

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16497

研究課題名（和文）神経疾患における脳内胆汁酸の役割の解明

研究課題名（英文）The Role of Brain Bile Acids in Neurological Diseases

研究代表者

杉山 慎太郎（Sugiyama, Shintaro）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50839636

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）：上皮細胞間バリアの視点から肝-脳連関を担う伝達物質を新規に同定し、肝-脳連関の制御機構・生理的意義・病態との関連を解明を目的とした。Cldn3KOマウスに対して光凝固モデルで脳梗塞を作成し、脳梗塞体積や運動機能評価を行い、Cldn3KOマウスでは脳梗塞体積が増大しなかった。また、脳梗塞でCldn3、Cldn5とoccludinが協調してBBBを制御していることがわかった。occludin KOマウスではCldn5とZO-1の発現が低下し、脳梗塞後では梗塞体積の増大と血管外漏出が増加し、急性期から慢性期に至るまでBBB障害を惹起し、血管新生も抑制され、神経学的な悪化をもたらすと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

occludinは生体内で虚血性脳卒中後の急性期から慢性期にかけて重要な役割を果たすことが明らかになった。また、Cldn3KOマウス、Cldn2/3dKOマウス、occludin KOマウスを解析していく中で、Cldn3/2/5とMARVEL familyのoccludin、Tricellulin及び裏打ち蛋白であるZO-1が、想定以上に、相互に強く連携しながらタイトジャンクションを形成していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to identify novel transmitters of the liver-brain interface from the viewpoint of the epithelial cell barrier, and to elucidate the regulatory mechanism, physiological significance, and pathophysiological relationship of the liver-brain interface. Cldn3KO mice showed no increase in cerebral infarct volume. Cldn3, Cldn5 and occludin cooperated to regulate BBB in cerebral infarction. occludin KO mice showed decreased expression of Cldn5 and ZO-1, increased infarct volume and extravascular leakage after cerebral infarction, and induced BBB dysfunction from acute to chronic phase, angiogenesis was also suppressed, leading to neurological deterioration.

研究分野：脳梗塞

キーワード：肝-脳連関機構 脳梗塞 Tight junction Claudin3 胆汁酸 Claudin5 occludin Tricellulin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は、胃・腸・肝臓・血管・脳などのコンパートメントが固有の生理機能を果たし、機能的に連携する。特に脳は、胃・腸・肝臓などの臓器と様々な生理活性物質を、血液を介してやり取りをすることで機能する。一方で、末梢臓器の機能低下は血液環境の変化につながり、各種脳症の誘発因子となりうることも知られる。各臓器のコンパートメント化に必須な上皮細胞シートは、イオン・水・小分子に対するバリアとして働き血液環境を維持している。この際、細胞間接着装置であるタイトジャンクション(TJ)が細胞間の“すきま”を密閉し細胞間バリアを形成する必要がある。TJの細胞間バリアの異常は血液環境の変化に直結することから、TJの構築と機能を担う接着分子クローニン(Cldn)ファミリーが注目されている。

肝臓に高発現するCldn3のノックアウトマウス(Cldn3KOマウス)では、肝炎などの肝障害は認められなかったが、細胞間バリア機能が低下し胆汁酸やビリルビンなどの肝由来低分子物質が血中へと漏出する(Tanaka and Imasato et al, J Hepatol 2018)。Cldn3KOマウスの脳において、IL-1 上昇など著しい炎症が惹起されていた。また、Cldn3KOマウスでは、肝障害を伴わないにも関わらず、漏出した胆汁酸などの肝由来物質が脳機能に影響を及ぼすと推察されている。

このような肝臓と脳の機能的リンクを意味する肝-脳連関が注目され、肝由来物質が血流を介し脳へ伝達され脳機能を制御すると考えられている。古くは肝炎肝硬変などの肝障害時の意識障害、最近では精神・神経変性疾患との関連性が報告され、その重要性が認知されている(Butterworth et al, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013)。一方で、肝-脳連関の制御機構・生理的意義・病態との関連について、依然として未知の部分が多い。

