

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590992
 研究課題名（和文） 脳血管ペリサイトのストレス応答における細胞内情報伝達機構に関する研究
 研究課題名（英文） Signal transduction systems in response to environmental stress in CNS pericytes.
 研究代表者
 鴨打 正浩（KAMOUCHI MASAHIRO）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：80346783

研究成果の概要：

（具体的内容）脳血管ペリサイトは血管新生、血液脳関門、微小循環調節に重要な役割を果たしている。本研究は、脳血管ペリサイトにおいて細胞外環境の変化が惹起する細胞応答、細胞機能について検討した。

脳血管ペリサイトにおいて、細胞外のアシドーシスは、Na/H exchanger 1 (NHE1) を逆回転モードとして活性化し、細胞内 Ca 貯蔵部位より Ca を周期的に放出させる (Ca oscillation)。PDGF-B は PDGFR- α を介して、PLC をリン酸化し Ca oscillation を惹起する。PDGF-B は、Ca 依存性転写因子である CREB (cAMP response element binding protein) をリン酸化し、細胞内シグナルの調節を行っている。また、Ca oscillation は Ca 依存性転写因子である nuclear factor of activated T cells (NFAT) の核内移行を促進し、核内に移行した NFAT が種々の遺伝子の転写を制御している。NFAT を介したサイトカインの分泌調節は細胞増殖を制御している。脳血管ペリサイトには、活性酸素生成酵素である NAD(P)H (Nox) 4 が発現し、活性酸素を生成し細胞増殖を制御している。angiotensin II は Nox4 の発現を増加させ、活性酸素の生成を増加させる。過度の酸化ストレスは細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 放出を起こす。酸化ストレスは NHE、NCX、ASIC、ENaC 以外の amiloride 感受性蛋白の SH 基の酸化を介して、細胞内 Ca 上昇を引き起こす。

（意義、重要性）脳毛細血管の成熟、血管新生には脳血管ペリサイトの存在が不可欠である。また、神経再生に必須な niche (微小環境) の重要な構成細胞と考えられる。近年、神経活動に応じた血流の制御も行っていることや、脳血管ペリサイトには間葉系幹細胞に類似した多能性多能性を有していることも示唆されている。本研究は、脳血管ペリサイトにおけるシグナル伝達機構を明らかにした。本研究の成果は、脳血管ペリサイトの制御を介した、新規の中樞神経疾患治療法の開発に寄与すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態薬理学

1. 研究開始当初の背景

周皮細胞（ペリサイト）は、毛細血管、細動脈、細静脈において、内皮細胞を取り囲むように存在し、基底膜を貫いて内皮細胞と接触している。脳、網膜など神経組織においてペリサイトは最も密に存在し、微小循環調節のみならず、血管新生、脳血液関門(BBB)の形成に不可欠であることが近年の研究から明らかになってきた。脳血管ペリサイトは以下のような機序を介して、血管新生、脳血液関門の形成に関わっていると考えられている。

【血管新生】VEGFなどの血管新生因子が内皮細胞を活性化すると内皮細胞は蛋白分解酵素を分泌し、基底膜を破壊し細胞外基質へと遊走し増殖する。やがて、内皮細胞は管腔を形成しPDGF-Bを分泌することにより、その受容体であるPDGFR- を発現する骨髄由来のペリサイト前駆細胞をリクルートしペリサイトへと分化させる。ペリサイトは、内皮細胞を取り囲み基底膜を形成するとともに、内皮細胞の増殖を抑制する。PDGF-BあるいはPDGFR- を欠損させたマウスでは、脳内毛細血管においてペリサイトが脱落し、微小血管瘤を形成し脳出血により胎生致死となる。また、内皮細胞とペリサイトは、PDGF-B/PDGFR-、TGF-、angiopoietin/Tie2、S1P/S1P₁を介して相互に作用し、この相互作用が血管の新生には不可欠であることが明らかとなっている。

