

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790257

研究課題名（和文） 炎症細胞の脳特異的浸潤における脳血管内皮細胞－脳ペリサイト機構の役割

研究課題名（英文） Role of brain pericytes in migration of inflammatory cells across the blood-brain barrier

研究代表者

道具 伸也 (DOHGU SHINYA)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：60399186

研究成果の概要（和文）：炎症性中枢神経疾患における脳特異的な炎症細胞の浸潤が脳血管内皮細胞－脳ペリサイト間情報伝達によって惹起される可能性を追求し、自己免疫疾患における中枢神経変性の新たな治療標的を提供することを主眼とした。本研究の主要な成果を以下に示す。

(1)炎症性サイトカイン TNF- α はマウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) の ICAM-1 および VCAM-1 発現量を増加させた。(2) MBEC4－脳ペリサイト共培養では、TNF- α による接着分子 ICAM-1 および VCAM-1 発現増加作用は阻害され、マクロファージ細胞株である J774A.1 細胞の血液脳関門浸潤を抑制した。以上、脳ペリサイトは炎症性病態下における脳血管内皮細胞上の接着分子発現を抑制し、炎症細胞の脳実質への浸潤を抑制することが判った。

研究成果の概要（英文）：Multiple sclerosis is an autoimmune disease and associated with the infiltration of inflammatory cells into the brain parenchyma across the blood-brain barrier (BBB). Brain pericytes, a cellular component of the blood-brain barrier (BBB), share the basement membrane with brain endothelial cells and maintain the BBB functions. However, it is unclear whether brain pericytes participate in multiple steps of the infiltration of inflammatory cells across the BBB. Here, we investigated whether brain pericytes regulate macrophage migration and the expression of cell adhesion molecules using immortalized mouse brain endothelial cells (MBEC4) monolayer and co-cultured with primary culture of rat brain pericytes. TNF- α dose-dependently increased the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in MBEC4 cells. Pericytes inhibited these TNF- α -induced increases in ICAM-1 and VCAM-1 expression and the migration of J774A.1 cells, a mouse macrophage cell line, across MBEC4 cells. These findings suggest that brain pericytes block migration of the inflammatory cells across the BBB by inhibiting inflammatory cytokines-evoked expression of cell adhesion molecules in the brain endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症・免疫、脳ペリサイト

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (BBB) は脳血管内皮細胞を实

体とする循環血液と脳実質を隔てる障壁であり、免疫学的に脳内は聖域であるため常態下において免疫細胞が脳実質へ集積することはない。多発性硬化症は循環血液中の炎症細胞（白血球、マクロファージ）の脳実質への浸潤を契機とした脳実質内の炎症によって惹起される自己免疫疾患で、神経細胞の髄鞘脱落および BBB の破綻を特徴とした病理所見が認められる。炎症細胞の脳実質への浸潤は 1) 血管内皮細胞上の接着分子 (E-selectin 等) への捕捉・接着、2) ケモカイン (MCP-1、IL-8 等) による炎症細胞の活性化、3) 炎症細胞のインテグリン (LFA-1、VAL-4 等) と血管内皮細胞のインテグリンリガンド (ICAM-1、VCAM-1 等) を介した接着の強化、4) 血管外浸潤、という多段階連続的な結果として現れ、これらの過程には細胞遊走因子であるケモカインおよび接着分子が重要である。炎症細胞表面の接着分子である $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン (VAL-4) 抗体 (natalizumab) は、多発性硬化症治療薬として期待されたが完全な炎症細胞の脳浸潤抑制効果を示さなかった (Nat. Immunol., 2008; 9:117-118)。この成績は、炎症細胞の脳実質内への浸潤が血管内皮細胞と炎症細胞の接着のみで規定されないことを示している。また、病理像に見られる BBB の破綻は炎症細胞の脳実質内への浸潤を許容し得る。では、なぜ炎症細胞は特異的に血管内皮細胞に接着し、脳実質へ浸潤するのか？ 現在考えられている上記成因は、以下の点で脳特異的浸潤に対する合理的説明として不十分である。

(1) 末梢血管内皮細胞上にもセレクチン等の接着分子は発現しているにも関わらず、多発性硬化症では脳特異的に循環血液中の炎症細胞が血管内皮細胞上へ接着する。

(2) 血管内皮細胞上に存在するケモカインが炎症細胞活性化に必須である。これは末梢血管内皮細胞も産生することが知られる。

(3) 炎症細胞の脳実質への浸潤には BBB の破綻は必須ではないとされる。

本申請者は炎症性中枢神経疾患における炎症細胞の特異的な脳実質への浸潤を規定する要因として、BBB を構成する血管内皮細胞—脳ペリサイト間情報伝達に着目し、脳ペリサイトがケモカイン等の液性因子産生を介して血管内皮細胞上の接着分子発現および BBB 破綻を誘導・増強すると仮説した。

