

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790178

研究課題名（和文）

プリオン蛋白質による血液脳関門制御の分子機構

研究課題名（英文）

The role of cellular prion protein in blood brain barrier

研究代表者

渡辺 拓也 (WATANABE TAKUYA)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の原因物質の一つとして考えられている amyloid- β (A β) の脳外排出機構における正常型プリオン蛋白 (PrP^C) の役割について検討を行った。脳血管内皮細胞 (MBEC4 cell) の PrP^C と他の A β 輸送分子 (低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1、P-糖蛋白) の発現・機能を調節し、細胞への A β 取り込みを解析した。他の A β 輸送分子の調節は A β 細胞内取り込みに影響したが、PrP^C の調節は A β 細胞内取り込み影響しなかった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to address the role of cellular prion protein (PrP^C) in amyloid-beta (A β) efflux via blood brain barrier. PrP^C knockdown did not affect A β transport although other transporters (low density lipoprotein related protein 1 and P-glycoprotein) changed A β transport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

(1) A β の脳内からの除去には、ネプリライシンやインスリン分解酵素等の A β 分解酵素が有用との報告がある。近年、このような分解除去以外に、脳内の A β を末梢血液中に排出させる新たな除去経路の存在が注目されるようになった。脳と血液の間には脳毛細血管内皮細胞を実体とする血液脳関門 (BBB) が存在し、脳-血液間の物質移行を制限する重要な関門として機能している。低分子の物質は、脳毛細血管内皮細胞の細胞間隙経路や

経細胞透過を介して BBB を容易に通過する。A β のような大きなペプチドは一般的に BBB 透過が困難であるが、A β の脳内からの除去には、A β を経細胞的に輸送する機構が存在する。このトランスサイトシスに関与する輸送分子として、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (LRP1) や P-糖タンパク質 (P-gp) が挙げられる。これらの分子は脳血管内皮細胞膜に存在し、A β を細胞内に取り込む。LRP1 や P-gp は脳側から血液側への排出を担う。従って、LRP1 及び P-gp 発現・

機能の低下は、A β の脳内への蓄積を増加させ、ADの発症・進展の要因となることが推測される。しかし、AD病態下におけるA β 輸送分子の発現・機能の制御異常については不明な点が多い。

(2) 正常型プリオン蛋白 (PrP^C) は、生体の多くの組織に分布し、細胞接着能や抗酸化作用等を有することが判っているが、その生理機能は未だ不明な点が多い。PrP^C は glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) アンカーを有し、細胞膜上の lipid raft に局在する。従って、PrP^C は lipid raft 上の様々な分子と相互作用を現すことが予想される。近年、神経細胞や癌細胞における PrP^C と LRP1 や P-gp との機能的相関を示唆する実験成績が報告された。P-gp や LRP1 は、脳血管内皮細胞にも局在することから、PrP^C が P-gp や LRP1 を介して A β の BBB 透過を制御する可能性は十分に推測できる。また、LRP1 は A β と直接結合しないが、PrP^C の A β 結合能を考えれば、PrP^C を LRP1-A β 連結の介在分子として捉えることができる。そこで、本申請者は次のように仮説した。1) PrP^C は A β と結合し、lipid raft 上で LRP1 によって細胞内へ取り込まれ、A β を脳から排出する。2) PrP^C は P-gp の発現・安定化を誘導し、P-gp による A β 排出を促進する。

2. 研究の目的

本研究は BBB における A β 排出除去機構の PrP^C による制御に着目し、脳血管内皮細胞における PrP^C の生理・病態生理機能を追求するものであり、A β の BBB 透過における PrP^C の調節メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳血管内皮細胞の特徴化

脳血管内皮細胞由来の不死化細胞株は数種類あるため、各細胞株における A β 細胞内取り込み能、A β 輸送分子 (LRP1, P-gp) と PrP^C の発現量を評価し、細胞株の特徴づけを行い本実験に適した細胞株を選別する。評価するマウス脳血管内皮細胞株は MBEC4, bEnd3, bEnd5 cell ならびにマウス初代培養脳血管内皮細胞 (pMBECs) とする。A β 細胞内取り込み能の評価は ¹²⁵I-A β を用いて、放射活性を測定することにより行う。A β 輸送分子と PrP^C の発現量は western blot 法を用いて評価する。

(2) PrP^C 発現抑制細胞における A β 細胞内取り込み能の解析
siRNA を用いて PrP^C 発現を抑制した細胞の A

β 細胞内取り込み能を解析する。また、A β が P-gp ならびに LRP1 によって輸送されているか確認のため、P-gp の阻害剤である verapamil と LRP1 を標的とした siRNA を処置した細胞での A β 取り込み能を評価する。

(3) PrP^C 発現誘導細胞における A β 細胞内取り込み能の解析

PrP^C DNA をコードしたプラスミドをトランスフェクションした後、G418 により遺伝子導入された細胞を選別し、PrP^C 安定発現株を確立する。確立した細胞における A β 細胞内取り込み能の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 脳血管内皮細胞の特徴化

MBEC4 cell は他の細胞と比較して、¹²⁵I-A β 40 ならびに ¹²⁵I-A β 42 の放射活性が最も高く、pMBECs は bEND3, bEND5 cell と比べ両 A β の放射活性が高かったが、有意ではなかった (図 1)。この結果から、MBEC4 は A β 40、A β 42 共に細胞内取り込み能が最も高いことが明らかとなった。

LRP1 発現量は MBEC4 cell で最も多く、MBEC4 以外の細胞間では差は認められなかった (図 2)。P-gp 発現量は pMBECs で最も多く、bEND. 3 cell で最も少なかった (図 3)。また、PrP^C 発現量は pMBECs で最も多く、他の細胞間では差は認められなかった。

MBEC4 cell で A β 細胞内取り込みが有意に認められたので、以後の実験に MBEC4 cell を使用した。

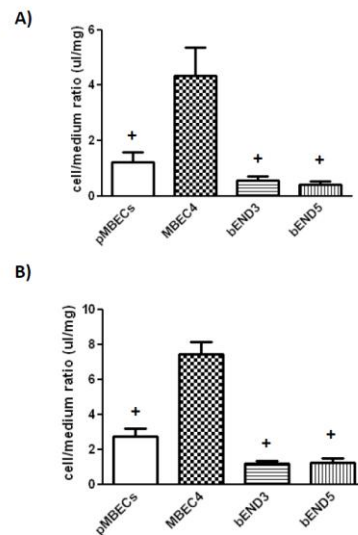


図 1 脳血管内皮細胞株の A β 細胞内取り込み能
A β 40 (A) と A β 42 (B) の各脳血管内皮細胞株における細胞内取り込み。A β 40 と A β 42 とともに MBEC4 cell での取り込み量が最も多かった。+ $P < 0.001$ vs. pMBECs

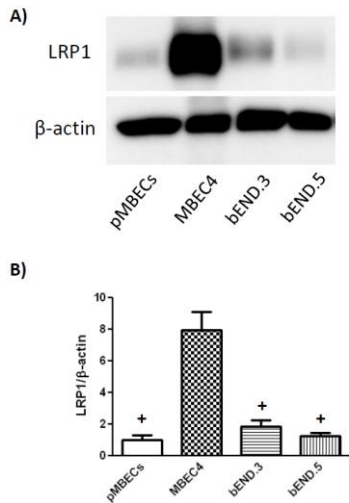


図. 2 脳血管内皮細胞株のLRP1発現量

A)代表的なwestern blot画像。LRP1 (上段) とβ-actin(下段)。B)LRP1の発現量。β-actinをloading controlとして使用した。MBEC4 cellは他の細胞と比較して、LRP1が高発現していた。+ $P < 0.001$ vs. MBEC4

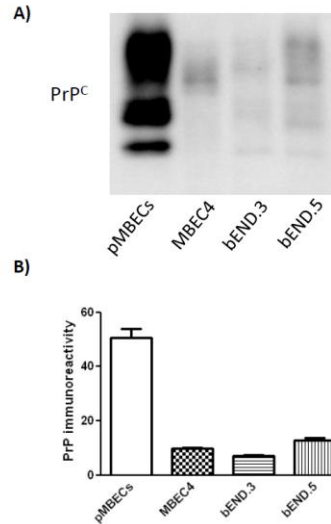


図. 4 脳血管内皮細胞株のPrP^{Sc}発現量

A)代表的なPrP^{Sc}のwestern blot画像。B)PrP^{Sc}発現量。pMBECsは他の細胞と比較して、PrP^{Sc}が高発現していた。 ** $P < 0.01$, + $P < 0.001$ vs. pMBECs

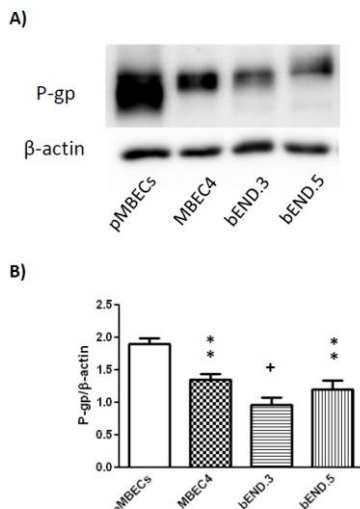


図. 3 脳血管内皮細胞株のP-glycoprotein発現量

A)代表的なwestern blot画像。P-gp (上段) とβ-actin(下段)。B)P-gpの発現量。β-actinをloading controlとして使用した。pMBECsは他の細胞と比較して、P-gpが高発現していた。 ** $P < 0.01$, + $P < 0.001$ vs. pMBECs

