

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790841

研究課題名(和文) 血液脳関門を介したA β 蛋白の脳からの除去促進機構の解明研究課題名(英文) The analysis of the transportation of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier

研究代表者

佐野 泰照 (SANO YASUTERU)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20379978

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病では血液脳関門(BBB)が障害されていると考えられているが、そのメカニズムは未解明であった。まず我々はA β 蛋白が血液脳関門にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果、A β 42蛋白がヒト脳微小血管内皮細胞の密着結合構成蛋白であるclaudin-5の発現を低下させ、バリア機能を低下させていることが明らかになった。また、アルツハイマー病に関わるさらなる問題点として、A β 蛋白の脳からの除去機構が十分に解明されていないことが挙げられる。そこで我々は、A β 蛋白が血液脳関門に発現するトランスポーターによって輸送されるか否かを検討した。結果、A β 40蛋白は血液脳関門に発現するABCG2というトランスポーターによって脳側から血液側へ輸送されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia. Although several in vivo studies suggest that the blood-brain barrier is compromised in AD brain, the underlying mechanisms remain unclear. In this study, we demonstrated that A β 42 decreased the expression of claudin-5 and disrupted the tight junction of human brain endothelial cell lines. In addition, we examined whether efflux transporters expressed in the BBB are involved in the transportation of A β across the BBB. Our in vitro study suggested that ABCG2 transcytosed A β 40 out of the brain across the blood-brain barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病, 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) に特徴的な老人斑アミロイドはA β 蛋白

からなり、A β の蓄積がADの発症や進展に関与しているとするアミロイド仮説は現在ADの病因として広く受け入れられている。しか

しAD脳でA β がアミロイドとして蓄積する機序についてはいまだ不明な点が多い。家族性ADの一部ではA β の産生亢進が発症に関与しているとされている。しかしながら孤発性のADに関してはA β の産生が亢進しているという証拠は得られていないため、A β の除去能力の低下がA β の脳内レベルを上昇させ、AD発症の一因となっている可能性が注目されている。脳内のA β は分解を受けずに血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を介して循環血液中へ排出されることが明らかになり、A β 除去機構として注目されている。BBBの首座は脳微小血管内皮細胞からなり、隣接する内皮細胞間に形成されたtight junctionによって細胞間隙を経由した物質透過は厳密に制限されている。したがって脳から血液中へA β が排出されるためにはBBBに存在する受容体やトランスポーターを介して内皮細胞をトランスサイトシスにより通過する必要があるが、そのメカニズムの詳細は未解明であった。また、アルツハイマー病では血液脳関門 (BBB) が障害されていることが多くの研究であきらかになっているものの、そのメカニズムは不明であった。とりわけA β 蛋白自体がBBBにどのような影響をおよぼすのかという疑問に対する研究は十分になされていない状況であった。

2. 研究の目的

(1) A β 蛋白自体がBBBにどのような影響をおよぼすのか、
(2) A β 蛋白はBBBを介してどのように排出されるのか、
の2点を我々の研究室で樹立したヒトin vitro BBBモデルを用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) A β 蛋白自体がBBBにおよぼす影響の解析
直径0.4 μ mのポアを有するcell culture insertの底面にtype Iコラーゲンを塗布した後、ヒト脳微小血管内皮細胞を播種し、ヒトin vitro BBBモデルとした。内皮細胞層の接着面が生体での内皮細胞の基底膜に相当し、その上のコンパートメントが血液側に該当し、insert底面の下のコンパートメントが脳側に相当する。このモデルの上側のコンパートメントにA β 40およびA β 42蛋白を添加し、バリア機能を表す指標である電気抵抗値がどのように変化するかを検討した。また、同じ実験系で、A β 蛋白添加48時間後に内皮細胞からmRNAを抽出し、密着結合構成分子であるclaudin-5, occludin, ZO-1の発現がcontrol群 (A β 蛋白を添加していない群) のそれらの発現量と異なっているかどうかを

リアルタイムPCRにて検討した。

(2) A β 蛋白のBBBを介した排出メカニズムの解析

まずcell culture insertの底面の裏側にtype Iコラーゲンを塗布した後、ヒト脳微小血管内皮細胞を播種した。内皮細胞がconfluentになったのを確認したのち上下を逆にし、細胞培養液を有した24 well培養dishに入れた。その後、insertの上側 (内皮細胞の生えていない側)にも培養液を加えた。この場合、内皮細胞層の接着面が生体での内皮細胞の基底膜に相当し、その上のコンパートメントが脳内に該当し、内皮細胞層の下のコンパートメントが循環血液側に相当することになる。上側のコンパートメントに¹²⁵Iのラジオアイソトープにて標識されたA β ₄₀を加えると、これらのA β は内皮細胞に発現している何らかの輸送担体の働きにより下側のコンパートメントへと輸送される。これは生体でA β が脳からBBBを介して血液側へ排出されることに相当する。ガンマカウンターにて上下のコンパートメントの放射能を測定することによりA β がこの細胞層を通過する程度が把握できる。このシステムを基本体系としてeffluxトランスポーターであるMRP-1とABCG2の阻害剤を用いて、MRP-1およびABCG2がA β 40蛋白のBBBを介した輸送に関わっているかどうかを検討した。