2. 研究の目的

本研究では、炎症細胞の脳実質への浸潤に至る各過程での血管内皮細胞—脳ペリサイト機構の役割を以下の点について末梢血管内皮細胞と比較し明らかにする。

(1) 脳ペリサイトによる血管内皮細胞上の接着分子 (セレクチン、インテグリンリガン

ド) 発現調節およびその機構

(2) 血管内皮細胞由来因子による脳ペリサイトの細胞遊走因子産生機序およびその役割

(3) 血液脳関門破綻過程における脳ペリサイトの役割

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 血液脳関門モデル作製：ラット大脳皮質から単離・培養した脳ペリサイトおよびマウス血管内皮細胞株 MBEC4 を培養インサート (Costar Transwell®) を用いて共培養し、*in vitro* 血液脳関門モデルを作製した。

(2) 接着分子発現量解析：上記モデルに炎症性サイトカインとして TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 を血管内皮細胞単独培養 (monolayer) および血管内皮細胞—脳ペリサイト共培養系 (coculture) の血液側に負荷し、一定時間後に血管内皮細胞を回収し、タンパク質を抽出する。血管内皮細胞上の接着分子である E-selectin、P-selectin、ICAM-1、VCAM-1 の発現量の変動を western blot 法にて比較した。

(3) 炎症細胞浸潤アッセイ：マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 を calcein-AM で蛍光標識後、*in vitro* 血液脳関門モデルの血液側に添加して、一定時間後に脳実質側に浸潤した細胞数を蛍光プレートリーダーで測定し、monolayer と coculture で比較した。

4. 研究成果

本研究では以下の知見が得られた。

(1) 脳ペリサイトは炎症性サイトカインである TNF- α によって、多様なサイトカイン、ケモカインを産生することが明らかとなった。なかでも CCL22, CCL5, CXCL2, CXCL1, CCL9, CCL20, CCL7, CXCL6, CCL2 は 40 倍以上も増加した。

(2) 血管内皮細胞株 (MBEC4) に TNF- α (1、5、10、20 および 50 ng/mL) を 24 時間処理した際の接着分子 (E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1、VCAM-1) の発現量の変化を検討したところ、TNF- α 処理により MBEC4 の E-Selectin、ICAM-1、VCAM-1 の発現量は濃度依存的に増加した。一方で、P-Selectin の発現量は変化しなかった。

(3) MBEC4 に TNF- α (20 ng/mL) を 0、1、3、6、12 および 24 時間処理した際の接着分子 (E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1、VCAM-1) の発現量の経時的变化を検討したところ、TNF- α 処理により MBEC4 の E-Selectin、ICAM-1、VCAM-1 の発現量は経時的に増加

した。一方で、P-Selectin の発現量は変化しなかった。

(4) MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (10 および 20 ng/mL) を 24 時間処理した際の E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量の変化を比較した。MBEC4/Pericyte co-culture 群では MBEC4 monolayer 群と比較して、TNF- α 処理による E-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量増加の有意な阻害が認められた (図 1 および 2)。P-Selectin の発現量に変化は認められなかった。

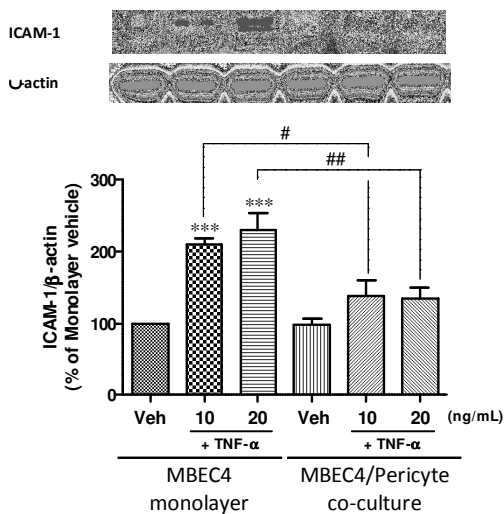


図 1. MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における TNF- α 誘導性 ICAM-1 発現量の変化

