

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591681

研究課題名 (和文) 脳微小血管内皮細胞の内在性脆弱性に関わる酸化ストレス亢進メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of mechanism of increase in oxidative stress related to intrinsic susceptibility in brain microvascular endothelial cells

研究代表者

錠谷 武雄 (ABUMIYA TAKEO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：80270726

研究成果の概要 (和文)：

脳微小血管内皮細胞 (BMEC) を大動脈内皮細胞 (AEC) と比較して BMEC の内在性脆弱性とそれに関わる酸化ストレス亢進の状態を検討した。終末糖化蛋白負荷による分子透過性の影響を検討してみると、BMEC の方が AEC より分子透過性が亢進していた。この BMEC の脆弱性には活性酸素産生亢進とそれに続く VEGF 発現亢進が関与していることが明らかとなった。また、高血糖負荷時の BMEC、AEC の活性酸素産生について検討したが、高血糖負荷時に BMEC で活性酸素産生が増加していた。この産生亢進については NADPH オキシダーゼの構成サブユニット NOX4 の発現量を調べてみたが、高血糖負荷により NOX4 の mRNA、蛋白の両方で発現が増加している結果が得られた。この結果より NOX4 が高血糖負荷時の活性酸素産生亢進に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated intrinsic susceptibility and its associated increase of oxidative stress in brain microvascular endothelial cells (BMEC) by comparing BMEC and aortic endothelial cells (AEC). When investigating the effect of advanced glycation end products on molecular permeability, the molecular permeability was more prominent in BMEC than in AEC. The susceptibility in BMEC was dependent on VEGF expression induced by over-production of reactive oxygen species. When investigating the effect of hyperglycemia on production of reactive oxygen species in BMEC and AEC, the production was increased in hyperglycemia. Since NOX4, one of subunits of NADPH oxidases, was also increased in the same hyperglycemic condition, we speculate that NOX4 is related to hyperglycemia-induced over-production of reactive oxygen species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：脳微小血管、血管内皮細胞、酸化ストレス、活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者では明らかな脳梗塞病変がなく

ても、高血圧、糖尿病の生活習慣病があると、MRI検査で全般的な脳萎縮や深部白質の高信

号性変化を呈しており、これが認知機能や運動能の低下に関連していることは日常臨床でよく経験される。このような全般的にびまん性に起こる脳の変化を説明するためには、大血管～細動脈の血管病変 (large～small vessel disease) ではなく、脳全体にくまなく行きわたる毛細血管を中心とする微小血管の血管病変 (microvascular disease) に焦点が当てられるべきであるが、その病態については未だ不明な点が多い。

(2) 我々はこの microvascular disease の病態解明のため、脳微小血管内皮細胞について検討し、糖尿病状態 (Advanced Glycation Endproducts : AGE 負荷) では細胞内の活性酸素量の増加が血管反応の引き金になっていることを明らかにした。この活性酸素量は、脳微小血管内皮細胞では他部位の内皮細胞 (大動脈内皮細胞) より多く、糖尿病状態のみならず、AGE 負荷前の定常状態でも脳微小血管内皮細胞で多いことを認めた。

また、脳微小血管内皮細胞は、培養をしていく上で細胞の増殖が遅く、細胞死に陥りやすく、培養を維持する上でより高い濃度のウシ胎児血清を必要とした。この細胞死については、フリーラジカルスカベンジャーを投与することにより、細胞死に陥る細胞が少なくなった。これらの結果より、脳微小血管内皮細胞の酸化ストレスの亢進した状態、すなわち細胞内活性酸素量の多いことが細胞脆弱性に関与している可能性が考えられた。我々が調べ得た限りでは、この脳微小血管内皮細胞の持つ脆弱性について検討した研究は認めなかった。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、脳微小血管内皮細胞の内蔵脆弱性の存在を明らかにし、その脆弱性の原因として考えられる酸化ストレスの亢進状態を分子細胞生物学的な手法を利用して検討することを目的としている。

