また、ワイルドタイプマウスと比較して2倍程度の軽度なVEGF-A 過剰発現マウスでも、血管形成不全によ

り胎生致死となること³⁾からも分かるように、胎生期の組織内の VEGF-A 量は極めて緻密な調節によって血管形成を制御していることが示唆される。こうした VEGF-A の遺伝子発現は、低酸素や増殖因子などによって誘導されるが、特に、発生期の低酸素状態における低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor; HIF)⁴⁾の産生を介した VEGF-A の発現亢進が血管形成に重要であることは、HIF と関連遺伝子に対するノックアウトマウスの解析⁵⁾から明らかである。

生体が生命を維持するためには、外部から酸素と栄養分を取り込んだ体液を末梢組織へと供給することが必要不可欠となる一方で、同時に、細胞活動によって生じた二酸化炭素と老廃物を外部へ排出する必要がある。こうした微小循環の物質交換は毛細血管を介して行われるが、物質交換の過程で血管から組織への血液成分の供給に伴い、血管から組織液が

神戸学院大学大学院薬学研究科幹細胞生物学研究室
(〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3)

e-mail: mizutani@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 139 年会シンポジウム S16 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Crosstalk of the VEGF-VEGFR System Exert both Angiogenesis and Lymphogenesis

漏れ出るため、ここで生成した余分な組織液は毛细リンパ管で回収され、リンパの流れが生じる。この際、リンパ液は組織の老廃物やタンパク質成分も回収するため、リンパ管を介した物質排出機構は、異物や種々の抗原に対する免疫能を高め、生体防御系としても重要な役割を果たす。血管とリンパ管は、内腔を一層の内皮細胞が構成する点で構造的に極めて高い類似性を持つ器官であり、リンパ管を制御する中心的なシグナル系は、VEGFファミリーのメンバーである VEGF-C と VEGF-D であり、⁶⁾ これらの遺伝子欠損マウスでは、リンパ管の形成不全により胎生致死となる。

2. VEGF 受容体による組織の血管化

1990 年、血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor; PDGFR) に類似性を示す新規受容体チロシンキナーゼ遺伝子が同定され、Fms-like tyrosinekinase-1 (Flt-1) と名付けられた。⁷⁾ 追って、Flt-1 は血管内皮細胞で特異的に強く発現し、VEGF-A との高い親和性結合が見い出されたこと⁸⁾ から、VEGF 受容体 (VEGF receptor; VEGFR) の一種であることが明らかとなり、現在では VEGFR-1 とも称されている。その後、VEGFR-1/Flt-1 と類似する 2 つの遺伝子 VEGFR-2/KDR (Flk-1) と VEGFR-3/Flt-4 が同定された (Fig. 1)。

VEGFR-1 遺伝子は、スプライシングによって膜

貫通型受容体と分泌型受容体 (soluble VEGFR1; sVEGFR1) をコードするが、sVEGFR-1 は VEGF-A に強く結合し、VEGF-A の VEGFR-1 及び VEGFR-2 への結合を阻害することで、血管新生を抑制することが知られている。VEGFR-1 の生化学的特徴は、VEGF-A との極めて高い親和性であり、チロシンキナーゼ活性は VEGFR-2 の約 1/10 であること⁹⁾ がある。一方、VEGFR-2 は強いチロシンキナーゼ活性と、VEGFR-1 に比べて極めて弱い VEGF-A との親和性を持つ。これらのことは、血管新生の直接的なシグナルは主に VEGFR-2 が担う一方で、VEGFR-1 は VEGF シグナルに対する内因性の抑制因子として働き、VEGFR-2 の効果を調節していることを示唆する。実際、VEGFR-1 ノックアウトマウスは血管形成が過剰に起こることにより胎生致死となるのに対して、VEGFR-2 ノックアウトマウスは血管が全く形成されず胎生致死となること¹⁰⁾ が報告されている。このように血管新生の促進因子と抑制因子のバランスを精確に制御することによって、組織内に三次元的に広がる複雑な血管網を精巧に張り巡らすことができるものと考えられる。

リンパ管と血管の形成は、VEGF-VEGFR に関して独立したシグナルを利用しながらも、複雑なクロストークが存在することが知られている。^{11,12)} VEGFR-2 はリンパ管内皮細胞にも発現しており、VEGF-A からのシグナルは VEGFR-2 を通してリンパ管内皮細胞にも伝えられることでリンパ管新生が促される。加えて、VEGF-C/D は VEGFR-3 のみならず、⁶⁾ 弱い親和性ながらも VEGFR-2 に結合して活性化することが知られている。VEGFR-1 はリンパ管内皮細胞では発現していないが、マクロファージなどの炎症系細胞に発現し、これらの細胞の遊走や活性化を促進し、遊走したマクロファージは VEGF-C を産生してリンパ管新生を誘導することから、VEGFR-1 もリンパ管形成に関与している

