

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790199
研究課題名 (和文) 肥満病態におけるアディポサイトカインによる血液脳関門機能の制御機構
研究課題名 (英文) Regulation of the function of blood-brain barrier by adipocytokine in obesity

研究代表者
山内 淳史 (YAMAUCHI ATSUSHI)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：90341453

研究成果の概要：近年肥満病態で注目されている血中アディポサイトカインの血液脳関門 (BBB) 機能に及ぼす影響は不明である。本研究では、アディポサイトカインによる BBB 機能制御機構を追求することを目的とし、BBB 構成細胞のペリサイトに着目して検討した。アディポネクチンの BBB 機能に対する作用はなかったが、攻撃因子として一酸化窒素、オンコスタチン M、防御因子として TGF- β を抽出することができた。また BBB の病変化の過程にはペリサイトの機能低下が関与していることが判った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：薬理学、医療薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：肥満、血液脳関門、アディポサイトカイン、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

中枢神経作用薬の効果あるいは末梢作用薬の中枢毒性を予測する上で、血液脳関門 (BBB) の透過性を評価することは必須である。研究代表者はこれまでに、BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトを共培養した新規の *in vitro* BBB 再構築モデル (BBB Kit) を用いて、免疫抑制薬の中枢毒性発現機構の解明を行った。また、虚血あるいは更年期などの BBB 病態モデルを作製して機能評価を行った。その結果、

薬物 BBB 透過性評価のためには、BBB 構成細胞の協調作用および病態下の BBB 機能解析が必要であることが判った。

平成 17 年、肥満およびインスリン抵抗性を基盤病態とするメタボリックシンドローム (MS) の診断基準が本邦で発表された。平成 16 年の厚生労働省の国民健康・栄養調査では、40 歳以上の男性の 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人が MS に該当すると報告された。すなわち、薬物治療患者の一般的な病態として肥満を捉えることができる。抗生物質、

NSAIDs、H2 ブロッカー、抗ヒスタミン薬など使用頻度の高い薬物には中枢性副作用を惹起するものがある。BBB 透過が中枢毒性発現の引き金であると考えらるならば、肥満時の BBB 機能解析が中枢性副作用の予測・回避策を構築する鍵となる。そこで、肥満時 BBB 病態の解明を目的とし、アディポサイトカインによる BBB 機能制御機構を追求することを計画した。

2. 研究の目的

アディポサイトカインは肥満時に肥大化した脂肪細胞から分泌される液性因子の総称であり、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病などの代謝異常に重要な役割を担っている。最近、MS の背景には、炎症性アディポサイトカイン (MCP-1、TNF- α 、遊離脂肪酸など) による全身組織の軽度炎症性変化があるとの仮説が提唱され注目を集めている。

そこで研究代表者は、肥満時の BBB 機能について次の仮説を立案した。

- ・肥満時に分泌される炎症性アディポサイトカインにより BBB 機能は低下する。
- ・アディポネクチンは、炎症性アディポサイトカインの分泌低下作用により BBB を保護する。
- ・アディポネクチンは、AMPK 活性化により BBB 機能の直接的な亢進作用を現わす。

本研究では、BBB Kit を用いて、これらの仮説を検証・再構築し、アディポサイトカインによる BBB 機能制御機構に迫る。

3. 研究の方法

(1) BBB Kit の作製

BBB 構成細胞 (脳血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイト) の初代培養により再構築した。脳血管内皮細胞およびペリサイトは 3 週齢 Wistar ラットの全脳を摘出し、硬膜、くも膜剥離後、Deoxyribonuclease/Collagenase-Dispase による酵素処理を行った。Percoll 密度勾配で遠心分離を行い内皮細胞・ペリサイト層を採取した。脳血管内皮細胞は puromycin 添加培地 (20% PDS・DMEM 培地)、ペリサイトは 20% PDS・DMEM 培地にて維持した。アストロサイトは 2 日齢ラットの全脳を摘出し、膜を剥離後 Shaking Method により採取し、10%FBS 添加 DMEM 培地にて維持した。BBB Kit は Transwell (Costar) システムを用いて、メンブレン上部に脳血管内皮細胞、下部にペリサイト、ウェルの底部にアストロサイトを播種し共培養を開始した (図 1)。

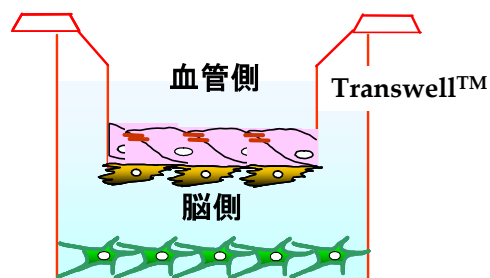


図 1 BBB Kit

(2) 炎症性アディポサイトカインおよび炎症誘発因子による BBB 病態化機序と脳ペリサイトの役割

BBB Kit の血管側に炎症性アディポサイトカイン (TNF- α など) および炎症誘発因子 (オンコスタチン M、LPS など) を任意の濃度で添加し一定時間後、経内皮抵抗 (TEER) を測定して密着結合能をコントロール群と比較した。同様に処理を行い、ナトリウムフルオレセイン (Na-F: 細胞間隙経路評価) およびエバンスブルーアルブミン (EBA: 細胞内経路評価) を血管側に添加後、脳側への移行量を経時的に測定した。透過係数を算出し密着結合能を評価した。さらに血管内皮細胞の密着結合タンパク質 (Occludin、Claudin-5、ZO-1) および各種トランスポーターの発現を、特異的抗体を用いて免疫染色およびウェスタンブロット法にて検出し、炎症性アディポサイトカイン処理の影響を調べた。以上の実験を、脳血管内皮細胞単層培養系および内皮細胞+アストロサイト、内皮細胞+ペリサイトの共培養系において行い、比較検討した。