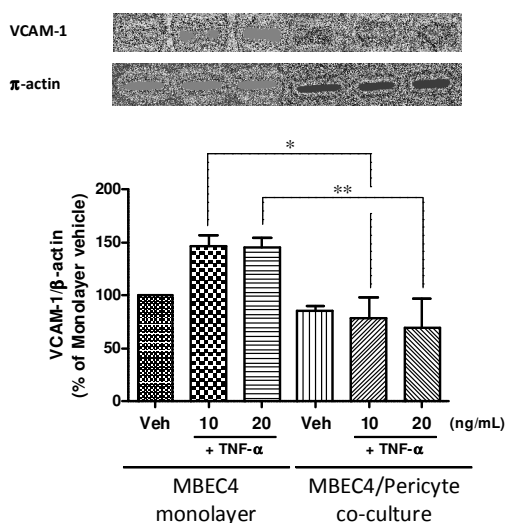


図 2. MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における TNF- α 誘導性 VCAM-1 発現量の変化

(5) MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に IL-6 (10, 20 および 50 ng/mL) を 24 時間処理した際の E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量の変化を比較した。IL-6 を処理した MBEC4 monolayer 群と MBEC4/Pericyte co-culture 群では、E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量は変化しなかった。

(6) MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に IL-1 β (10, 20 および 50 ng/mL) を 24 時間処理した際の E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量の変化を比較した。

IL-1 β を処理した MBEC4 monolayer 群と MBEC4/Pericyte co-culture 群では、E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量は変化しなかった。

(7) MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (20 ng/mL) を 24 時間処理した後のマクロファージ細胞株 (J774A.1 細胞) の脳実質側へ浸潤を比較した。TNF- α を処理した MBEC4/Pericyte co-culture 群では、MBEC4 monolayer 群と比較して有意にマクロファージの浸潤が抑制された (図 3)。

このとき、MBEC4/Pericyte co-culture 群と MBEC4 monolayer 群の FITC-アルブミンの透過係数には有意な差は認められなかった。

炎症性サイトカイン TNF- α はマウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) の ICAM-1 および VCAM-1 発現量を増加させた。また、多発性硬化症患者の血液中に多く認められる他の炎症性サイトカイン IL-6 および IL-1 β は ICAM-1 および VCAM-1 発現量を増加させなかったことから、TNF- α が主要な接着分子発現誘導因子であることが示唆された。

脳ペリサイト共培養下 (MBEC4/Pericyte co-culture) では、TNF- α によるこの接着分子発現増加作用は阻害され、マクロファージ細胞株である J774A.1 細胞の血液脳関門浸潤を抑制した。このとき、TNF- α によるアルブミンの血液脳関門透過に変化は認めなかった。これらの結果は炎症細胞の浸潤は脳血管内皮細胞間の密着結合の破綻によるものではなく、経内皮的に脳実質へ浸潤することを示唆する。

以上、脳ペリサイトは炎症性病態下における脳血管内皮細胞上の接着分子発現を抑制し、炎症細胞の脳実質への浸潤を抑制することが判った。この知見は炎症性病態下における炎症細胞の脳浸潤を防ぐ新たな治療標的として脳ペリサイトを提示するものである。

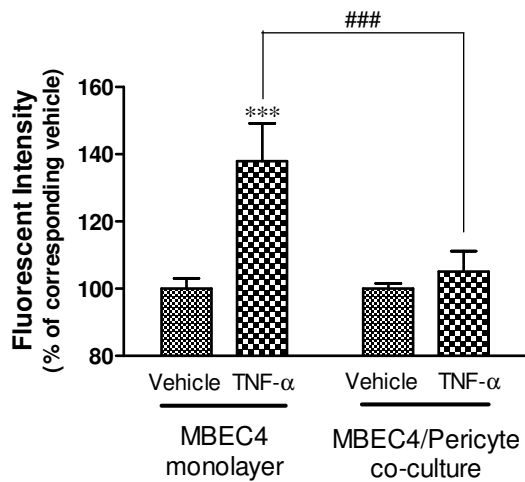


図 3. MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における J774A.1 細胞の浸潤

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 一木奈津子、道具伸也、他 6 名
Brain pericytes prevents migration of the inflammatory cells across the blood-brain barrier., Journal of Pharmacological Sciences, 115, Suppl. 1, 242P, 2011, 査読なし

[学会発表] (計 2 件)

- ① 一木奈津子、道具伸也、他 6 名
炎症細胞の脳浸潤における脳ペリサイトの役割、第 84 回日本薬理学会年会、平成 23 年 3 月 22 日—24 日、誌上開催
- ② 道具伸也
Regulation of MMP-9 production in the brain pericytes.、8th Cerebral Vascular Biology International Conference、平成 21 年 6 月 29 日、仙台、エクセルホテル東急

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道具伸也 (DOHGU SHINYA)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：60399186