酸化ストレスについては活性酸素の産生系と消去系のバランスによって制御されており、複数の要素が関わっていることが知られているが、産生系では NADPH オキシダーゼが最も大きく寄与していることが文献的にも明らかになってきている。このため、NADPH オキシダーゼの構成サブユニットに焦点をあてて活性酸素産生亢進のメカニズムについての検討を行うことを予定した。

## 3. 研究の方法

### (1) AGE 負荷時の脳微小血管内細胞の分子透過性と細胞内活性酸素量産生についての検討

#### ① 培養血管内皮細胞の分子透過性の検討

多孔性メンブレンにより上室と下室に区画された培養ウェル (Transwell、12mm pore size 0.4 $\mu$ m) の上室側にウシ脳微小血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cells: BMEC) もしくはウシ大動脈内皮細胞 (Aortic endothelial cells: AEC) をコンフルエント状態になるまで培養して、上室のメディアム内に添加した FITC 標識 dextran (分子量 4000Da) の下室への移行で血管内皮細胞の分子透過性を定量的に測定した。AGE (glyceraldehyde-derived AGE、100 $\mu$ g/ml) の添加前後で分子透過性の程度に差が生じるかを検討した。AGE の負荷は 8 時間とし、8 時間経過後に FITC 標識 dextran を添加して 4 時間経過後に下室のメディアムを採取し FITC 標識 dextran の濃度をマイクロプレートリーダーにて 510nm の吸光度で測定した。

#### ② VEGF mRNA の発現の検討

Real time RT-PCR によりの VEGF mRNA 発現の定量を行った。BMEC もしくは AEC を 6cm のコラーゲンコートしたディッシュにコンフルエント状態になるまで培養して、分子透過性を検討する時に用いたのと同じ濃度の AGE を添加し、8 時間後に細胞を採取し、RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。Real time RT-PCR の方法は TaqMan Gene Expression Cells-to-CT Kit (Applied Biosystems) を用い、PCR 反応は Applied Biosystems Prism 7000 detector (Applied Biosystems) を用いて行った。使用したプライマーは bovine VEGF sense 5' -ACG AAC GTA CTT GCA GAT GTG A-3' , bovine VEGF anti-sense 5' -CTG AGG GAG GCT CCT TCC T-3' , bovine VEGF Taqman probe FAM-TCA CCG CCT CGG CTT G-TAMRA, bovine  $\beta$ -actin sense 5' -CTT CCT TCC TGG GCA TGG A-3' , bovine  $\beta$ -actin anti-sense 5' -ACG TCA CAC TTC ATG ATG GAA TTG A-3' , bovine VEGF Taqman probe FAM- CTG CGG CAT TCA CG-TAMRA である。内部コントロールである  $\beta$ -actin の発現量に対しての VEGF 発現量の比を取って定量的評価に用いた。

#### ③ 細胞内活性酸素の測定

Dihydroethidium をメディアム内に投与して細胞内の蛍光発光を測定して活性酸素の産生量を定量した。スライドグラス型ディッシュ上に BMEC もしくは AEC をコンフルエント状態になるまで培養して、分子透過性を検討する時に用いたのと同じ濃度の AGE を添加した。8 時間後に Dihydroethidium を濃度が 5 $\mu$ M になる様に添加し、30 分のインキュベートの後に蛍光顕微鏡 CCD カメラで撮影した。画像上の細胞が発する蛍光強度を画像解析ソフトである Image J 1.32J を用いて定量化した。

#### ④free radical scavenger 投与による各反応の抑制についての検討

free radical scavenger である Edaravone をメディアウム内に 20~100 $\mu$ M の濃度で投与して前述の①~③の AGE 投与で見られる血管反応への影響を検討した。

#### (2) 高血糖負荷時の活性酸素産生増加に関わる NADPH オキシダーゼの構成サブユニット NOX4 の発現量についての検討

##### ①高血糖負荷時の活性酸素産生亢進についての検討

Dihydroethidium をメディアウム内に投与して細胞内の蛍光発光を測定して活性酸素の産生量を測定した。スライドグラス型ディッシュ上に BMEC をコンフルエント状態になるまで培養して、300 mg/dl の血糖を負荷し、100 mg/dl の正常血糖状態として活性酸素産の亢進状態について検討した。