水谷健一

神戸学院大学大学院薬学研究科特命教授。2002 年京都大学大学院人間環境学研究科博士後期課程修了。京都大学再生医科学研究所研究員、ジョンスホプキンス大学医学部研究員、同志社大学准教授を経て、2017 年より現職。現在、脳や皮膚の脈管系の発生・発達・老化研究に従事。日本神経化学会評議員。

ことになる。一方、VEGFR-3の発現は成体では血管内皮細胞における発現が認められないが、腫瘍を移植することによる腫瘍血管新生の観察から、血管内皮細胞でVEGFR-3の活性化が観察されることが知られている。以上のように、VEGF-VEGFRシグナル系が血管新生とリンパ管新生に中心的な役割を果たすことは明確である一方で、抗VEGF-A抗体が腫瘍血管新生を完全に阻害できないことなどからも、血管新生を制御する未解明の分子機構の存在が想定されている。

3. VEGFとその受容体による脳血管の発生制御機構

筆者の研究室では、VEGFR-1、VEGFR-2、及びVEGFR-3の血管リポーターマウス¹³⁻¹⁵⁾の脳皮質を観察することで、脳血管の発生と組織構築の関連性を解析してきた。¹⁶⁾ 脳皮質発生過程の神経幹細胞は、増殖と分化の均衡を保ちながら自らの性質を刻々と変化することで、異なるサブタイプの大脳皮質ニューロンを規則的に産み出し、その結果、整然とした皮質階層構造を構築している。この際、神経発生と血管発生が協調しながら、その組織構築を精確に進める様々な細胞挙動が確認されており、大脳皮質の形成過程における脈管系の役割が注目されている。

例えば、終脳腹側に位置する血管内皮細胞は腹側の神経幹細胞が発現する転写因子Dlx2を発現するが、この内皮細胞が腹側から背側へと進入する際に、背側の神経幹細胞が発現する転写因子Pax6を発現するように変化することが報告されており、¹⁷⁾ また、血管内皮細胞は抑制性ニューロンが腹側から背側へと移動する際に重要なガイド役を担うことが明らかとなっている。¹⁸⁾ さらに、血管内皮細胞由来の液性因子が神経幹細胞の増殖と維持に寄与すること、¹⁹⁾ Tbr2陽性の分裂期にある中間型前駆細胞は血管分岐点に高頻度で位置すること、²⁰⁾ オリゴデンドロサイト前駆細胞は血管を足場として移動した後、血管から離れることで分化に向かうこと²¹⁾ などが報告されているが、こうした分化調節を担う特殊な微小環境を持つ血管が、どのように精確に組織内で発生するかについてはほとんど明確化されていなかった。筆者の研究では、VEGFR-1ヘテロノックアウトマウスにおいて、組織内の規則的な血管密度が乱されると、神経幹細胞の維持と分化のバランス

が破綻し、結果的に大脳皮質形成に影響を及ぼすことが確認されていることから、¹⁶⁾ 組織内における規則的な血管発生は神経発生を制御する細胞外環境として重要な役割を担うと考えられる。²²⁾

解剖学的には、大脳皮質を構築する血管は、軟膜を覆う軟膜血管 (pial vessel; PV) と、大脳皮質実質に形成される脳室周囲血管 (periventricular vessel; PVV) に区別される。前者は胎齢10日にはおむね発生が完了する一方で、後者は神経組織の肥厚と協調して発生が進行し、血管内皮細胞とペリサイトが各々、終脳基底核近傍から胎齢10日ごろに進出し、腹側から背側へと移動しながら管状構造を拡大させることで血管網を構築することが知られている。¹⁷⁾ VEGFR-2のリポーターマウスを用いた筆者の観察から、大脳皮質組織の血管化の過程では、VEGFR-2を発現し先端細胞の形態を示す内皮細胞 (Fig. 2, Arrow head) が、まず軟膜側のPV側から脳室面側へと下降し (Fig. 2, Dotted circle)、その降りてきた血管先端細胞に向かって腹側から移動してきたPVVとつながることで、組織内で血管網が腹側から背側に向かって徐々につながっていく様子が観察されている (Fig. 3, 未発表)。しかしながら、現状の知見のみでは精巧で複雑な血管形成をすべて説明することはできない。なぜならば、発生期の脳皮質で進行する血管化は極めて精確に単位面積あたりの血管密度や分岐点を調節しながら発生しており、血管網が形づくる形態についても領域毎に高い規則性を保ちながら、血管形成が進行 (Fig. 4) していく。¹⁶⁾ また、血管内皮細胞と協調してペリサイトの移動も連携して進行するが、どのようにして規則性を保ったまま組織内に張り巡らせることができるのか、同時に、ペリサイトの巻き付きが強固な領域や緩い領域を区別しながらいかに血管透過性を調節しているのかなど、血管が自律的に、かつ精確に血管形成を遂行する過程は数多くの未解明の問題を残している。

