

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790243

研究課題名 (和文)

脳血管外遊走する細胞のライブセルイメージング解析と細胞医薬への応用

研究課題名 (英文)

Studies on molecular mechanisms of cell extravasation across the blood-brain barrier.

研究代表者

細野 友美 (HOSONO TOMOMI)

国立長寿医療研究センター (研究所)・アルツハイマー病研究部・外来研究員

研究者番号：20470172

研究成果の概要：

脳内免疫担当細胞であるミクログリアや骨髄前駆細胞はアルツハイマー病病態下で血液脳関門を通過することが報告されている。本研究では血液脳関門通過に関わる機序をマウス脳内ライブセルイメージングにより明らかにしようとした。その結果、アルツハイマー病モデルマウス脳内では野生型マウスと比較して白血球のローリングと接着が亢進した。詳細な解析により、E-セレクトインと、P-, E-セレクトインリガンド糖鎖、CD44 および α M インテグリンの相互作用が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞生物学、アルツハイマー病、血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

(1) 血液脳関門は血液系と脳との間の物質交換を制限する機構であり、脳内の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかしながら創薬の場においては、開発中の多くの候補薬物が血液脳関門を通過できないがために、開発を断念せざるを得ないケースが多く見受けられる。このようなことから、血液脳関門を通過させる新たな機構を開発することは極めて重要な課題である。

(2) これまでに、脳内免疫担当細胞であるミクログリアや骨髄前駆細胞が血液脳関門を通過することが報告されている(Sawada et al., FEBS Lett., 1998; Simard et al., Neuron, 2006)。これらの細胞は、動脈投与または静脈投与により脳内へ浸潤・生着する。詳細なメカニズムは未だ不明であるが、細胞を用いた血液脳関門の突破は脳疾患の新しい治療法の開発基盤になると強く期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、ミクログリア細胞、骨髄単球細胞、アルツハイマー病モデルマウスおよびマウス生体内ビデオ蛍光顕微鏡法を用いて、当該細胞の脳血管外遊走と脳内への移入機構を明らかにすることを目的とする。さらに、これら脳移行性細胞を多く送り込むことにより脳内神経毒性アミロイド斑を効率的に除去する治療法や、アミロイド斑分解除去遺伝子の脳内搬送体としてこれら細胞を利用する細胞医薬をもとにしたアルツハイマー病新規治療法開発における技術基盤の提供も目指す。

3. 研究の方法

(1) はじめに、生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いた脳内細胞イメージング技術の確立を行った。脳観察に必要な open skull および thin skull 手技は東京大学医学部・根東覚先生の元で習得し、当研究室のビデオ蛍光顕微鏡システムに適応させた。

(2) 上記の解析系を用い、ミクログリア細胞および骨髄単球細胞の脳内移行に関する基礎的な検討を行った。CFSE 色素を用いて蛍光ラベルしたミクログリア様細胞株 MG5 (ドナー) もしくは GFP トランスジェニックマウス(ドナー)の大腿骨より調製した骨髄単球細胞を正常マウス(レシピエント)へ尾静脈より投与した(5×10^6 cells/mouse)。その後、麻酔下にて頭部を切開し本研究室に設置されたビデオ顕微鏡システム(Eclipse FN1, Nikon)にて脳内観察を行った。本法により、血管内を移行する GFP 陽性細胞をビデオにて鮮明に捉えることが可能となり、解析ソフトを使用してその動態を詳細に解析することに成功した(図.1)。