##### ②培養血管内皮細胞での NOX 4 mRNA の発現の検討

RT-PCR による NOX4 mRNA 発現の検討を行った。使用したプライマーは Bovine GAPDH: sense5' - CTA CAT GGT CTA CAT GTT CC-3'、anti-sense 5' - TGC TTC ACC TTC TTG AT-3'、Bovine NOX4: sense5' - CTG GCT GGC CAA CGA AGG GG-3'、anti-sense5' - CAG GAG GGT GCG GCA CAT GG-3' である。上記①の条件と同じ高血糖を負荷した後、total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、Access RT-PCR System を用いて PCR 反応を行い、NOX4 mRNA の発現について検討を行った。

##### ③培養血管内皮細胞での NOX 4 蛋白の発現の検討

ウェスタンブロッティングにより NOX4 蛋白発現の検討を行った。上記①の条件と同じ高血糖を負荷した後、蛋白を抽出し、NuPAGE NoVEX プレキャストゲルを用いて電気泳動し、iBlot ゲルトランスファーシステムを用いて膜上に転写した。NOX4 polyclonal 抗体で免疫反応をさせ、ECL ディクジョンキットを用いて膜上でのプロットの検出を行った。

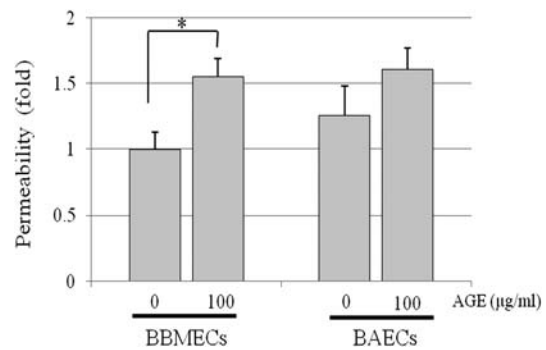
#### 4. 研究成果

##### (1) AGE 負荷時の脳微小血管内細胞の分子透過性と細胞内活性酸素量産生についての検討

##### ①培養血管内皮細胞の分子透過性の検討

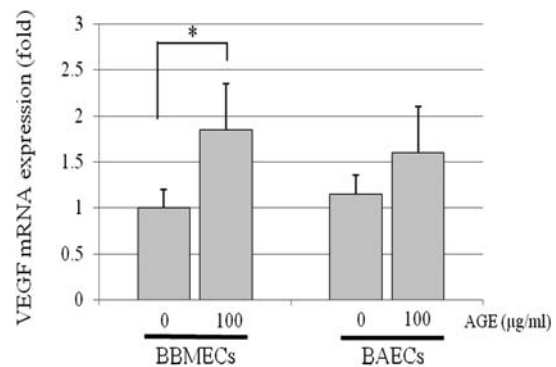
AGE 負荷による分子透過性の影響を検討してみると、BMEC、AEC ともいずれも分子透過性が亢進する傾向にあったが、BMEC の方が AEC より分子透過性亢進の程度が明瞭であり(基礎値の約 1.5 倍)、統計学的にも有意に

亢進していることが明らかとなった。



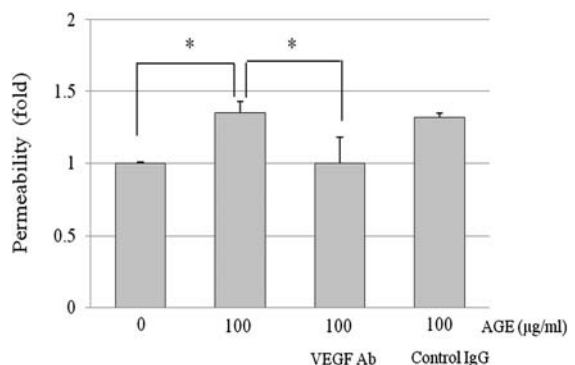
##### ②BMEC と AEC での VEGF 発現の検討

AGE 負荷による VEGF 発現の影響を検討してみると、BMEC、AEC ともいずれも VEGF mRNA の発現が亢進する傾向にあったが、BMEC の方が AEC より発現亢進の程度が明瞭であり(基礎値の約 1.9 倍)、統計学的にも有意に亢進していることが明らかとなった



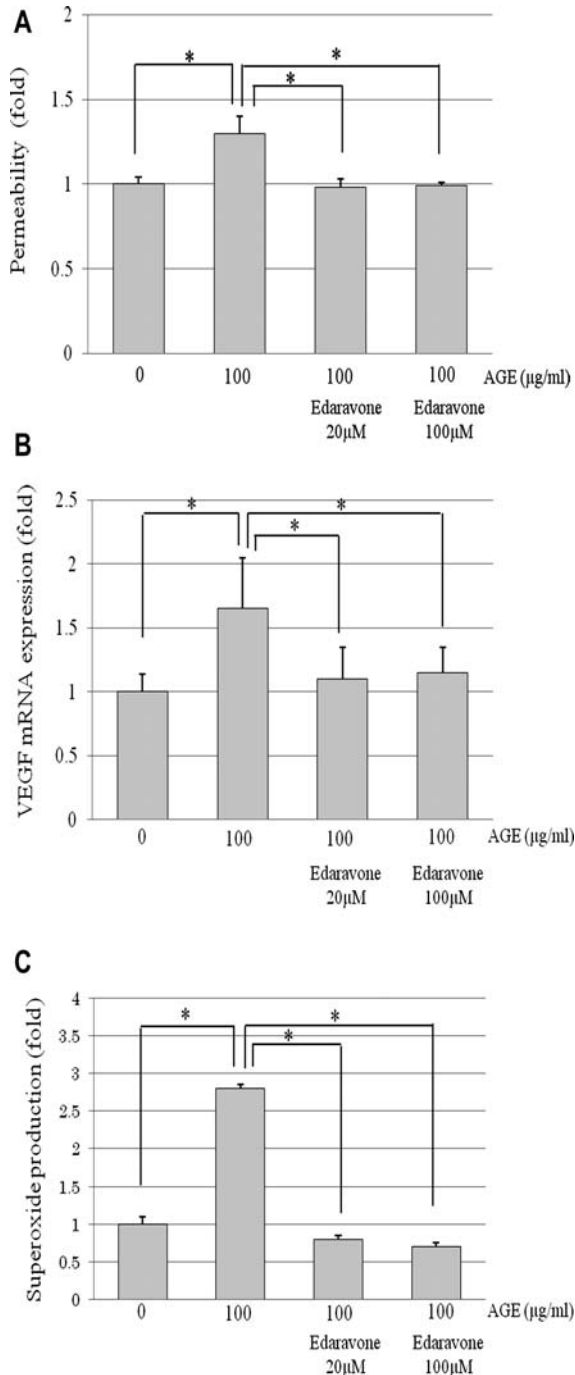
##### ③分子透過性亢進に対する VEGF の関与についての検討

VEGF の中和抗体と用いて分子透過性の亢進状態が抑制されるか検討してみると、統計学的にも有意に分子透過性の亢進が抑制された。コントロール IgG を加えても同様の反応は起こらないことより、VEGF の中和抗体による特異的な反応であることが分かった。このことより、AGE 負荷による分子透過性の亢進は VEGF により生じていると結論付けられた。



**④free radical scavenger 投与による各反応の抑制についての検討**

free radical scavenger として既に脳梗塞治療で臨床応用されている Edaravone を投与して AGE 投与で見らる各種の血管反応への影響を検討した。分子透過性亢進 (図A)、VEGF mRNA 発現 (図B)、活性酸素の産生 (図C) のすべてが統計学的に有意に抑制されていた。このことより、活性酸素産生亢進 → VEGF 発現亢進 → 分子透過性亢進、という一連の反応が生じている事が明らかとなった。



