

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07338

研究課題名(和文) 腸炎症に起因した脳ペリサイト異常化が駆動する脳内 シヌクレインの凝集・蓄積亢進

研究課題名(英文) Involvement of activated brain pericytes induced by inflammatory bowel disease in the increased aggregation of alpha-synuclein in the brain.

研究代表者

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：60399186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「腸炎症に起因する脳ペリサイトの機能異常が シヌクレインの脳内蓄積を惹き起こし、孤発性パーキンソン病の発症・進展に寄与する」と仮説し、脳ペリサイト異常化に関わる責任分子・機序の解明を企てた。線維化 シヌクレインによる脳ペリサイトの炎症性メディエーター産生は、脳ペリサイトのP糖タンパク質(P-gp)発現の増加と連動していた。潰瘍性大腸炎モデルマウスの脳血管におけるP-gp発現増加と考え併せると、腸炎症に起因した脳ペリサイトの異常化としてP-gp発現量増加に伴う炎症性メディエーター産生が挙げられる。これは血液脳関門機能を低下させ、血液中 シヌクレインの脳移行を増加させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳毛細血管壁に局在する脳ペリサイトは、血液と脳の間物質移行を制御する血液脳関門の構成細胞として重要である。この脳ペリサイトの異常化・機能低下が中枢神経疾患の発症や進展に寄与することが示唆されてきたが、その異常化を特徴付ける分子は同定されていない。本研究において、脳ペリサイト異常化の一側面である炎症性メディエーター産生について、これを特徴付ける分子としてP-gpを挙げることができた。脳ペリサイト異常化による脳内での炎症性メディエーター増加は脳内炎症拡大および血液脳関門機能低下に繋がる。P-gp阻害による脳ペリサイト異常化の是正が、パーキンソン病でも認められる脳内炎症を抑制する鍵となると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that activation of brain pericytes induced by inflammatory bowel disease (IBD) contributes to the increased aggregation of alpha-synuclein in the brain, leading to the development of Parkinson's disease. Here, we investigated whether brain pericytes were activated under IBD, and then we intended to identify the marker proteins of activated brain pericytes. Fibrillar alpha-synuclein induced the release of inflammatory mediators by brain pericytes with increased expression of P-glycoprotein (P-gp). Mouse models of dextran sulfate sodium-induced colitis exhibited the increased expression of P-gp in brain microvessels constituting of brain endothelial cells and pericytes. These results suggest that activated brain pericytes, which are characterized by increased P-gp and release of inflammatory mediators, contribute to blood-brain barrier dysfunction under IBD leading to increased alpha-synuclein transport from blood to brain.

研究分野：薬物動態学

キーワード：脳ペリサイト パーキンソン病 シヌクレイン 炎症性腸疾患 炎症性メディエーター

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は黒質・線条体のドパミン神経の変性・脱落および脳の広範囲に認められる Lewy 小体を病理的特徴とする神経変性疾患である。患者の大部分を占める孤発性パーキンソン病の発症機序は不明であり、その解明はドパミン神経細胞変性そのものを防ぐ視点からの治療法開発において急務である。Lewy 小体の主要構成成分は蓄積した シヌクレインのリン酸化および凝集体であり、これが神経機能障害および細胞死を誘発する。病変の拡大には、神経細胞間および神経細胞 - グリア細胞間での シヌクレインの伝播が関与する。しかし、正常神経細胞機能に不可欠な シヌクレインが孤発性パーキンソン病ではどのように増加・変性し、脳内の広範囲にわたる凝集体および Lewy 小体形成とドパミン神経機能低下へと導くのかは不明である。

運動症状がまだ顕在化していないパーキンソン病初期では、既に消化管など末梢臓器でのシヌクレイン蓄積が脳でのそれに先行していることが知られる。特に消化管から迷走神経を介した脳幹への上行性 シヌクレイン伝播に基づいた病態仮説が考えられている (Braak 仮説) が、神経以外の上行性経路を示唆するパーキンソン病患者の病理所見として、病態初期での血液中 シヌクレイン増加がある。シヌクレインは循環血液と脳実質の間の物質透過を制限する血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) を透過できる (Nature, 2015)。

これらの知見から、我々は血液脳関門を介した血中 シヌクレインの脳内侵入を端緒とする末梢由来 シヌクレイン増加に注目した。実際、血液脳関門構成細胞である脳ペリサイトには、シヌクレイン特異的な細胞内取り込みトランスポーターおよび分解機構が存在することを明らかにした。特に分解機構は他の BBB 構成細胞には認められない特徴である。さらに、脳ペリサイト由来液性因子は神経細胞の シヌクレイン増加および凝集体形成を抑制する。これらの結果から脳ペリサイトは、脳内の シヌクレイン増加・凝集を抑制すると考えられ、パーキンソン病の発症・進展過程では本細胞の機能が損なわれている (異常化する) 可能性がある。

パーキンソン病の発症および シヌクレインの蓄積に末梢および脳内炎症の関与が示唆されてきたが、その責任分子は不明であった。最近、炎症性腸疾患はパーキンソン病の危険因子であり、抗 TNF- α 抗体治療を施された潰瘍性大腸炎患者のパーキンソン病発症率の低下が報告された (JAMA Neurology, 2018)。一定の抵抗性患者も存在するが、これはパーキンソン病発症における TNF- α の重要性を示している。我々は脳構成細胞のなかで、脳ペリサイトが最も TNF- α 反応性が高く (Neurosci Lett., 2014; J Neuroinflammation, 2011)、この TNF- α に応答して産生された脳ペリサイト由来 IL-6 がミクログリアの活性化を惹き起こし、脳内炎症の形成に関与することを明らかにした (Brain Res, 2018)。以上を総合すると、脳ペリサイトが脳 - 腸連関を媒介し、末梢炎症の脳への伝播を担う可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では「腸炎症に起因する脳ペリサイトの機能異常が シヌクレインの脳内蓄積を惹き起こし、孤発性パーキンソン病の発症・進展に寄与する」と仮説し、脳ペリサイトの異常化に関わる責任分子・機序を明らかにし、脳ペリサイトを標的とした治療法の開発を目的とする。具体的には以下の項目を明らかにする。

- (1) 腸炎症および シヌクレイン蓄積による脳ペリサイトの異常化とその機序
- (2) 異常化した脳ペリサイトの特徴
- (3) 腸炎症によるパーキンソン病症状の増悪および脳血管の変化

3. 研究の方法

(1) シヌクレインによる脳ペリサイトの炎症性メディエーター産生: 35 mm 培養 dish に Wistar ラットから単離培養した初代培養脳血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトを播種し、シヌクレイン単量体および線維化 シヌクレインを負荷した。24 時間後に培養上清中に遊離された炎症性メディエーターを、Milliplex[®] キット (Millipore 社) および ELISA キットを用いて測定した。測定した生理活性物質は血液脳関門機能を低下させることが知られる interleukin (IL)-1、IL-6、monocyte chemotactic protein (MCP)-1、matrix metalloproteinase (MMP)-9 および TNF- α である。また、炎症性メディエーター産生における Toll 様受容体 (TLR) の関与を調べるために、TLR 阻害剤である CU-CPT (TLR1/2 阻害剤) および TAK-242 (TLR4 阻害剤) を用いた。P 糖タンパク質 (P-gp) の関与を調べるために、siRNA を用いて、P-gp をノックダウンした脳ペリサイトを用いた。

(2) シヌクレインに応答した脳ペリサイトのマーカータンパク質発現量変動: 上記 (1) と同様に、シヌクレイン単量体および線維化 シヌクレインを負荷後、全 RNA を抽出し、脳ペリサイトマーカータンパク質の mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定した。

(3) 潰瘍性大腸炎モデルマウスの作成: 7 週齢雄性 C57BL/6J マウスにデキストラン硫酸 (DSS) を 5 日間飲水させ、潰瘍性大腸炎モデルマウスを作成した。腸炎症によるパーキンソン病症状の変化を調べる際には、DSS 飲水の 3 日前にドパミン神経毒である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) をマウスの右側線条体に投与した。

4. 研究成果

(1) シヌクレインによる脳ペリサイトの炎症性メディエーター産生とその機序：脳ペリサイトの機能異常を評価する指標を確立するため、線維化 シヌクレインに暴露された脳ペリサイトの機能変化(異常化)を炎症性メディエーター産生の観点から検討した。パーキンソン病患者脳で広範囲に認められるレビー小体の主要構成成分の線維化 シヌクレインに应答して、脳ペリサイトは炎症性メディエーター(IL-1、IL-6、MCP-1、MMP-9、TNF-)を産生した。これはToII様受容体(TLR)4阻害薬TAK-242で阻害されたが、CU-CPT(TLR1/2阻害剤)では阻害は認められなかった。これらの結果から、線維化 シヌクレインがTLR4を介して脳ペリサイトの炎症性メディエーター産生を惹き起こすことが示唆された。特に脳ペリサイト由来IL-6はミクログリアの活性化を惹き起こし、脳内炎症を増悪させると考えられる。また、これらの炎症性メディエーターは血液脳関門機能異常を惹き起こすことから、血液中 シヌクレインの脳移行および脳内での蓄積を増加させる可能性がある。

(2) 異常化した脳ペリサイトの特徴：上記炎症性メディエーターを産生する脳ペリサイトにおいて、脳ペリサイトのマーカータンパク質のmRNA発現量変動を検討したところ、Desmin、Kcnj8およびP-gpの発現量が増大した。これらの発現量増加はTAK-242存在下で抑制された。したがって、これらは線維化 シヌクレインに应答して炎症性メディエーターを産生する「異常化脳ペリサイト」を同定するマーカーとなり得る。さらにP-gpに着目し、この脳ペリサイトのP-gp発現量増加の病態生理学的な役割を検討した。siRNAを用いて脳ペリサイトのP-gp発現量を抑制したところ、線維化 シヌクレインによるIL-1、IL-6、およびMMP-9 mRNA発現量増加が阻害された。これはP-gpが脳ペリサイトの炎症性メディエーター産生を制御していることを示唆する。

(3) 腸炎症によるパーキンソン病症状の増悪および脳血管の変化：デキストラン硫酸(DSS)飲水による潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて運動障害などのパーキンソン病様症状は認められなかった。また、潰瘍性大腸炎モデルマウスに6-OHDAを投与したが、パーキンソン病様症状の増悪は認められなかった。一方、脳血管でのP糖タンパク質(P-gp)発現量は潰瘍性大腸炎モデルマウスで増大した。脳ペリサイトは脳血管構成細胞であることから、炎症性腸疾患では脳ペリサイトのP-gp発現が増加している可能性があり、これが炎症性腸疾患時において線維化 シヌクレインによる脳内炎症の増悪に寄与するかもしれない。

以上、本研究結果は、炎症性腸疾患が直接パーキンソン病における運動症状(運動機能障害)を誘発および増悪させる可能性は低いことを示すものと考えられる。しかし、炎症性腸疾患時の脳内および消化管 シヌクレイン増加については現在検討中である。また、用いた潰瘍性大腸炎モデルマウスも急性期のものであり、今後寛解・再発を繰り返す慢性期モデルでの検討が必要である。さらに本研究において、異常化した脳ペリサイト、特に炎症性メディエーターを産生する脳ペリサイトを同定するマーカータンパク質としてP-gpを挙げることができたことは、今後脳ペリサイトの異常化を伴う中枢神経変性疾患の治療法開発に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 道具 伸也、横谷みき、高田 芙友子、松本 純一、岩尾 卓朗、佐野和憲、片岡 泰文
2. 発表標題 Degradation of oligomeric α -Synuclein in brain pericytes is enhanced by cyclosporin A.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横谷みき、道具伸也、高田芙友子、松本純一、岩尾卓朗、山内淳史、佐野和憲、片岡泰文
2. 発表標題 脳ペリサイトによる α -シヌクレインオリゴマーの細胞内取り込み機構
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道具伸也、秋月美波、小林篤史、盛田隼矢、高田芙友子、松本純一、岩尾卓朗、山内淳史、佐野和憲、片岡泰文
2. 発表標題 Toll様受容体を介した脳ペリサイト特異的な α -シヌクレインによる炎症性メディエーター産生
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinya Dohgu, Minami Akizuki, Atsushi Kobayashi, Shunya Morita, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Takuro Iwao, Atsushi Yamauchi, Kazunori Sano, Yasufumi Kataoka
2. 発表標題 Involvement of Toll-like receptors in brain pericyte specific production of inflammatory mediators induced by α -synuclein
3. 学会等名 2nd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代恵麗、高田英友子、岩尾卓朗、福永裕子、道具伸也
2. 発表標題 Aging-induced changes in mRNA expression of dopaminergic neuronrelated genes in C57BL/6 mouse brain
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田英友子、良永侑子、岩尾卓朗、道具伸也
2. 発表標題 Decreased brain uptake of cyclosporin A and tacrolimus in the inflammatory bowel disease mice.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横谷みき、高田英友子、岩尾卓朗、松本純一、安永美保、有留尚孝、道具伸也
2. 発表標題 Cyclophilin A is involved in the uptake of oligomeric α -synuclein by brain pericytes
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道具伸也、横谷みき、秋月美波、小林篤史、高田英友子、岩尾卓朗、松本純一、有留尚孝、安永美保、佐野和憲
2. 発表標題 Involvement of P-glycoprotein in α -Synuclein aggregate-induced inflammatory mediator release by brain pericytes
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fuyuko Takata, Yuko Yoshinaga, Takuro Iwao, Miho Yasunaga, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Brain transport of the immunosuppressive agents across BBB is decreased in the inflammatory bowel disease mice.
3. 学会等名 The 23rd international symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinya Dohgu, Miki Yokoya, Minami Akizuki, Atsushi Kobayashi, Fuyuko Takata, Takuro Iwao, Junichi Matsumoto, Hisataka Aridome, Miho Yasunaga, Kazunori Sano
2. 発表標題 Involvement of P-glycoprotein in α -synuclein aggregate-induced inflammatory mediator release by brain pericytes
3. 学会等名 4th Mini-Symposium on the Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高田 芙友子 (Takata Fuyuko) (70412575)	福岡大学・薬学部・准教授 (37111)	
研究 分担者	松本 純一 (Matsumoto Junichi) (10550064)	福岡大学・薬学部・助教 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------