【脳血液関門】脳血管ペリサイトは内皮細胞のtight junction構成蛋白であるoccludinの発現を調節し、actinの構築を変化させ脳血液関門を制御している。ペリサイトが脱落すると脳血管透過性が亢進する。

また、近年脳血管ペリサイトが神経活動時、あるいは虚血時の微小循環の調節に重要な役割を果たしていることが示された。しかしながら、いまだその詳細な機序は明らかでなく、どのような細胞内情報伝達機構を介して細胞応答が起こっているかについても分かっていない。

2. 研究の目的

外的ストレス刺激、低酸素、アシドーシス、酸化ストレス、成長因子、angiotensinが、細胞増殖、細胞死に及ぼす影響を検討する。特にCaシグナルに注目し、細胞内情報伝達機構との関連を検討する。

3. 研究の方法

培養ヒト脳血管ペリサイトを用いて、種々の刺激を加え、発現するmRNA、蛋白、細胞内Ca濃度変化、活性酸素生成量を検討した。発現する蛋白をRNA干渉法を用いて抑制し、その作用を確認した。

(1) 細胞培養：ヒト脳微小血管ペリサイト継代培養(3-10世代)

(2) 細胞内Ca測定法：fura-2(2 μ M)、励起波長340/380 nm・蛍光510nm

(3) 細胞内pH測定法：BCECF(1 μ M)、励起波長450/490 nm・蛍光510nm

(4) RT-PCR法

(5) real-time PCR法

(6) Western blotting

(7) 活性酸素生成

蛍光測定法：dihydroethidium、励起波長490 nm・蛍光610nm

化学発光法：lucigenin、DIOGENES、活性酸素産生量測定

(8) 細胞増殖：細胞数測定

(9) RNA干渉：siRNAをelectroporation(電気穿孔法)により培養細胞内に導入、mRNA発現抑制

4. 研究成果

(1) 脳血管ペリサイトにはNAD(P)H oxidase(Nox)4、Nox5が発現し、Nox4が主たる活性酸素生成源である。また、RA系の全てのコンポーネントが発現しており、angiotensin II刺激によりNox4の発現増加と、それに伴う活性酸素の生成増加が起こる。

(2) 脳血管ペリサイトの細胞形質膜には、Na/Ca exchanger(NCX)1、transient receptor potential(TRP)C1/4/6、TRPM1/4/7、acid sensing ion channel(ASIC)1aが発現し、Ca流入調節を行っている。

(3) 脳血管ペリサイトの形質膜にNa/H exchanger(NHE)1が発現し、NHE1が細胞内pHおよびNa濃度調節を行っている。細胞外アシドーシスに应答して、NHE1が逆回転モードとなり、細胞内Ca貯蔵部位からのCa放出とCa oscillationを誘発する(Nakamura K et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008)。

(4) 脳血管ペリサイトの細胞増殖にはbFGFが必要である。低酸素下でHif-1の分解が抑制され、Hif-1の蛋白量が増加する。また、低酸素下では、Nox4、VEGFの発現が増加する。target of rapamycin(mTOR)が発現しており、低酸素時の細胞応答を制御している。

(5) 脳血管ペリサイトにおいてCa oscillationは、calcineurinを活性化し、NFATc3の脱リン酸化を介して、NFATc3を核内に移行させる。Ca oscillationは細胞周期、細胞増殖を制御している。NHE1およびNox4をRNAiで発現抑制すると細胞の増殖が抑制される。

(6) 脳血管ペリサイトにおいて過酸化水素は細胞内Ca貯蔵部位よりCa放出を起こす(Kamouchi M et al. Neurosci Lett 2007)。

酸化ストレスは、amiloride 感受性蛋白における thiol 基の酸化を介して、細胞内 Ca 貯蔵部位から Ca 放出を起こす。(Nakamura K et al. Microvasc Res 2009)