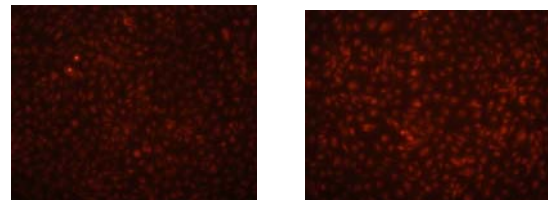
今回の検討から、AGE 負荷による分子透過性の影響は BMEC の方が AEC より明瞭であった。この BMEC の脆弱性には活性酸素産生亢進とそれに続く VEGF 発現亢進が関与していることが明らかとなった。

上記のこの研究成果については 2011 年に英文雑誌 J Stroke Cerebrovasc Dis. に採用され、in press の状態となっている。

**(2) 高血糖負荷時の活性酸素産生増加に関わる NADPH オキシダーゼの構成サブユニット NOX4 の発現量についての検討**

**①高血糖負荷時の活性酸素産生亢進についての検討**

高血糖状態として 300 mg/dl の血糖を負荷し、100 mg/dl の正常血糖状態と比較すると、高血糖状態で DHE 蛍光発光が増大しており、活性酸素産生亢進を認めた。



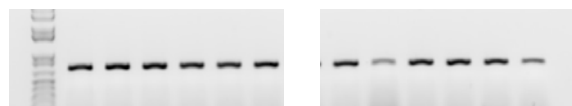
正常血糖状態

高血糖状態

**②培養血管内皮細胞での NOX 4 mRNA の発現の検討**

正常血糖と高血糖を負荷して NOX4 mRNA と内部コントロールの GAPDH mRNA を RT-PCR を用いて比較すると、高血糖負荷後 12 時間、24 時間において、NOX4 mRNA の発現が亢進していた。

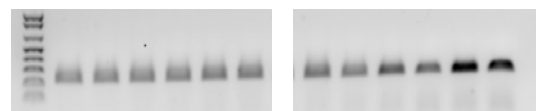
GAPDH mRNA



時間 C 0 3 6 12 24  
正常血糖状態

時間 C 0 3 6 12 24  
高血糖状態

NOX4 mRNA



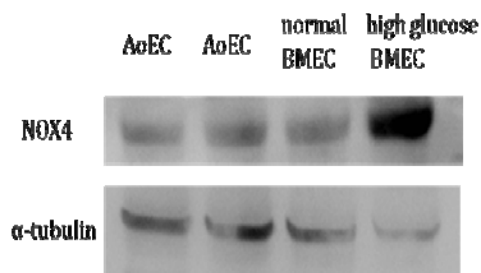
時間 C 0 3 6 12 24  
正常血糖状態

時間 C 0 3 6 12 24  
高血糖状態

**③培養血管内皮細胞での NOX 4 蛋白の発現の検討**

高血糖を負荷して NOX4 蛋白と内部コント

ロール  $\alpha$ -tubulin 蛋白の発現をウエスタンブロッティングを用いて検討した。高血糖負荷後24時間でNOX4 蛋白の発現が亢進していた。



#### ④今後の展望

これらの結果については BMEC と AEC で比較し、再現性を確認して、BMEC でより NOX4 の発現が亢進している状態を明らかにしたいと考えている。さらに、NOX4 の働きを抑える事によって、活性酸素の産生亢進が抑えられるかと検討する。この現象が実験的に証明できれば、活性酸素産生の亢進状態に NOX4 が大きく関連していることを示すことになると考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Niiya Y, Abumiya T, Yamagishi SI, Takino JI, Takeuchi M. Advanced Glycation End Products Increase Permeability of Brain Microvascular Endothelial Cells through Reactive Oxygen Species-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2011 Feb 4

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鑑谷 武雄 (ABUMIYA TAKEO)

北海道大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：80270726

(2)研究分担者

岩崎 喜信 (IWASAKI YOSHINOBU)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：00113522

飛驒 一利 (HIDA KAZUTOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10238305

黒田 敏 (KURODA SATOSHI)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：10301904

(3)連携研究者

なし