既知の伝達物質として肝障害時に増加する血中アンモニアや炎症性サイトカインなどが知られるが、依然として未知の物質の存在が強く示唆されている(Butterworth et al, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013)。肝障害を伴わないCldn3KOマウスにて、胆汁酸などの肝由来物質が脳の機能低下を誘導する可能性がある。また、近年のメタボローム解析技術の進歩により脳内にて胆汁酸が同定され、肝-脳連関を媒介する生理活性物質として注目されている(Zheng et al, Sci Rep 2016)。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝由来物質の脳での役割を検討するために、Cldn3KOマウスなどの解析を通じて、上皮細胞間バリアの視点から肝-脳連関を担う伝達物質を新規に同定し、肝-脳連関の制御機構・生理的意義・病態との関連を解明する。

### 3. 研究の方法

生理的、脳梗塞などの病態下における、肝-脳連関を担う肝由来物質の検討を行う。この目的Cldn3KOマウスなどの血液・脳を対象として、脳での炎症の亢進、肝-脳連関を担う肝由来物質を新規、肝由来物質の脳への伝達機構の解明を行う。

(1) Cldn3KOマウス、occludinKOにて神経発達障害・脳炎・脳浮腫などの脳機能低下を評価する。Cldn3KOへの高脂肪食負荷(強い炎症と共に血液凝固に傾く)を行い、脳内脂質代謝や、脳梗塞の観点から脳機能低下を評価する。脳梗塞モデル(光凝固モデル(photothrombotic infarction stroke; PIT))をWTマウスとCldn3KOマウスで作成し、血中、脳内の胆汁酸、脳梗塞サイズ、梗塞後の運動機能、炎症、神経細胞障害の機序について検討する。

(2) 脳の主要な構成要素であるコレステロールの代謝異常は神経発達障害・神経変性を誘導することが知られる。脳内コレステロールの代謝は胆汁酸により制御されることが示唆されているため、Cldn3KOマウス脳における胆汁酸シグナル(FXR・SHP・TGR5・Cyp7a1など)を解析し脳機能低下メカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) Cldn3KOマウスにおいて生理的条件下でGFAPなどの染色性などに差がないかを成熟マウスで検討したところ、Cldn3KOマウスは脳梁などで軽度GFAP陽性細胞が多い傾向にあった。次に、脳梗塞など病態下における検討をするために、Cldn3KOマウスにPITモデルで脳梗塞モデルを作製したところ、野生型(WT)マウスと比較してCldn3KOマウスでは脳梗塞後の梗塞サイズには差はなかった。また、Cldn3KOマウスとWTマウスの比較において、脳梗塞後でのIL-1などの炎症性サイトカインが上昇していた。そのため我々は次に、Cldn3KOマウスにおける表現型を増強する目的で、Cldn2とCldn3のダブルノックアウトマウスを作製した。Cldn2/3のdKO(Cldn2,3-dKO)マウスを作製しても、梗塞体積に有意な差は見られなかった。また、これらのマウスに高脂肪食負荷をかけるなどで、高脂肪食負荷後の体重、神経障害も顕著な差はなかった。現在、胆汁酸シグナルについては解析中であり、今後論文化していく予定である。

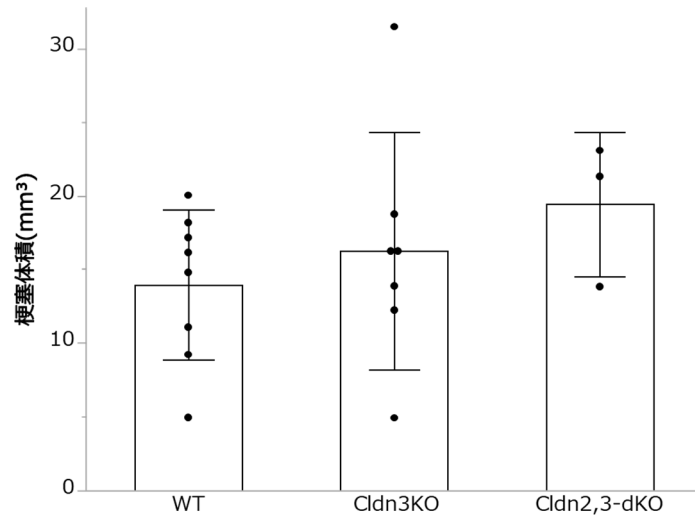


図 1 Cldn3KO、Cldn2・Cldn3dKO マウスの梗塞体積

(2)我々は、脳梗塞における、Cldn-3KOの解析をしていく中で、Cldn3及びCldn5と、occludinとの両者が相互に協調しながらBBBの機能を制御していることが分かった。脳梗塞におけるCldn3/2とoccludinの関係性が不明であるため、脳梗塞での肝-脳連関の意義を検討するためにも、occludin KOを使って、脳梗塞におけるoccludinの意義を検討した。