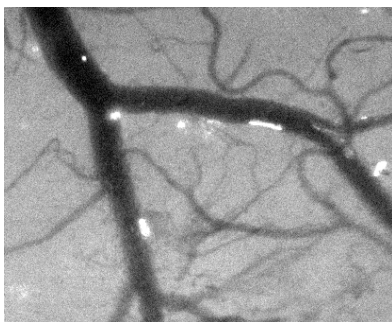


図 1. 脳血管内を流れる MG5 細胞

(3) 本方法を用いて末梢投与ミクログリア細胞 (MG5) のマウス脳内におけるライブイメージングを行った。MG5 で得られた知見が他のミクログリア細胞でも観察可能かどうかを確認するため、マウスミクログリア細胞 (BV2) を入手し、その培養維持を行った。フローサイトメトリーにより血管外遊走時に働くと予想される細胞表面分子 (セレクチン、セレクチンリガンド糖鎖、インテグリンなど) の発現を解析した。また、それぞれの接着分子のカウンターパート分子が加齢アルツハイマー病モデルマウス脳内血管で発現しているかどうかを組織化学染色法で解析した。代謝ラベル法により当該細胞を CFSE 蛍光色素標識し、マウス脳内における標識細胞の動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いて解析した。加齢アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 の脳内における標識細胞動態解析にも着手した。

(4) 一方、本研究者はヘパラン硫酸多硫酸化ドメインがアルツハイマー病モデルマウス脳内重合 A β 沈着部位に選択的に強く発現することを発見している。ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの A β 重合への役割および当該ドメインを分解する細胞外スルファターゼの解析をヘパリン (多硫酸化ドメインを多く持つヘパラン硫酸誘導体) と化学修飾ヘパリン (多硫酸化ドメイン含有が非常に少ない誘導体) を用いた in vitro A β 重合 Thio-T アッセイにより比較検討した。

4. 研究成果

(1) 脳移行時に働くと予想される分子 (P, E-セレクチンリガンド、インテグリン) のフローサイトメトリーによる解析結果から、BV2 ミクログリア細胞が P-, E-セレクチンリガンド糖鎖、CD44 および α M インテグリンを発現している事が明らかとなった。加齢アルツハイマー病モデルマウス脳内血管における接着分子の発現を組織化学染色法で解析した結果、野生型では観られない P-, E-セレクチンが発現する結果が得られた。末梢静脈投与した BV2 ミクログリア細胞のマウス脳内での動態を生体内ビデオ蛍光顕微鏡法で観察・解析した結果、他の末梢組織内でみられるローリングや接着の機構が観察された。興味深い事に、加齢アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 の脳内ではローリングや接着の機構が増強されている知見が得られた(図.2)。現在この解析結果に関して他のアルツハイマー病モデルマウスでも同様に観察される

かどうかを検討している。

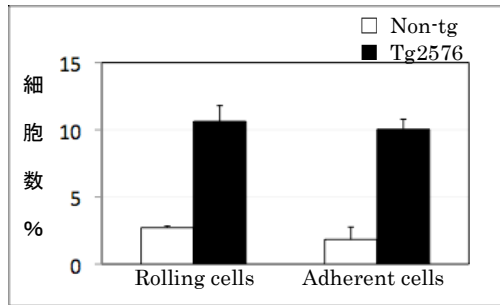


図 2. 加齢アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 脳では血行性細胞のローリングや接着が増加する

(2) ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの A β 重合への役割をヘパリンと化学修飾ヘパリンを用いた in vitro A β 重合 Thio-T アッセイにより比較検討した結果、多硫酸化ドメインが A β 重合を促進する事が明らかとなった。さらに、当該ドメインを分解する細胞外スルファターゼの解析を行った。大変興味深い事にアルツハイマー病モデルマウス脳内多硫酸化ドメインが細胞外スルファターゼにより ex vivo で完全に分解される事を発見した。