前述の通り、このような血管形成の規則性は、低酸素状態におけるHIFの産生を介したVEGF-Aの発現誘導と、これを制御するVEGF受容体为中心的な役割を果たすと考えられる。筆者のこれまでの研究から (未発表を含む)、神経幹細胞の中でも未分化性が極めて高いNotch^{high} 幹細胞²³⁾ は、低酸素に応答する複数の遺伝子群の発現が顕著に亢進して

Fig. 2. VEGFR-2 Positive Endothelial Tip Cells Project from the Pia to Form Honeycomb-like Vascular Plexus

Squared area at a higher magnification is shown in the right panel. Arrow head indicates endothelial tip cells. Dotted circle indicates endothelial cells came from pial vessels.

Fig. 3. A New Model of Neocortical Angiogenesis

Fig. 4. Angiogenesis Progresses in a Regular Pattern during Neocortical Development

おり、実際、微小酸素センサーを用いた定量実験から、発生期の脳皮質の脳室面近傍は、組織酸素濃度が低く、活性酸素が豊富な領域²⁴⁾であることが見い出されている。また、HIF-1 α は、Notch タンパク質の安定化²⁵⁾や β カテニンの活性化²⁶⁾に寄与することが報告されているのに加えて、最近の研究では、HIF-1 α の量的な変化が幹細胞の維持から分化への移行に寄与すること²⁷⁾が明らかになっている。こうした組織内の低酸素環境は、VEGF 及び VEGF 受容体の活性化と密接に関連していることから、発生期の脳皮質においては必要な血管密度を保ちながらも、必要な時期に必要な領域を低酸素に誘導する綿密な分子機構が存在していることが示唆される。筆者の研究では、神経幹細胞がより対称分裂を行う時期では HIF-1 α の発現が脳室面周囲で顕著であるが、神経発生後期で非対称分裂が優位になる頃には、その発現が徐々に減弱されること¹⁶⁾が確認されている。一方、HIF-1 α の安定化は Wnt7a/7b の活性化を介してオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cells; OPCs) の分化

を制御する²⁸⁾ことが報告されており、実際、筆者のこれまでの研究で、OPCs が最終分化に向かう前に OPCs が局在する組織周辺では HIF-1 α の発現が顕著に促されること¹⁶⁾が確認されている。以上のように、発生過程において規則的に血管を構築していく過程は、幹細胞の微小環境の構築を通して分化の制御と密接な関連性があると考えられる。

4. 脳血管・リンパ管の破綻がもたらす病態、今後の展望

最後に、こうした脳皮質の脈管系の規則的な構築を形態学的・発生学的に理解する研究を、今後どのような方向に発展させていくかについて展望を述べる。

脳は、神経細胞の活動を維持するために膨大なエネルギーを必要とするが、エネルギー源であるグルコース・酸素の供給を血流に依存しているにもかかわらず、脳には正常なエネルギー代謝を支えるだけのグルコースの蓄積ができない。すなわち、脳の機能を維持するためには、血管老化を抑えることが重要となる。しかしながら、ヒトの血管は加齢に伴い、構造的・機能的変化をきたす。例えば、大動脈では加齢に伴い内膜が肥厚して血管壁が厚くなることで伸展性の低下につながる。また、細胞外マトリックスの変化や動脈壁の石灰化などを起因として血管は加齢とともに硬化する。さらには、加齢に伴って脳の毛細血管が減少することが古くから指摘されており、実際、ヒトでは脳皮質の血管密度は灰白質で 16%、白質で 20%程度減少すること^{29,30)}が報告されており、齧歯類では脳皮質や海馬の血管数が 20%程度減少し、³¹⁾ 白質では血管密度や毛細血管の長さが 20%減少する³²⁾とされている。一方、古くから、神経疾患と毛細血管の減少は密接な関連性が指摘されており、アルツハイマー病患者の脳では毛細血管が約 30%減少すると報告されており、³³⁾ 認知症で高頻度に見られる白質病変は、血流の低下が一因とされている。こうした毛細血管の減少は、局所的な酸素や栄養の欠乏状態につながると考えられる。脳組織は、神経細胞、グリア細胞など多様な細胞から成り立っているが、これらの構成細胞の中で最も虚血に弱いのは神経細胞であることが知られている。興味深いことに、この虚血に対する神経細胞の脆弱性は均一ではなく、組織部位によって大きく異なり、選択的脆弱性の存在が古くから指