PITモデルを用いてマウスに脳梗塞を作成し、TJ蛋白の発現や、梗塞体積、BBB完全性、神経機能や血管新生について評価した。WTマウスでは、脳梗塞後にoccludin、Cldn5、ZO-1のmRNA発現は急性期から低下し、occludinと同じMARVEL familyのTricellulinは脳梗塞後6時間まで維持されていたが、その後徐々に減少した(図2)。免疫蛍光染色では、脳梗塞の24時間後、オクルディンの発現が低下し、WTマウスでもoccludin KOマウスでもCldn5とZO-1の発現が低下していた。

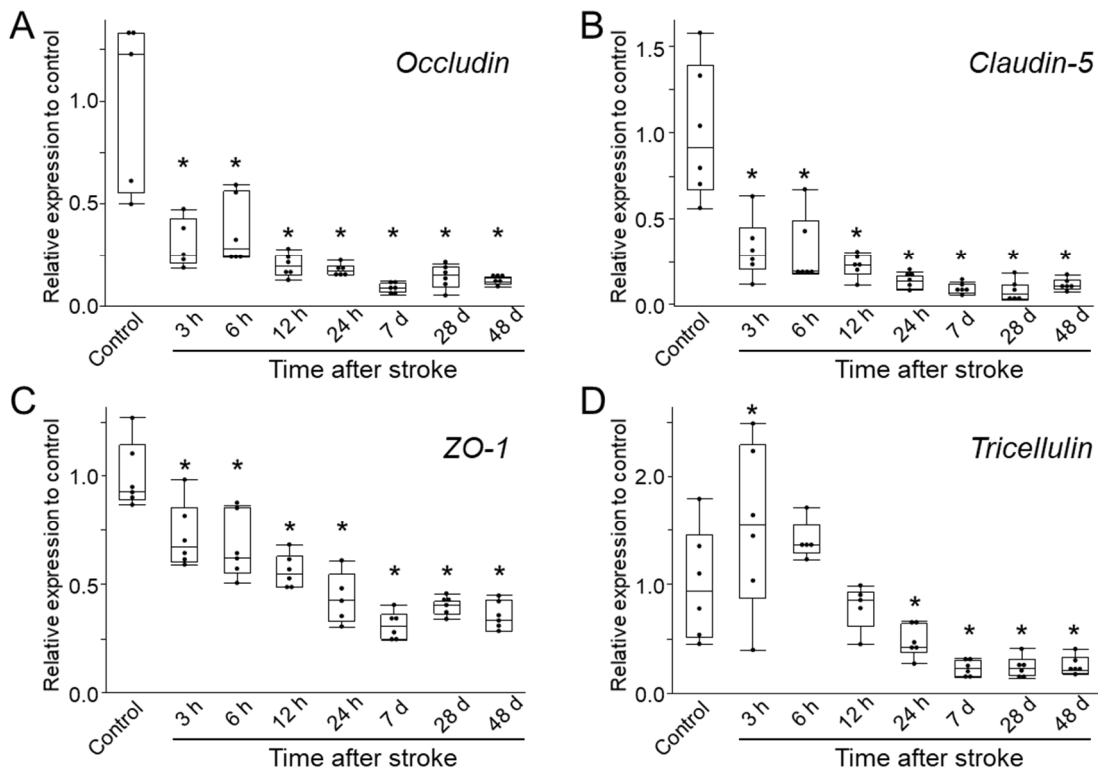


図 2 脳梗塞後の TJ 蛋白の発現

脳梗塞後の梗塞体積、BBB完全性、神経機能(Grid testおよびCylinder test)を評価すると、occludin KOマウスでは、WTマウスよりも梗塞体積が増大し(図3)完全性のマーカーであるエバンスブルーの血管外漏出が増大し(図4)また、神経機能が急性期から慢性期まで悪化し(図5)死亡率が上昇した。なお、脳梗塞後の脳血流量に差はなかった。

