

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790102

研究課題名（和文）脳ペリサイト機能異常に起因した脳神経血管機構破綻による肥満症の進展

研究課題名（英文）Involvement of brain pericytes in the development of obesity

研究代表者

高田 芙友子（TAKATA FUYUKO）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：70412575

研究成果の概要（和文）：血液脳関門（BBB）および視床下部機能を調節する基幹細胞として「脳ペリサイト」を捉え、脳ペリサイト病変（肥満増悪因子による脳ペリサイト機能異常）を機軸とした肥満の進展機構を解明しようとするものである。本研究では、脳ペリサイトが視床下部神経のインスリン感受性および摂食調節ホルモン AgRP 発現を調節することを明らかにした。また、肥満増悪因子である TNF- α はペリサイトからの MMP-9 産生を特異的に誘導した。肥満病態下では脳ペリサイトは病変し脳ペリサイト由来 MMP-9 およびその他の液性因子が、視床下部神経のインスリン抵抗性および摂食調節不良形成に関与している可能性がある。本研究は肥満を改善するための新たな治療標的を提案するものである。

研究成果の概要（英文）：Brain pericytes are periendothelial accessory structures of the blood-brain barrier (BBB) and integral members of the neurovascular unit. Although neuron-glia cell interactions are essential for cerebral functions, an interaction between pericytes and neuron has still unknown. Our results suggested that pericytes would increase insulin sensitivity and decrease production of AgRP in hypothalamic neuron through soluble factors under physiological condition. On the other hand, we demonstrated that BBB permeability was significantly increased at obese mice with impaired glucose tolerance induced by high-fat diet. TNF- α , which is increased in obesity, induced pericyte-derived MMP-9, leading to BBB dysfunction. Therefore, pericytes and pericytal MMP-9 may be involved in BBB dysfunction in and development of obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2010年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：神経生物学

1. 研究開始当初の背景

肥満症の形成・進展には、過剰エネルギー摂取による末梢での脂肪細胞への脂肪の過剰蓄積および脂肪細胞由来因子（アディポサイトカイン）の中枢における視床下部や交感神経系の調節が関与する。中でもレプチンは視床下部レプチン受容体を介して摂食抑制・エネルギー代謝亢進作用を現し、体重増加を制限する。このレプチンの血液脳関門（BBB）透過障害（BBB レプチン抵抗性）および視床下部摂食調節神経のレプチン応答性障害（視床下部レプチン抵抗性）は、摂食・代謝調節のフィードバック機構破綻をもたらし、肥満症形成・進展の成因となる。レプチン抵抗性を包含したアディポサイトカインによる肥満症形成の全貌を捉える分子機構は未だ不明であるが、BBB・視床下部神経レプチン抵抗性は脳血管内皮細胞および脳神経細胞の異常が肥満症の形成・進展に寄与することの証左である。

脳血管内皮細胞が脳ペリサイト、グリア細胞と共に構成する BBB と脳神経細胞は高度なネットワーク機能から成る「脳神経血管機構」を形成して高次脳機能を維持しており、この機能障害は様々な病態を引き起こす（Neuron. 2008;57:178）。そこで、本申請者はこれら両細胞の「中継制御装置」である脳ペリサイトに着眼し、肥満病態下における脳ペリサイト機能異常に起因する脳神経血管機構異常が肥満症進展に寄与する可能性を追求する。

本申請者はこれまでに脳血管内皮細胞—脳ペリサイトおよび脳ペリサイト—脳神経細胞の細胞間相互作用に着目し、脳ペリサイトの新たな役割を提示してきた。

脳ペリサイトによる BBB 機能制御：脳ペリサイトによる脳血管内皮細胞密着結合能および P-糖蛋白質（P-gp）機能増大を明らかに

し、この過程に脳ペリサイト産生（transforming growth factor- β ）TGF- β の促進的関与を指摘した（Brain Res. 2005;1038:208）。

(1) 脳ペリサイトの脳神経細胞保護作用：Tumor necrosis factor- α （TNF- α ）による脳神経細胞障害を脳ペリサイトが保護した（申請者予備データ）。