(3) アディポネクチンの BBB 機能促進作用と脳ペリサイトの役割

上述 (2) と同様に、BBB Kit の血管側に炎症性アディポネクチンを任意の濃度で添加し、各種項目を測定、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症性アディポサイトカインである TNF- α は BBB 機能を低下させた。TNF- α は肥満病態で脂肪細胞より分泌されるが、本研究では脳ペリサイトからの分泌が確認された。ペリサイトからの分泌は細胞外 ATP により調節されており、ATP 枯渇 (Apyrase 処理) が TNF- α 産生を惹起し、さらに MMP-9 産生増加を誘導して BBB 機能低下を起こすことが示唆された (図 2)。

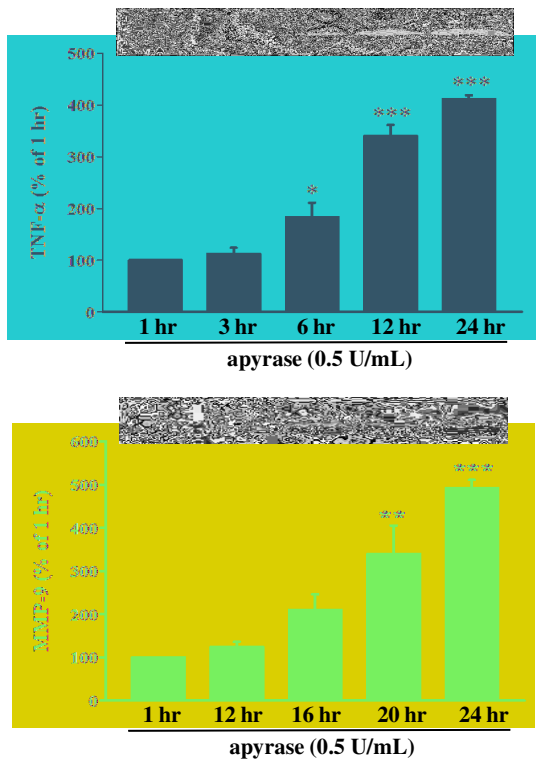


図2 ATP 枯渇によるペリサイトからの TNF- α (上) および MMP-9 の産生 (下)

(2) BBB 機能低下因子として一酸化窒素 (NO) の重要性が示唆された。すなわち、病態時、脳血管内皮細胞およびアストロサイトより産生される NO により BBB 機能が障害された。

(3) 一方、BBB 機能保護作用を有する因子として TGF- β の役割を明らかにした。脳ペリサイトから産生される TGF- β は脳血管内皮細胞に作用し、BBB バリア機能を亢進させていることが判った。

(4) 炎症性刺激 (LPS) による BBB 機能低下時には、基底膜からのペリサイトの脱落が認められた(図 3)。

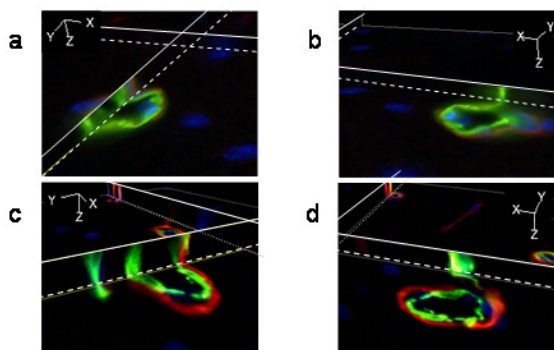


図3 LPS により BBB 基底膜 (赤) からペリサイト (緑) が脱落した (c,d)。

(4) ペリサイトの脳微小血管調節機能において、アドレノメデュリンは弛緩因子の1つであり、それはミオシン軽鎖のリン酸化を介していることが判った。

(5) 炎症性サイトカインであるオンコスタチンMは、BBB 機能を低下させることが判った。

(6) アディポネクチンの BBB 機能促進作用は認められなかった。またペリサイトへの作用も観察されなかった。

以上、善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの BBB 機能促進作用は確認できなかったが、炎症性サイトカイン類および炎症誘発因子の BBB 機能低下作用およびその機序の一部を明らかにした。特に本研究では BBB 機能制御における脳ペリサイトの正負の役割に関する実験証拠を、初めて提示した点で意義深いものである。

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6件)

1. Detachment of Brain Pericytes from the Basal Lamina is involved in Disruption of the Blood-Brain Barrier Caused by Lipopolysaccharide-Induced Sepsis in Mice. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y. Cell Mol Neurobiol. in press [Epub ahead of print] 査読有
2. Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway. Takata F, Dohgu S, Nishioku T, Takahashi H, Harada E, Makino I, Nakashima M, Yamauchi A, Kataoka Y. Neurosci Lett. 2009 Jan 2;449(1):71-5. 査読有
3. Oncostatin M induces functional and structural impairment of blood-brain barriers comprised of rat brain capillary endothelial cells. Takata F, Sumi N, Nishioku T, Harada E, Wakigawa T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. Neurosci Lett. 2008 Aug 22;441(2):163-6. 査読有

4. Adverse effect of cyclosporin A on barrier functions of cerebral microvascular endothelial cells after hypoxia-reoxygenation damage in vitro. Dohgu S, Nishioku T, Sumi N, Takata F, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y. Cell Mol Neurobiol. 2007 Nov;27(7):889-99. 査読有

5. An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y. Cell Mol Neurobiol. 2007 May;27(3):263-70. 査読有

6. Inhibition of transforming growth factor-beta production in brain pericytes contributes to cyclosporin A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y. Cell Mol Neurobiol. 2007 May;27(3):317-28. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 淳史 (YAMAUCHI ATSUSHI)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90341453

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者