

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15761

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた血液脳関門モデルによる意識障害関連物質の探索

研究課題名(英文) Explanatory research of consciousness related substances in iPS cell-derived brain microvascular endothelial cell models

研究代表者

嶋津 岳士 (Shimazu, Takeshi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50196474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：重症患者の意識障害の原因物質を探索するためにヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS cell)を用いたin vitro 血液脳関門モデルでの研究を行った。このモデルでバリア機能の変化を観察したところ、HMGB1、IL-6等では変化がなかったが、TNF- $\alpha$ での脳血液関門モデルの抵抗値の低下が認められた。ヒト血清を用いた研究では、心停止後症候群、熱中症のいずれにおいてもサイトカインやTNF- $\alpha$ の上昇とともに血液脳関門モデルの抵抗値の低下が認められた。以上より、侵襲の直接作用だけでなく、侵襲後の血中因子が血液脳関門に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症患者の意識障害は、頭部外傷のみならず重症感染症、熱中症、心停止、重症肝不全等の様々な疾患で発生する。遷延する意識障害は病態の悪化とも関連するため、その病態の解明は非常に重要である。血液脳関門の破綻が意識障害の共通の要因と考え、血液脳関門モデルに侵襲後の動物モデルや重症患者の血清を用いたところ、血液脳関門のバリア機能を低下させることが判明した。侵襲の直接作用のみの要因であれば受傷前の予防は困難であるが、血清因子が要因のひとつであれば、受傷後の治療が可能であり、将来への重症病態への治療につながる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Explanatory research of consciousness related substances in iPS cell-derived brain microvascular endothelial cell models were performed to look for causal substances of critically ill patients. We observed barrier function under trauma, sepsis, heat stroke injuries by this blood brain barrier (BBB) model. There were no significant changes under HMGB1 or IL-6, but there was significant decreased under TNF- $\alpha$ . In human serum research, the resistance in BBB model were decreased under serum of cardiac arrest and heat stroke. These results suggested that some substances could be associated with changes of permeability in BBB model.

研究分野：救急医学

キーワード：血液脳関門 iPS 意識障害 敗血症 熱中症 頭部外傷 心停止 バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

重症患者の意識障害の原因は多岐に分かれる。重症感染症では、septic encephalopathy と呼ばれセプシスにより血液脳関門が変化することが知られている。外傷では、当教室で MMP-9 が頭部外傷後の急性脳腫脹に関連することを報告している(1)。熱中症では重症度が 度になると意識障害があり、臓器障害の発生頻度が高くなることが知られている。詳細な原因物質は特定されていないが DAMPS (damage-associated molecular proteins) の関与が指摘されている(2)。重症肝不全では、意識障害のマーカーとして血中アンモニア、治療として分岐鎖アミノ酸輸液などが使われる。当教室ではグルタミン酸やメチオニンが予後と関連することを報告しているが、原因物質や脳内への機序等については解明されていない(3)。心停止等の低酸素を原因とした意識障害だけでなく、数日後に不可逆的な脳腫脹が発生することあるがその機序や関連物質については不明である。動物実験ではグロブリンや C5b の有用性が報告されているが、臨床での評価は困難であり、脳血液関門に及ぼす影響について診断・治療方法の進展が望まれている。

血液脳関門は、毛細血管の内皮細胞同士がタイトジャンクションによって接着し形成されている。この構成タンパク質には、ZO-1 (zonula occludens-1), Claudin-5, Occludin などがある。内皮細胞の外側には周辺細胞 (pericyte) 細胞外マトリクス蛋白を含む基底膜、アストロサイト等で構成されている。

以前より動物やヒト細胞による *in vitro* 研究が行われてきた。虚血によって、タイトジャンクションにある Occludin、Claudin-5 の消失や細胞外マトリクスがプロテアーゼである MMP-9 によって分解されインテグリン受容体を介した内皮細胞と細胞外マトリクスとの接着が失われる。その結果、再灌流を起こすと血液成分が脳実質に漏出し出血性脳梗塞や脳浮腫の進行になると考えられている。

近年、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell) を用いた *in vitro* の血液脳関門モデルが作成されている(4)。このモデルはヒト細胞から成るため、既存の動物モデルと比較し動物間種差の問題がなく、血液脳関門の機能解析の進展が期待されている。

本研究では、このヒト iPS 細胞を利用した血液脳関門モデルを用いて保存血清による血液脳関門の透過性の変化を評価し、血液脳関門の変化に関与する物質の探索を行う。

- 1) Hirose T, et al: Neurologia medico-chirurgica 53:609,2013.
- 2) Tong HS, et al: The Journal of trauma 71:808,2011.
- 3) Hirose T, et al: Clinical nutrition 33:179,2014.
- 4) Minami H, et al: PloS one 10:e0128890,2015.

## 2. 研究の目的

重症患者の血清を用いて血液脳関門の透過性の変化を評価し、関連物質の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究の種類・デザイン

後ろ向き観察研究、割付や治療介入なし

### (2) 観察および検査項目とその実施方法

#### iPS細胞

血液脳関門モデルは iPS 細胞を用いて共同研究者の川端らが作製する。

#### 血液脳関門のバリア機能評価

経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance:TEER)

*in vitro*での血液脳関門モデルの電気抵抗値を測定して透過性の変化を観察する。

以下の項目について、被験者の診療録から情報を入手する。

- 1．患者基本情報：年齢、性別、身長、体重、体温、転帰等
  - 2．疾患情報：既往歴、疾患名、治療内容、意識障害の有無等
  - 3．血液検査結果：生化学検査、血液・電解質、凝固線溶系、血液ガス所見等
  - 4．画像検査所見：CT、MRI、各種エコー、単純X線写真等
- 血液脳関門に関する物質の定量検査を保存検体を用いて行う

