

平成 21年 5月 27日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790610

研究課題名（和文）血液神経関門を構成する微小血管内皮細胞の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the function of the endothelial cells forming blood-nerve barrier

研究代表者

佐野 泰照 (SANO YASUTERU)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20379978

研究成果の概要：ヒトおよびラットより神経内膜内微小血管内皮細胞を単離し株化を行った。これらの細胞株は血液脳関門を構成する内皮細胞が発現している claudin-5 などの密着結合構成分子を発現しており、P-glycoprotein や GLUT-1 などの輸送担体も発現していた。血液神経関門を構成する内皮細胞は血液脳関門を構成する内皮細胞と同様にバリアに特化した性質を有する細胞であることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	150,000	2,350,000

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：血液神経関門

1. 研究開始当初の背景

難治性末梢神経疾患では血液神経関門の破綻が認められる。血液神経関門の生理学的なメカニズムが解明できればこれらの疾患の新たな治療法の開発へとつながるが、研究開始当初は血液神経関門の機能に関する知見は十分ではなかった。その理由のひとつとして血液神経関門を構成する末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞の一次培養自体が、手技的に難易度がきわめて高いという点にあった。

2. 研究の目的

末梢神経系には中枢神経系における血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)に類似したバリアーシステムである血液神経関門(blood-nerve barrier: BNB)が存在する。ギランバレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーなどの炎症性末梢神経疾患においては血液神経関門の破綻が存在し、このバリアーシステムの破綻が病気の進行

に大きく関わっていると考えられている。血液神経関門の破綻を修復することで炎症細胞や各種炎症性サイトカイン、免疫グロブリンなどの末梢神経実質への侵入を阻止できれば、これらの難治性炎症性末梢神経疾患の予防や病態の改善へとつながるものと推察されるが、そのためには血液神経関門の生理機能が十分に解明される必要がある。血液脳関門では claudin-5 や occludin などの密着結合蛋白がバリア機能に重要な役割をはたしていることが明らかにされ、GLUT-1、P-glycoprotein(P-gp)などのトランスポーターを駆使し栄養素の取り込みや有害物質の排出を能動的に行っていることが明らかになってきた。血液神経関門においてもこのような密着結合蛋白やトランスポーターが存在し、バリア機能の維持や能動的な物質の輸送を行っていることが推察されるが、十分に解明されていないのが現状である。とりわけ、血液神経関門の首座である神経内膜内微小血管内皮細胞由来の *in vitro* BNB model を用いた解析は血液脳関門解析に比し大きく立ち遅れている。難治性炎症性末梢神経疾患の新たな治療法を開発することが、最終かつ最大の目標であるが、その第一歩として、すぐれた *in vitro* BNB model を構築し、血液神経関門の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では血液脳関門研究で頻繁に解析の対象となっているラットの血液神経関門の機能を解析しようと試みた。また、ヒトの疾患の治療法開発を最終目的とするがゆえにヒトの血液神経関門の機能の解明も不可欠であるためヒトの組織を用いた研究も行った。

ラットを用いた解析では、当施設の動物実験倫理委員会へ実験計画書を提出し、承認を得た後に研究を開始した。ヒトの細胞を用いた解析では、ヘルシンキ宣言に基づき研究計画を策定し、当施設の倫理委員会にて認可を受けた後に研究を開始した。材料として剖検にて得られたヒト坐骨神経を用いたため、ご遺族に対し説明後文書にて同意を得た後に研究を開始した。また、一般的に血液脳関門を構成する内皮細胞などのバリア構成内皮細胞は数代の継代にて増殖能力を失うことが多く、安定した実験データを得るためには不死化遺伝子を用いた細胞の株化が必須である。不死化遺伝子の導入の際には遺伝子組み換え操作を要するため本大学の遺伝子組

み換え安全委員会に認可を受けた後にすべての実験を開始した。

温度感受性ラージT抗原トランスジェニックラットの坐骨神経から神経内膜内微小血管内皮細胞を単離し、ラット血液神経関門 *in vitro* モデルとした。ヒト坐骨神経から神経内膜内微小血管内皮細胞を単離し、ウイルスベクターを用い温度感受性ラージT抗原遺伝子およびヒトテロメラーゼ遺伝子を導入し、株化をおこなった。得られた内皮細胞群を、ヒト *in vitro* 血液神経関門モデルとした。これらのラットおよびヒト由来のモデルを用いて血液神経関門の機能を解析した。

4. 研究成果

得られたラットおよびヒト血液神経関門由来の内皮細胞株はバリア機能の指標である高い電気抵抗値を有しており、イヌリンに対する低い透過性を示した。これで血液神経関門が血液脳関門と同様に高いバリア機能を有するということが明らかになった。また、両 model より mRNA を抽出し RT-PCR を用いて密着結合関連分子の発現の有無を調べたところ両細胞株ともに血液脳関門を構成する内皮細胞が発現している claudin-5, occludin, ZO-1 など密着結合関連蛋白を発現していた。また、免疫組織化学的手法を用い、蛋白レベルでの発現も検討したところ、これらの密着結合関連分子は隣接する細胞境界に局在していた。すなわち、蛋白レベルでの発現が確認できたのに加えて密着結合の存在部位に一致して局在ということが明らかになった。これは血液神経関門も血液脳関門と同様に密着結合関連蛋白を発現し、内皮細胞同士が密着結合を介してタイトに結合することによってバリア機能を維持していることを示唆するものであり、非常に興味深い研究結果であった。

血液脳関門を構成する内皮細胞は、自らがグルコーストランスポーター1 (GLUT-1) を発現することでD-グルコースを血管内腔側から脳側へ積極的に取り入れている。一方、血液脳関門を構成する血管内皮細胞は、P糖タンパク (p-glycoprotein) や ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 (ABCG2) などの輸送担体を発現することで脳にとって有害な薬物などを脳側から血管腔側へ排出している。非常に興味深いことに、ラットおよびヒトの血液神経関門由来の両内皮細胞にて GLUT-1 や P糖蛋白などの輸送担体の発現が確認された。すなわち、血液脳関門で機能している能動的な物質の輸送システムの本体である各種輸送担体を血液神経関門構成内皮細胞も発現していることが明らかとなった。血液神経関門でも GLUT

ー1を駆使してD-グルコースを血管内腔側から末梢神経の実質が存在する側へ取り込んでおり、P糖蛋白などの輸送担体を駆使して末梢神経にとって有害となる薬剤などがくみ出されていることが推察された。

これらの研究結果は、血液神経関門でも血液脳関門と類似したシステムが作動していることを示唆するものであり、血液神経関門のメカニズムの全容を解明するための大きな布石となるものである。今後われわれの研究成果を基礎として血液神経関門の機能が明らかになることで、慢性脱髄性多発根ニューロパチーや遺伝性末梢神経障害などの難治性末梢神経疾患のあらたな画期的な治療法の開発へと発展することが期待される。

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4件)

1. 佐野泰照, 神田隆. 血液神経関門の形態と機能 臨床脳波 217: 32-36. 2009. 査読有

2. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, Ueda M, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kanda T. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells

J Cell Physiol. 217: 388-399. 2008 査読有

3. 佐野泰照, 神田隆. 血液神経関門を構成する内皮細胞の細胞学的特徴 末梢神経 18:252-255. 2007 査読有

4. Sano Y, Shimizu F, Nakayama H, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Ueda M, Takahashi R, Kanda T. The endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly-specialized characteristics as barrier forming cells. Cell Structure and Function 32: 139-147. 2007 査読有

[学会発表] (計11件)

1. Yasuteru Sano and Takashi Kanda. A new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line American Neurological Association 133rd Annual Meeting. 2008年9月23日 Salt Lake City, USA
2. 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 神田隆. 血液神経関門のregulatorは血管周皮細胞である. 第19回日本末梢神経学会2008年9月5日 名古屋
3. 安部真彰, 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 神田隆. ヒト血液神経関門in vitroモデルの確立 第19回日本末梢神経学会. 2008年9月5日 名古屋
4. 安部真彰, 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 神田隆. ヒト神経内膜内微小血管内皮細胞 (HPnMECs) の cell line の作成. 第49回日本神経学会総会 2008年5月16日 横浜
5. 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 神田隆. 血液神経関門のregulatorは血管周皮細胞である. 第20回日本神経免疫学会学術集会 2008年4月18日 新潟
6. 佐野泰照, 安部真彰, 清水文崇, 前田敏彦, 神田隆. 温度感受性SV40ラージT抗原を用いた新たなヒトin vitro BBB modelの確立. 第20回日本神経免疫学会学術集会 2008年4月18日 新潟
7. 安部真彰, 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 神田隆. ヒト神経内膜内微小血管内皮細胞 (HPnMECs) の cell line の作成 第109回山口大学医学会学術講演会 2008年2月9日 宇部
8. 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 神田隆. 温度感受性SV40ラージT抗原を用いた新たなヒトin vitro BBB modelの確立. 第48回日本神経学会総会. 2007年5月17日名古屋
9. Yasuteru Sano, Fumitaka Shimizu, Masaaki Abe and Takashi Kanda. A new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line Neuroscience 2007 2007年11月4日 San Diego, USA
10. 佐野泰照. 血液神経関門を構成する内皮細胞の細胞学的特徴. 第18回日本末梢神経学会学術集会2007年8月25日

弘前

- 1 1. 佐野泰照, 清水文崇, 安部真彰, 前田敏彦, 神田隆. 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原を用いた新たなヒト in vitro BBB model の樹立. 第 19 回 日本神経免疫学会学術集会 2007 年 4 月 13 日 金沢

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 泰照 (SANO YASUTERU)
山口大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 20379978

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

安部真彰 (ABE MASAAKI)
山口大学医学部大学院医学
研究科・大学院生

清水文崇 (SHIMIZU FUMITAKA)
山口大学医学部大学院医学
研究科・大学院生

前田敏彦 (MAEDA TOSHIHIKO)
山口大学医学部大学院医学
研究科・大学院生