摘されており、³⁴⁾ 無（低）酸素血症や心停止などの全脳虚血で、大脳皮質の第 III, V/VI 層、海馬の CA1 の壊死が顕著であることが示されている。このような選択的脆弱性が認められる原因としては、Spielmeyer ら（1925 年）の血管構築に起因するとした Vascular 仮説と Vogt（1937 年）の細胞側に起因するとした Pathocllisis 仮説があり、古くから論争されているが、結論に至っていない。筆者の研究室では、毛細血管の形態学的・分子的な特徴を詳細に解析することは、神経細胞の脆弱性についての不均一性を解く新しい概念につながることを期待し、さらに現在解析を進めている。

一方、これまで中枢神経系においては、リンパ系は存在しないものと考えられてきた。すなわち、体内の老廃物の排除と免疫細胞の輸送を助ける脈管網は頸部で行き止まりになっているとされていたが、そもそも、中枢神経系にも動脈から静脈への組織液の流れがあり、免疫による監視を受けていることから、脳のリンパ系機能を調節する脈管系の解明が待たれていた。2015 年に Prox1-GFP レポーターマウスなどを用いて、脳の最外層の髄膜に位置する硬膜静脈洞に接し、リンパ球が濃縮して循環している新たな脈管系が同定された。^{35,36)} ここでは、脳脊髄液から髄液と免疫細胞の両方が輸送されるとともに、この髄膜のリンパ管が認知機能の維持にも、脳間質液や脳脊髄液におけるタンパク質の恒常性の維持にも重要な役割を果たすこと³⁷⁾ が明らかにされている。今後、脳の発生・発達・老化機構を解くブレイクスルーが脈管系の理解によって大きく前進することが期待される。

5. おわりに

血管は、構成細胞である内皮細胞と壁細胞の分化を経て、体の隅々に精巧に張り巡らされる。一見、血管は一様な臓器のように見受けられるが、多様性に富み、その多様性は、様々な臓器において固有の役割を果たす。しかしながら、現在の知見では、精巧で複雑な血管網がどのようにして構築され、これが機能の多様性をいかに生み出し、組織の恒常性の維持につながるのかについては不明な点が多い。今後、脈管系の発生・発達・老化機構を多面的に理解することが、組織の恒常性の維持を可能にする分子基盤を明らかにするとともに、新たな治療戦略の開発に貢献できるものと考えられる。

謝辞 本稿で記述した研究は、当研究室で推進してきた脳血管の発生制御機構を明らかにする研究プロジェクトに関与するところが大きく、当研究室の室員であった鈴木真理子研究員、山西恵美子研究員、渡部千里院生の 3 名、及び血管レポーターマウスの提供や数多くの助言を頂いた滋賀医科大学の依馬正次教授に深く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Ferrara N., *Endocr. Rev.*, **25**, 581–611 (2004).
- 2) Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeys S., Kieckens L., Gertszenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A., *Nature*, **380**, 435–439 (1996).
- 3) Miquerol L., Langille B. L., Nagy A., *Development*, **127**, 3941–3946 (2000).
- 4) Semenza G. L., Wang G. L., *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447–5454 (1992).
- 5) Dunwoodie S. L., *Dev. Cell*, **17**, 755–773 (2009).
- 6) Alitalo K., Carmeliet P., *Cancer Cell*, **1**, 219–227 (2002).
- 7) Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushime H., Sato M., *Oncogene*, **5**, 519–524 (1990).
- 8) de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L. T., *Science*, **255**, 989–991 (1992).
- 9) Shibuya M., Claesson-Welsh L., *Exp. Cell Res.*, **312**, 549–560 (2006).
- 10) Fong G. H., Zhang L., Bryce D. M., Peng J., *Development*, **126**, 3015–3025 (1999).
- 11) Shibuya M., *J. Biochem.*, **153**, 13–19 (2013).
- 12) Secker G. A., Harvey N. L., *Dev. Dyn.*, **244**, 323–331 (2015).
- 13) Matsumoto K., Azami T., Otsu A., Takase H., Ishitobi H., Tanaka J., Miwa Y., Takahashi S., Ema M., *Genesis*, **50**, 561–571 (2012).
- 14) Ishitobi H., Matsumoto K., Azami T., Itoh F., Itoh S., Takahashi S., Ema M., *Exp. Anim.*, **59**, 615–622 (2010).
- 15) Watanabe C., Matsushita J., Azami T.,

- Tsukiyama-Fujii S., Tsukiyama T., Mizuno S., Takahashi S., Ema M., *PLoS ONE*, **14**, e0210060 (2019).
- 16) Komabayashi-Suzuki M., Yamanishi E., Watanabe C., Okamura M., Tabata H., Iwai R., Ajioka I., Matsushita J., Kidoya H., Takakura N., Okamoto T., Kinoshita K., Ichihashi M., Nagata K., Ema M., Mizutani K., *Cell Rep.*, **29**, 1113–1129 (2019).
- 17) Vasudevan A., Long J. E., Crandall J. E., Rubenstein J. L., Bhide P. G., *Nat. Neurosci.*, **11**, 429–439 (2008).
- 18) Won C., Lin Z., Kumar T. P., Li S., Ding L., Elkhail A., Szabó G., Vasudevan A., *Nat. Commun.*, **4**, 2149 (2013).
- 19) Shen Q., Goderie S. K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K., Temple S., *Science*, **304**, 1338–1340 (2004).
- 20) Javaherian A., Kriegstein A., *Cereb. Cortex*, **19** (Suppl. 1), i70–i77 (2009).
- 21) Tsai H. H., Niu J., Munji R., Davalos D., Chang J., Zhang H., Tien A. C., Kuo C. J., Chan J. R., Daneman R., Fancy S. P., *Science*, **351**, 379–384 (2016).
- 22) Takashima S., Watanabe C., Ema M., Mizutani K., *Neurochem. Int.*, **129**, 104481 (2019).
- 23) Mizutani K., Yoon K., Dang L., Tokunaga A., Gaiano N., *Nature*, **449**, 351–355 (2007).
- 24) Inoue M., Iwai R., Tabata H., Konno D., Suzuki-Komabayashi M., Watanabe C., Iwanari H., Mochizuki Y., Hamakubo T., Matsuzaki F., Nagata K., Mizutani K., *Development*, **144**, 385–399 (2017).
- 25) Gustafsson M. V., Zheng X., Pereira T., Gradin K., Jin S., Lundkvist J., Ruas J. L., Poellinger L., Lendahl U., Bondesson M., *Dev. Cell*, **9**, 617–628 (2005).
- 26) Mazumadar J., O'Brien W. T., Johnson R. S., LaManna J. C., Chavez J. C., Klein P. S., Simon M. C., *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1007–1013 (2010).
- 27) Lange C., Turrero Garcia M., Decimo I., Bifari F., Eelen G., Quaegebeur A., Boon R., Zhao H., Boeckx B., Chang J., Wu C., Le Noble F., Lambrechts D., Dewerchin M., Kuo C. J., Huttner W. B., Carmeliet P., *EMBO J.*, **35**, 924–941 (2016).
- 28) Yuen T. J., Silbereis J. C., Griveau A., Chang S. M., Daneman R., Fancy S. P. J., Zahed H., Maltepe E., Rowitch D. H., *Cell*, **158**, 383–396 (2014).
- 29) Bell M. A., Ball M. J., *Acta Neuropathol.*, **53**, 299–318 (1981).
- 30) Brown W. R., Moody D. M., Thore C. R., Challa V. R., Anstrom J. A. A., *J. Neurol. Sci.*, **257**, 62–66 (2007).
- 31) Jucker M., Bättig K., Meier-Ruge W., *Neurobiol. Aging*, **11**, 39–46 (1990).
- 32) Shao W. H., Li C., Chen L., Qiu X., Zhang W., Huang C. X., Xia L., Kong J. M., Tang Y., *Anat. Rec. (Hoboken)*, **293**, 1400–1407 (2010).
- 33) Brown W. R., Thore C. R., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **37**, 56–74 (2011).
- 34) Astrup J., Siesjö B. K., Symon L., *Stroke*, **12**, 723–725 (1981).
- 35) Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Derecki N. C., Castle D., Mandell J. W., Lee K. S., Harris T. H., Kipnis J., *Nature*, **523**, 337–341 (2015).
- 36) Aspelund A., Antila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karaman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K., *J. Exp. Med.*, **212**, 991–999 (2015).
- 37) Da Mesquita S., Louveau A., Vaccari A., et al., *Nature*, **560**, 185–191 (2018).