### (3) 評価項目

#### 主要評価項目

経内皮電気抵抗

#### 副次的評価項目

- ・物質透過性の評価
- ・タイトジャンクション関連遺伝子の発現評価
- ・保存検体の関連因子の測定

## 4．研究成果

iPS 細胞由来の脳血管内皮細胞を用いて、意識障害をきたす病態を脳血液関門の観点から 4 つの病態に分けて検討した。

### (1) 外傷

若年層の主要な死因である頭部外傷についての治療法は、未だ確立されていない。そこで脳虚血時の二次的損傷に関与する HMGB1 に着目した。iPS 細胞由来脳血管内皮細胞に外因性のシグナルである damage-associated molecular pattern molecules のひとつである HMGB1 を作用させ、24 時間後に膜間電気抵抗値の測定を行ったところ、HMGB1 を作用させても膜間電気抵抗値には顕著な差は観察されなかった。以上の結果から、HMGB1 は脳血管内皮細胞のバリア機能には影響を及ぼさないことが示唆された。

### (2) 敗血症

敗血症は、細菌による感染を発端として、細菌由来の毒素が全身に広がり、多臓器不全、血圧低下、ショックなどの症状を惹起する重篤な全身疾患である。特に、大腸菌をはじめとするグラム陰性菌の成分である LPS は、敗血性ショックを引き起こす原因となっている。

iPS 細胞由来脳血管内皮細胞に LPS 及び IL-6 や LPS を作用させ、24 時間後に膜間電気抵抗値の測定を行ったところ、顕著な差は観察されなかった。以上の結果から、LPS や IL-6 は脳血管内皮細胞のバリア機能を低下させないことが示された。

### (3) 体温異常(熱中症)。

熱中症患者は、ヒートアイランド現象や独居老人の増加などの要因により、年々増加しており社会問題化している。これまでに、ラットモデルを用いた検討により、体温異常(高温)によって脳の血管透過性が亢進することが報告されているが、高温が脳血管内皮細胞に及ぼす影響は明らかになっていない。

iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を 42 度条件下で 3 時間培養した結果、膜間電気抵抗値の上昇が観察された。一方、42 度条件下で 12 時間培養した場合、37 度で培養した群と比較して、膜間電気抵抗値の有意な低下が観察された。NaF を用いて透過性試験を行った結果、42 度で 3 時間培養した群では、透過性の抑制が、12 時間培養した群では、透過性の亢進がそれぞれ観察された。以上の結果から、短時間の高温(42 度)は、バリア機能の増強に働き、長時間の高温は

バリア機能の破綻を引き起こすことが示された。(日本薬学会第 137 年会発表)

マウスの熱中症モデルを用いた研究では、脳血液関門のバリア機能にかかわるタンパク質である Claudin-5 の発現が低下していた。また熱中症の血清は、脳血液関門モデルの抵抗を有意に低下させたことから、熱中症では熱による直接作用のみならず、血清成分による間接的な作用が要因として示唆された。

実際の熱中症患者の血清を用いても血液脳関門の透過性が亢進したことから、侵襲後産生される血中因子が 2 次的に血液脳関門への影響をもたらす可能性がある。

#### (4) 環境異常(低酸素)

脳梗塞を含む低酸素血症は塞栓によって血流が遮断されることによって引き起こされる疾患である。以前の研究では、低酸素血症で iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を培養するとバリア機能が著しく減弱している。虚血条件後、再び酸素及びグルコース存在下で培養する再灌流条件時に TNF- $\alpha$  を作用させたところ、バリア機能の回復が妨げられている。(Biochem Biophys Res Commun. 2: 577. 2017)

実際の心停止後症候群の血清により血液脳関門の透過性が亢進した。また、血清中の TNF- $\alpha$  の上昇も認めため、血液脳関門との関連が示唆された。(第 46 回日本救急医学会総会・学術集会発表)

以上より、動物モデルおよび臨床での血清を用いた研究から、血中因子が血液脳関門モデルの透過性に関与していることが示唆された。直接作用に対する予防は困難であるが、侵襲後の血液脳関門にかかわる血清因子を抽出し制御することによって治療への可能性へとつなげていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 清水 健太郎、小倉 裕司、嶋津 岳士、川端 健二、山口 朋子. iPS 細胞由来脳血管内皮細胞を用いた血液脳関門バリア機能の評価、第 46 回日本救急医学会総会・学術集会、2018 年 11 月
2. 山口朋子、國分康博、西島美妙江、清水健太郎、小倉裕司、川端健二. ヒト iPS 細胞由来脳毛細血管内皮細胞を利用した in vitro 熱中症モデルの構築、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月
3. 川端健二. iPS 細胞から血液脳関門モデルをつくる - 意識障害の謎に挑む、第 45 回日本救急医学会総会・学術総会、2017 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：森 宣人  
ローマ字氏名：(NOBUTO, Mori)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：医員  
研究者番号（8 桁）：00747149

研究分担者氏名：梅村 穰  
ローマ字氏名：(YUTAKA, Umemura)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：医員  
研究者番号（8 桁）：20743561

研究分担者氏名：川端 健二  
ローマ字氏名：(KENJI, Kawabata)  
所属研究機関名：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
部局名： 医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト  
職名：プロジェクトリーダー  
研究者番号（8 桁）：50356234

研究分担者氏名：清水 健太郎  
ローマ字氏名：(KENTARO, Shimizu)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：助教  
研究者番号（8 桁）：60379203

研究分担者氏名：小倉 裕司  
ローマ字氏名：(HIROSHI, Ogura)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8 桁）：70301265

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。