(3) マウスミクログリア細胞株 BV2 がアルツハイマー病モデルマウス脳血管内において野生型では観られないローリングおよび接着の増加を示すことが示された。さらに、LPS 感作による全身性炎症マウスでも同様に観察された。これらの事から、細胞のアルツハイマー病態脳内浸潤メカニズムは炎症におけるメカニズムと一部共通する可能性が示された。BV2 は L-セレクトリン分子や PSGL-1 (P-セレクトリンリガンド分子) は発現しないが E-セレクトリンリガンド分子 (シアリルルイス X 糖鎖) は発現する。BV2 の脳内血管におけるローリングの増加は E-セレクトリンとそのリガンド分子を介した相互作用による結果であることが示唆された。脳移行性ミクログリアを外来遺伝子脳内搬送体として利用する事を検討するためこれらの細胞に効率良く遺伝子を導入発現させるシステムの開発を検討した。マウスポリオーマウィル PY2 スペクターの選択的な高効率遺伝子発現結果はこのベクターを用いたシステム構築が有用であることを示している。ヒトアルツハイマー病剖検脳側頭葉におけるセレクトリン分子の発現上昇結果はアルツハイマー

病の大部分を占める孤発性アルツハイマー病の発症メカニズム解析へマウスの知見が応用できることを強く示唆することとなった。

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 1 件)

- ① Hossain MM, Hosono-Fukao T, Tang R, Sugaya N, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Kimata K, Rosen SD, Uchimura K. Direct detection of HSulf-1 and HSulf-2 activities on extracellular heparan sulfate and their inhibition by PI-88. *Glycobiology*. 20:175-86. (2010) 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

- ① 細野友美, アルツハイマー病モデルマウスの脳におけるヘパラン硫酸糖鎖の発現解析
第 28 回日本糖質学会年会, 平成 20 年 8 月 19 日, つくば
- ② Tomomi Hosono, Cerebral Accumulation of Highly Sulfated Domains of Heparan Sulfate in Mouse Models of Alzheimer's Disease
Annual meeting of Glycobiology 2008, Nov 13, (2008), Fort Worth, USA,
- ③ Tomomi Hosono, Cerebral accumulation of highly sulfated domains of heparan sulfates in mouse models of Alzheimer's disease
BMB2008, 2008 年 12 月 9 日, 神戸
- ④ 細野友美, ヘパラン硫酸多硫酸化ドメインのアルツハイマー病モデルマウス脳内における発現解析
第 73 回日本生化学中部支部例会・シンポジウム, 平成 21 年 5 月 23 日, 名古屋
- ⑤ 細野友美, アルツハイマー病態脳におけ

るへパラン硫酸糖鎖の解析
第3回 GFRG 研究会, 北海道大学, 平成21
年8月25日

⑥ 細野友美, アルツハイマー病態脳におけ
るへパラン硫酸鎖内部ドメインの発現解析
第29回日本糖質学会年会、平成21年9月
10日, 高山市

⑦ 細野友美, アルツハイマー病脳アミロイ
ド沈着におけるRB4CD12抗体認識へパラン硫
酸鎖内部ドメインの蓄積
第82回日本生化学会大会, 2009年10月24
日, 神戸

⑧ Tomomi Hosono, Highly sulfated domains
of heparan sulfate accumulate in cerebral
A β plaques
Society for Neuroscience meeting, Chicago,
10/21/2009. Chicago

⑨ 細野友美, Highly sulfated domains of
heparan sulfate accumulate in amyloid
plaques of Alzheimer's disease brain
グローバルCOE第2回国際シンポジウム 名
古屋ヒルトンホテル 2009年11月27日, 名
古屋

⑩ 細野友美, アルツハイマー病態脳におけ
るへパラン硫酸糖鎖多硫酸化ドメインの発
現解析
第28回日本認知症学会 東北大学百周年記
念会館, 2009年11月20日, 仙台.

⑪ Tomomi Hosono, Highly sulfated domains
of heparan sulfate accumulate in cerebral
A β plaques of patients and mouse models of
Alzheimer's disease
第2回 Nagoya グローバルリトリート 愛知
健康プラザ 2010年2月26日, 大府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 友美 (HOSONO TOMOMI)
国立長寿医療研究センター(研究所)・アル
ツハイマー病研究部・外来研究員
研究者番号: 20470172