(2) BBB 機能障害に至る構成細胞間情報伝達による統合的制御：脳血管内皮細胞—グリア細胞および脳ペリサイト共培養系において、免疫抑制薬による BBB 機能障害が、グリア細胞由来一酸化窒素の増大および脳ペリサイト由来 TGF- β 減少を介して増悪されることが判った。（Eur. J. Pharmacol. 2004;505:51, Cell. Mol. Neurobiol. 2007;27:317）。

(3) 脳虚血時での脳ペリサイト機能異常：細胞外 ATP の枯渇によって、脳ペリサイトの matrix metalloproteinase（MMP）-9 産生が誘導された。

(4) 肥満増悪因子による脳ペリサイト機能異常：肥満増悪因子である TNF- α および中性脂肪トリオレインが脳ペリサイトからの MMP-9 産生を上昇させ、脳血管内皮細胞透過性を亢進させた。さらに TNF- α による MMP-9 産生亢進はレプチンにより抑制されたことから、脳ペリサイト MMP-9 産生は肥満関連因子感受性機構でもあることが判明した。

以上、本申請者の実験成績から脳神経血管機構の統合的制御において脳ペリサイトの促進的機能が示唆される（1, 2）一方、BBB 障害および虚血病態下では脳ペリサイトの TGF- β 産生減少および MMP 過剰産生を呈する脳ペリサイト機能異常が認められる（3, 4）。これらは脳ペリサイト機能異常が脳神経血管機構の破綻を規定する可能性を示す重要な実験証拠であり、本研究の着想の契機とな

った。

さらに肥満病態下ではレプチン脳移行量低下のため、肥満増悪因子による脳ペリサイト MMP-9 産生調節障害が惹起され得る (5)。脳ペリサイト機能異常の肥満症形成・進展における役割は不明であるが、上記本申請者の実験成績と脳内 TGF- β が視床下部ノルアドレナリン作動性神経を介して脂肪燃焼を引き起こすこと (Brain Res. 2007;1173:92)、MMP が体重増加に関与すること (Neuroreport. 2004;15:569) を考え合わせると、肥満病態下における脳ペリサイト機能異常の肥満症進展への関与が十分考えられる。

2. 研究の目的

メタボリック症候群の最上流に位置する肥満症は、視床下部一脂肪組織のフィードバック機構破綻によってもたらされる。本研究は、血液脳関門 (BBB) および視床下部機能を調節する「脳神経血管機構 (neurovascular unit)」の基幹細胞として「脳ペリサイト」を捉え、脳ペリサイト病変化 (肥満増悪因子による脳ペリサイト機能異常) を機軸とした肥満の進展機構を解明しようとするものである。本研究は肥満を改善するための新たな治療標的細胞・分子を提案する。

3. 研究の方法

肥満・糖尿病モデルマウスの作製; ICR マウスに high fat diet (HFD) を 2, 4, 8 週間負荷し、肥満・糖尿病モデルマウスを作製した。モデルマウスは、HFD 負荷期間依存的な体重増加・血糖値上昇を示した。

初代培養 BBB 構成細胞の採取; 3 週齢の wistar rat から脳血管内皮細胞および脳ペリサイトを単離培養した。アストロサイトは生後 1-2 日の wistar rat から単離培養した。

BBB 構成細胞の MMP-9 産生と細胞内情報

伝達経路; 脳血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを無血清培地で 12 時間処理した後、TNF- α (1,10,100 ng/mL) を 24 時間処理した。処理後、濃縮した培養上清中の MMP-9 を western blot 法により測定した。細胞可溶性分画を用いて、細胞内情報伝達物質である p44/p42、p38、JNK および Akt のリン酸化タンパク質量を測定した。さらにこれらタンパク質活性化に対する薬理的阻害剤を用いて、MMP-9 産生経路を明らかにした。TNF- α による MMP-9 産生における活性酸素種の関与を明らかにするため、NADPH oxidase 阻害剤の MMP-9 産生に対する影響を検討した。

視床下部神経細胞インスリン感受性の評価; 視床下部神経細胞株 GT1-7 にインスリンを 2 時間処理後、GT1-7 細胞内 Akt のリン酸化タンパク質発現量を指標として、インスリン感受性を評価した。GT1-7 インスリン感受性に対するペリサイトの影響は、ペリサイト培養上清を GT1-7 に 24 時間負荷した後に、インスリンを 2 時間刺激した際の Akt リン酸化タンパク質発現量の変化を用いて評価した。

視床下部神経細胞摂食調節ホルモン発現量の変化; GT1-7 の摂食調節促進ホルモン AgRP および抑制ホルモン POMC の発現量はリアルタイム RT-PCR を用いて測定した。GT1-7 の摂食調節ホルモンに対するペリサイトの影響は、ペリサイト培養上清を 24 時間負荷した GT1-7 の AgRP および POMC mRNA 発現量の変化を用いて評価した。

4. 研究成果

肥満による BBB 機能変化; sodium fluorescein (Na-F) の脳内移行量を BBB 機能の指標とし、肥満・糖尿病モデルマウスの BBB 機能変化を検討した。HFD 負荷期間依存的に Na-F の

脳内取り込み量が上昇したことから、肥満・糖尿病モデルマウスでは BBB 機能低下が起こることが明らかになった。モデルマウスにおいて血清中レプチン濃度が上昇していたことから、レプチンの BBB 機能に対する作用を *in vitro* BBB モデルを用いて検討した。レプチン濃度依存的に Na-F の脳内移行が減少したことからレプチンは BBB 機能を亢進させることが分かった。また、*db/db* マウスでは BBB 機能の変化は認められなかった。肥満に伴う BBB 機能低下は、血清中レプチン濃度上昇による直接的な作用ではなく、脳ペリサイトなどの細胞を介した間接的な作用であることが考えられる。

BBB 構成細胞脳ペリサイト病変化; 肥満状態で増加する TNF- α の脳ペリサイトへの影響を matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) を指標に検討した。TNF- α 処理により、濃度依存的に MMP-9 が産生された。また脳ペリサイト産生 MMP-9 が BBB 機能低下を引き起こすことが明らかになった。ペリサイトと共に BBB を構成する脳血管内皮細胞およびアストロサイトは、TNF- α 刺激による MMP-9 産生は認められなかった。これらのことから、TNF- α による病変化はペリサイト特異的であることが明らかになった。

ペリサイト MMP-9 産生経路; TNF- α による MMP-9 産生は、p44/p42、p38、JNK および PI3K 活性化阻害剤併用により抑制された。またペリサイト内 p44/p42、p38、JNK および Akt は TNF- α により活性化された。また NADPH oxidase 阻害剤併用においても、MMP-9 産生は抑制された。これらのことから、TNF- α は活性酸素種の生成、MAPK および PI3K/Akt 活性化経路を介してペリサイトからの MMP-9 産生が誘導されると考えられる。

視床下部神経摂食亢進ホルモン産生に対するペリサイトの影響; 視床下部神経細胞

GT1-7 にペリサイト培養上清を 24 時間負荷したところ、GT1-7 の摂食亢進ホルモン AgRP mRNA 発現量が有意に減少した。摂食抑制ホルモン POMC mRNA 発現量に変化は認められなかった。

視床下部神経インスリン感受性に対するペリサイトの影響; 視床下部神経細胞 GT1-7 にインスリンを刺激するとリン酸化 Akt 発現量は上昇する。ペリサイト上清は、インスリン刺激による GT1-7 Akt 活性化を有意に増強させた。アストロサイトは GT1-7 Akt 活性化に影響を及ぼさなかった。

本研究では、脳ペリサイトが視床下部神経のインスリン感受性および摂食調節ホルモン発現を調節することを明らかにした。肥満増悪因子である TNF- α がペリサイトからの MMP-9 産生を特異的に誘導する。これらのことから、肥満病態下では脳ペリサイトは病変化し脳ペリサイト由来 MMP-9 およびその他の液性因子が、視床下部神経のインスリン抵抗性および摂食調節不良の形成に関与している可能性がある。

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 7 件)

1. Partial hepatectomy aggravates cyclosporin A-induced neurotoxicity by lowering the function of the blood-brain barrier in mice.

Yamauchi A, Dohgu S, Takata F, Watanabe T, Nishioku T, Matsumoto J, Ohkubo Y, Shuto H, Kataoka Y.

Life Sci. 2011 88(11-12):529-534. 査読有

2. Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1.

Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Oda M, Harada E, Watanabe T, Nishioku T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y.

Microvasc Res. 2011 81(1):103-107. 査読有

3. Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice.

Nishioku T, Yamauchi A, Takata F, Watanabe T, Furusho K, Shuto H, Dohgu S, Kataoka Y.

Neurosci Lett. 2010 482(3):208-211. 査読有

4. Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function.

Dohgu S, Sumi N, Nishioku T, Takata F, Watanabe T, Naito M, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y.

Eur J Pharmacol. 2010 644(1-3):5-9. 査読有

5. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells.

Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y.

J Pharmacol Sci. 2010 112(2):251-254. 査読有

6. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia.

Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y.

Cell Mol Neurobiol. 2010 30(2):247-253. 査読有

7. 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. 2009 29(3):309-316. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 宮地晴樹、道具伸也、高田英友子、松本純一、高橋弘之、園木優唯、山内淳史、片岡泰文. 血液脳関門における脳ペリサイト特異的な TNF- α 誘発性 MMP-9 産生・放出機構. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 横浜

2. 高橋弘之、道具伸也、高田英友子、松本純一、渡辺拓也、山内淳史、片岡泰文. インスリンによる視床下部神経細胞の Akt 活性化に対する脳ペリサイトの促進的関与. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 横浜

3. 古野龍也、高田英友子、松本純一、高橋弘之、南里朋、山内淳史、道具伸也、片岡泰文. 低酸素病態下での脳ペリサイト MMP-9 産生における脳血管内皮細胞由来 CD39/ENTPDase1 の作用. 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 22 日 横浜

4. Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Takahashi H, Watanabe T, Koga M, Nishioku T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. Impaired blood-brain barrier functions in the pre-diabetic mice. 13th International Blood-Brain Barrier Symposium Zurich, Switzerland, September 2nd 2010

5. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Furuno T, Ichiki N, Kaneshima S, Miyaji H, Tao S, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS) facilitate TNF-alpha-induced up-regulation of MMP-9 production in the brain pericytes through Akt activation. 13th International Blood-Brain Barrier Symposium Zurich, Switzerland, September 2nd 2010
6. 高田芙友子、道具伸也、小原昂士、松本純一、西奥剛、山内淳史、首藤英樹、片岡泰文. 肥満および耐糖能異常を呈したマウスにおける血液脳関門機能障害. 第83回日本薬理学会年会 2010年3月18日大阪
7. 松本光輔、道具伸也、高田芙友子、松本純一、一木奈津子、峠沙也香、宮地晴樹、西奥剛、首藤英樹、山内淳史、片岡泰文. 脳ペリサイトの MMP-9 産生における活性酸素種の役割. 第83回日本薬理学会年会 2010年3月17日大阪
8. 町田崇、道具伸也、高田芙友子、松本純一、古野龍也、金嶋修司、渡辺拓也、首藤英樹、山内淳史、片岡泰文. カルシニユールン/NFAT 経路を介した脳ペリサイトの MMP-9 産生機構. 第83回日本薬理学会年会 2010年3月16日大阪
9. Takata F, Dohgu S, Wakigawa T, Matsumoto J, Harada E, Matsumoto K, Yamauchi A, Kataoka Y. TNF- α stimulates MMP-9 secretion in the brain pericytes by activating ERK1/2, JNK and PI3 kinase signaling pathway. 12th international symposium signaling at blood-brain and blood-retinal barrier, University College London, United Kingdom, September 10th 2009

10. Takata F, Dohgu S, Wakigawa T, Harada E, Matsumoto K, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y. Activated protein C inhibits TNF- α induced MMP-9 production in the brain pericytes. 8th cerebral vascular biology international conference, Sendai, Japan, July 1st 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 血液脳関門障害症候群治療薬

発明者: 高田 芙友子、片岡 泰文、道具 伸也、松本 純一、金嶋 修司

権利者: 福岡大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-277027

出願年月日: 2010年12月13日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 芙友子 (TAKATA FUYUKO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号: 70412575

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

片岡 泰文 (KATAOKA YASUFUMI)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号: 70136513

道具 伸也 (DOHGU SHINYA)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号: 60399186

松本 純一 (MATSUMOTO JUNICHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号: 10550064