(2) PrP^{Sc} 発現抑制細胞における Aβ 細胞内取り込み能の解析

LRP1 を knockdown した MBEC4 cell は、negative control siRNA を処置した細胞と比較して、Aβ 放射活性が低下した (図 5)。Verapamil 処置細胞は、無処置細胞と比較して、Aβ 放射活性が増加した (図 6)。PrP を knockdown した細胞は、negative control siRNA を処置した細胞と比較して、Aβ 放射活性に差は認められなかった (図 7)。

これらの結果から、MBEC4 cell では LRP1 は Aβ 細胞内取り込みに、P-gp は Aβ 外排出に関与することが明らかとなった。また、PrP は Aβ 輸送に関与しないことが示唆された。

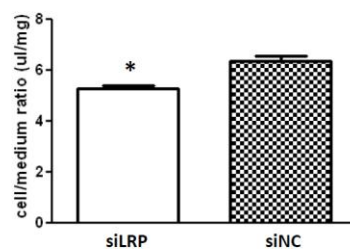


図. 5 LRP1を介したAβ細胞内取り込み (MBEC4 cell)

MBEC4 cellに LRP 標的 siRNA (siLRP, 50nM) と negative control siRNA (siNC, 50nM) をトランスフェクションし、48時間後にAβ 42を30分間取り込ませた。siLRPを処置したMBEC4 cellではAβ細胞内取り込み量が減少した。* $P < 0.05$ vs. siNC

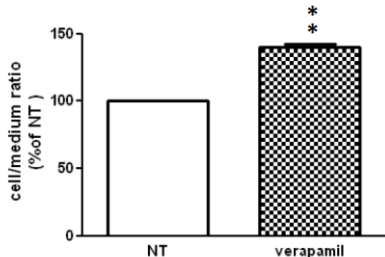


図. 6 P-glycoproteinを介したAβ細胞外排出 (MBEC4 cell)

MBEC4 cellにverapamil(100 μM)とAβ42を共処置し、60分後にAβ細胞内存在量を測定した。VerapamilはAβ42の細胞内存在量を増加させた。
**P < 0.01 vs. NT (non-treatment)

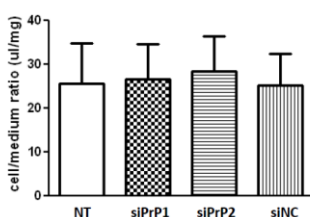


図. 7 PrPをknockdownした時のAβ細胞内取り込み量 (MBEC4 cell)

MBEC4 cellにPrP標的siRNA(siPrP1,2, 50nM)とnegative control siRNA (siNC, 50nM)をトランスフェクションし、48時間後にAβ42を60分間取り込ませた。siPrPを処置したMBEC4 cellではAβ細胞内取り込み量に変化は認められなかった。

(3) PrPC発現誘導細胞におけるAβ細胞内取り込み能の解析

PrPを過剰発現するMBEC4 cellを確立した(図8)。現在、Aβ細胞内取り込み能を解析中である。

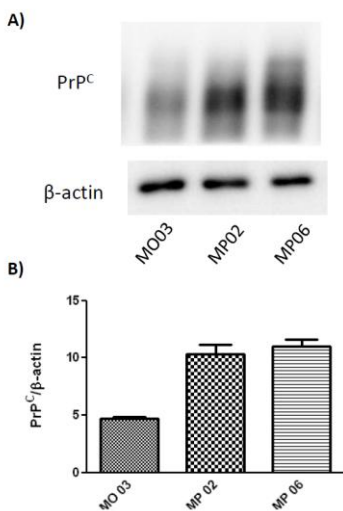


図. 8 PrPC過剰発現MBEC4 cell

A)代表的なwestern blot画像。PrPC(上段)とβ-actin(下段)。B)PrPCの発現量。PrPC過剰発現株(MP02, MP06)とmock細胞(MO03)。β-actinをloading controlとして使用した。

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) Watanabe T, Yasutaka Y, Nishioku T, Kusakabe S, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Involvement of the cellular prion protein in the migration of brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett.* 査読有, 496, 2011, 121-4.

[学会発表] (計1件)

- 1) 大平 信太郎、渡辺 拓也、平賀 千絵、道具 伸也、山内 淳史、片岡 泰文、脳血管内皮細胞のβ-amyloid排泄機構における炎症性サイトカインの役割 日本薬理学会西南部会 2011年11月20日 福岡 KKRホテル博多

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 拓也 (WATANABE TAKUYA)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90509647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：