(7) 脳血管ペリサイトにおいて、PDGF-B は、形質膜に発現する PDGFR- に結合し PLC のリン酸化を起こし、IP₃を介して細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 放出、Ca oscillation を惹起する。

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 10 件)

1. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Shono Y, Hagiwara N, Ago T, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Amiloride inhibits hydrogen peroxide-induced Ca²⁺ responses in human CNS pericytes. Microvasc Res. in press

2. Kumai Y, Ooboshi H, Ago T, Ishikawa E, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M. Protective effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure. Exp Neurol 210:441-448, 2008

3. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Matsuo R, Hagiwara N, Ishikawa E, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Role of NHE1 in calcium signaling and cell proliferation in human CNS pericytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H1700-1707, 2008

4. Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, Kuroda J, Ago T, Hata J, Ninomiya T, Ooboshi H, Kumai Y, Yoshimura S, Tamaki K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Kubo M, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M. Polymorphisms in the lymphotoxin alpha gene and the risk of ischemic stroke in the Japanese population. The Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama Study. Cerebrovasc Dis 25:417-422, 2008

5. Hagiwara N, Kitazono T, Kamouchi M, Kuroda J, Ago T, Hata J, Ninomiya T, Ooboshi H, Kumai Y, Yoshimura S, Tamaki K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Kubo M, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi

S, Iida M; Fukuoka Stroke Registry; Hisayama study. Polymorphism in the sorbin and SH3-domain-containing-1 (SORBS1) gene and the risk of brain infarction in the Japanese population: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. Eur J Neurol 15: 481-486, 2008

6. Kumai Y, Ooboshi H, Ago T, Ishikawa E, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M: Protective effects of angiotensin II Type 1 receptor blocker on cerebral circulation independent of blood pressure. Exp Neurol. 2007 Dec 7; [Epub ahead of print]

7. Kuroda J, Kitazono T, Ago T, Ninomiya T, Ooboshi H, Kamouchi M, Kumai Y, Hagiwara N, Yoshimura S, Tamaki K, Kusuda K, Fujii K, Nagao T, Okada Y, Toyoda K, Nakane H, Sugimori H, Yamashita Y, Wakugawa Y, Asano K, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Ibayashi S, Iida M.: NAD(P)H oxidase p22phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. Eur J Neurol. 2007;14(10):1091-7.

8. Kamouchi M, Kitazono T, Ago T, Wakisaka M, Kuroda J, Nakamura K, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M: Hydrogen peroxide-induced Ca²⁺ responses in CNS pericytes. Neurosci Lett 2007; 416(1): 12-16.

9. Ota K, Kitazono T, Ooboshi H, Kamouchi M, Katafuchi T, Aou S, Yamashita Y, Ibayashi S, Iida M: Role of substantia innominata in cerebral blood flow autoregulation. Brain Res 2007; 1135(1): 146-153.

10. Kumai Y, Ooboshi H, Ibayashi S, Ishikawa E, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, Iida M: Postischemic gene transfer of soluble Flt-1 protects against brain ischemia with marked attenuation of blood-brain barrier permeability. J Cereb Blood Flow Metab 2007; 27:1152-1160.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Matsuo R, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Expression of NHE1 and cell proliferation in human CNS pericytes. Asian Stroke Forum 2007/9/27 Kyoto

2. Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Nakamura K, Shono Y, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Mechanisms of oxidative stress-induced calcium signaling in human CNS pericytes. Brain 07 2007/5/21 Osaka

3. Nakamura K, Kamouchi M, Kitazono T, Kuroda J, Matsuo R, Hagiwara N, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Role of NHE1 in Ca²⁺ oscillation and cell proliferation in human CNS pericytes. Brain 07 2007/5/23 Osaka

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鴨打 正浩 (KAMOUCHI MASAHIRO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80346783

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

北園 孝成 (KITAZONO TAKANARI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70284487

黒田 淳哉

松尾 龍

中村 晋之