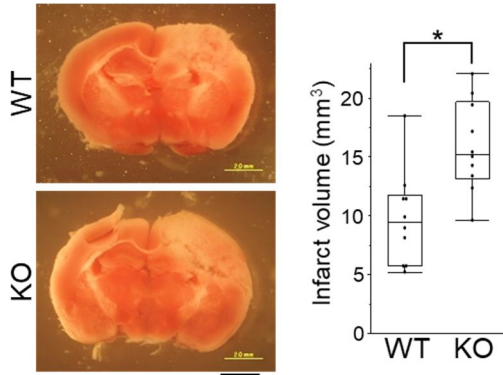


図 3 梗塞体積の比較

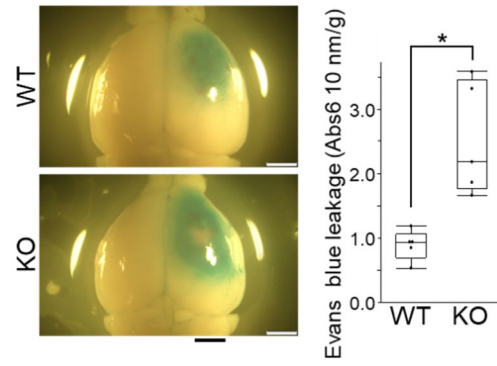


図 4 血管外漏出の比較

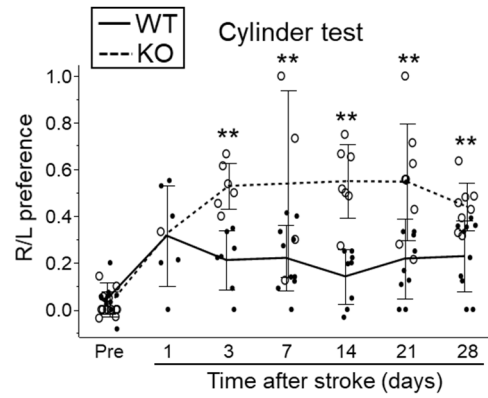
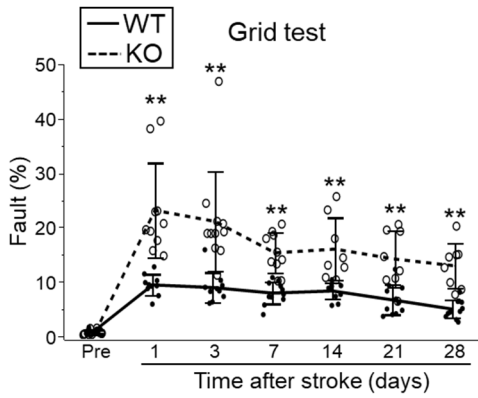


図 5 梗塞後の神経機能の比較

また、occludin KO マウスで BBB 障害が重度であることから、BBB の重要な構造・機能成分である Cln5 と ZO-1 の発現量について検討すると、occludin KO マウスでは WT マウスより Cln5 と ZO-1 の mRNA 発現量が梗塞側と非梗塞側の両方で低下し(図 6)、免疫蛍光染色でも発現が低下していた(図 7)。

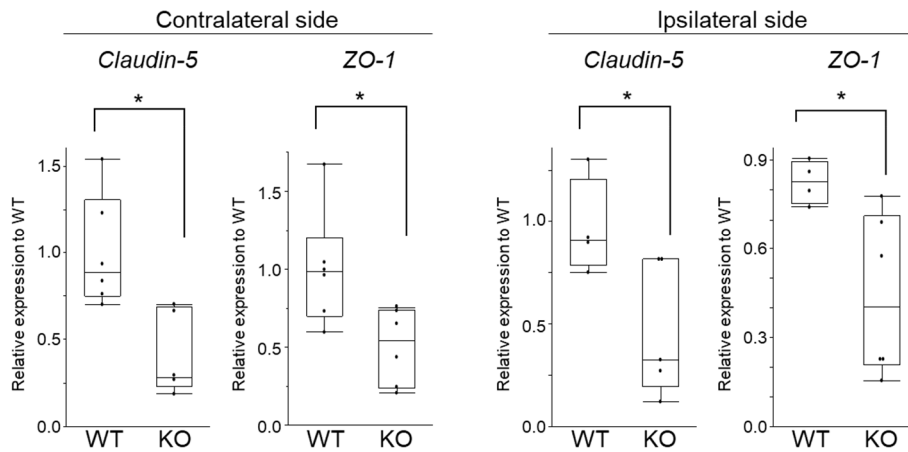


図 6 Cln5 と ZO-1 の mRNA 発現量の比較

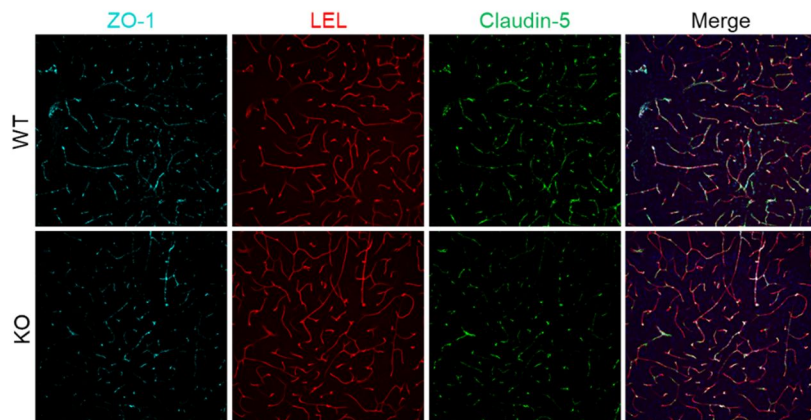


図 7 Cln5 と ZO-1 の蛋白発現量の免疫蛍光染色での比較

occludin KO マウスでは脳梗塞後の神経機能低下が慢性期まで続いたため、分子量 10kDa のフルオレセインイソチオシアナートデキストランの血管外漏出を調べると、脳梗塞後 7 日後の血管外漏出が WT マウスよりも occludin KO マウスで増大した。生理的な状態では、フルオロセイン、分子量 4kDa のフルオレセインイソチオシアナートデキストラン、Sulfo- N-hydroxysulfosuccinimide-ビオチンの漏出について WT マウスと occludin KO マウスの間に差はなかった。

occludin が細胞増殖やアポトーシスに関与していることから、脳梗塞後の血管内皮細胞における Ki-67 発現を解析したところ、occludin KO マウスでは血管内皮細胞における Ki-67 陽性の細胞数が WT に比べ減少していた。

occludin KO マウスでは、Cldn5 と ZO-1 の発現が低下し、脳梗塞後では梗塞体積の増大と血管外漏出が増加し、急性期から慢性期に至るまで BBB 障害を惹起し、血管新生も抑制されることが明らかとなり、これらが神経学的な悪化をもたらすと考えられた。

本研究により、occludin は生体内で虚血性脳卒中後の急性期から慢性期にかけて重要な役割を果たすことが明らかになった。

我々は、Cldn3KO マウス、Cldn2/3dKO マウス、occludin KO マウスを解析していく中で、Cldn3/2/5 と MARVEL family の occludin、Tricellulin 及び裏打ち蛋白である ZO-1 が、想定以上に、相互に強く連携しながらタイトジャンクションを形成していることが分かった。そのような観点も踏まえて、現在、肝-脳連関に関わるシグナルを解析しているところである。

#### <引用文献>

Sugiyama S, Sasaki T, Tanaka H, Yan H, Ikegami T, Kanki H, Nishiyama K, Beck G, Gon Y, Okazaki S, Todo K, Tamura A, Tsukita S, Mochizuki H. The tight junction protein occludin modulates blood-brain barrier integrity and neurological function after ischemic stroke in mice. *Sci Rep.* 2023 Feb 18;13(1):2892.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama Shintaro, Sasaki Tsutomu, Tanaka Hiroo, Yan Haomin, Ikegami Takeshi, Kanki Hideaki, Nishiyama Kumiko, Beck Goichi, Gon Yasufumi, Okazaki Shuhei, Todo Kenichi, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko, Mochizuki Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 The tight junction protein occludin modulates blood-brain barrier integrity and neurological function after ischemic stroke in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29894-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山慎太郎
2. 発表標題 The role of occludin in Tight Junction in Blood Brain Barrier after stroke
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山慎太郎
2. 発表標題 The effect of occludin deficiency in tight junction in blood brain barrier after stroke
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
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

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
---------	---------