4. 研究成果

1) A β 蛋白自体がBBBにおよぼす影響の解析
A β 40蛋白を添加した群ではcontrol群に比し電気抵抗値も密着結合構成分子の発現量も有意な差は認めなかったものの、A β 42蛋白を添加した群ではcontrol群に比し電気抵抗値が有意に低下し、密着結合構成分子のうちclaudin-5の発現量が有意に低下した。これはA β 蛋白、とくにA β 42蛋白自体がBBBを破壊させている可能性を示唆する非常に興味深い実験結果であり、ADにてBBBの機能不全が生じる機序を解明する上で非常に有用な知見となりうる。

2) A β 蛋白のBBBを介した排出メカニズムの解析

MRP-1の阻害剤はin vitro BBBモデルに対するA β 40の透過性に影響を及ぼさなかったが、ABCG2の阻害剤はこのBBBモデルにおいて脳側から血液側へのA β 40の透過性を有意に低下させた。すなわちABCG2がA β 40蛋白の脳から血液側へのBBBを介した排出に関与している可能性が示唆された。この知見は、ADの病態解明への一助になるとともに、A β の脳内濃度を減少させるという新たなADの治療あるいはADの予防法開発に進展しうるといふ点で非常に意義深いものである。

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4件)

① Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Kawai M, Kanda T. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5 Neurochem Res. 36:849-855. 2011

査読有

② Shimizu F, Sano Y, Abe MA, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors.

J Cell Physiol. 226:255-266. 2011. 査読有

③ Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M, Kanda T. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. J Cell Physiol. 225:519-528. 2010. 査読有

④ Sonobe Y, Takeuchi H, Kataoka K, Li H, Jin S, Mimuro M, Hashizume Y, Sano Y, Kanda T, Mizuno T, Suzumura A. Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase Cepsilon-dependent manner. J Biol Chem. 284:31834-31842. 2009 査読有

[学会発表] (計9件)

① Yasuteru Sano and Takashi Kanda A β 42 species disrupt the blood-brain barrier through the down-regulation of claudin-5 Neuroscience 2010 2010年11月13日 San Diego, USA.

② Hiroyo Haruki, Yasuteru Sano, Fumitaka Shimizu, Tsutomu Nakata, Takashi Kanda. Establishment of gliovascular unit model to reveal of pathogenesis of neuromyelitis

optica. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010. 2010年8月21日. 京都, 京都ガーデンパレス.

③ Yasuteru Sano, Fumitaka Shimizu, Hiroyo Haruki, Kazuyuki Saito, and Takashi Kanda

Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. The First International Conference on Neural Tissue Culture. 2010年6月25日 Seoul, Korea.

④ 佐野泰照, 清水文崇, 柏村陽子, 春木明代, 神田 隆 アミロイド β 蛋白のヒト脳微小血管内皮細胞の tight junction への影響 第51回日本神経学会総会. 2010年5月21日. 東京, 東京国際フォーラム.

⑤ 清水文崇, 佐野泰照, 藤澤美和子, 柏村陽子, 春木明代, 神田 隆: Neuromyelitis optica (NMO) 患者血清が血液脳関門 (BBB) に及ぼす影響の解析. 第22回日本神経免疫学会学術集会. 2010年3月18日 東京, 日経ホール.

⑥ Yasuteru Sano Effect of amyloid β on tight junction of the new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line Neuroscience2009 2009年10月21日 Chicago, USA.

⑦ Yasuteru Sano The effect of IFN- β 1b on the human *in vitro* blood-brain barrier model 第8回脳血管国際会議 2009年6月29日 仙台, 仙台エクセルホテル東急.

⑧ 佐野泰照, 前田敏彦, 柏村陽子, 安部真彰, 清水文崇, 鈴木倫保, 神田隆 血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の作用機序の検討 第50回日本神経学会総会 2009年5月21日 仙台, 仙台国際センター.

⑨ 佐野泰照, 柏村陽子, 前田敏彦, 安部真彰, 清水文崇, 鈴木倫保, 寺崎哲也, 神田隆 血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の同定およびそのメカニズムの検討 第21回日本神経免疫学会学術集会 2009年3月12日 大阪, 大阪国際会議場.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 泰照 (SANO YASUTERU)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20379978

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし