

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07414

研究課題名（和文）グリア系細胞におけるタイトジャンクションの意義と神経病態への関与

研究課題名（英文）Significance of tight junctions in glial cells and their involvement in neuropathology

研究代表者

佐々木 勉（Sasaki, Tsutomu）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授（常勤）

研究者番号：20534879

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞後のBBB内皮細胞ではCRTC1依存性にmiR-132を介しCldn-1, TJAP-1の発現を制御していた。occludinはアストロサイトにも発現し、occludin-KOマウスの検討より脳梗塞サイズが増大し、神経機能が有意に悪化。脳梗塞後のsc-RNAseq解析により、Cldn-5は血管内皮に特異的、Cldn-10はアストロサイトに特異性が高く、Cldn-11は希突起膠細胞に発現が多かった。アストロサイト特異的Cldnマウスは虚血性神経障害に寄与しており、脳梗塞後ではアストロサイト、脳血管内皮でのCldn、occludinなどのTJ蛋白が協調しBBB機能を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞急性期の治療は血栓回収療法により大きく進歩した。しかしながら、更なる予後の改善には、新たな治療法の開発が必要である。脳梗塞の病態においてはBBBの障害を制御することは非常に重要である。BBBの血管内皮はCldn-5の発現が殆どであるが、Cldn-5に対する治療介入は影響が大きすぎ現状では難しく、BBBを構成するその他のTJ蛋白を制御することが治療上重要と考えられる。本研究を通じて、血管内皮だけでなく、アストロサイトに発現するCldnがBBB機能に寄与することが分かった。本研究の成果は、今後、AAV-CldnやTJを標的とした薬剤を用いBBB制御による脳梗塞の新規治療の開発に繋がらう。

研究成果の概要（英文）：Expression of Cldn-1 and TJAP-1 was regulated via miR-132 in CRTC1-dependent manner in BBB endothelial cells after cerebral infarction. Occludin is also expressed in astrocytes, and increased infarct size and significantly worse neurological function were observed in the occludin-KO mice. Post-infarction sc-RNAseq analysis revealed that Cldn-5 was specific for vascular endothelium, Cldn-10 was highly specific for astrocytes, and Cldn-11 was highly expressed in oligodendrocyte. Astrocyte-specific Cldn KO mice contributed to ischemic neuronal injury. This suggests that TJ proteins such as Cldn and occludin in astrocytes and cerebral vascular endothelium cooperate to regulate BBB function after stroke.

研究分野：神経内科、脳卒中

キーワード：タイトジャンクション グリア細胞 血管内皮細胞 クローディン オクルディン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) BBB の重要な研究対象として、物理的バリアの中核である脳血管内皮細胞の細胞間接着装置タイトジャンクション(Tight Junction; TJ)が知られる。特に Cldn5 は脳血管内皮細胞の TJ を構築することが知られ、統合失調症や鬱病などの精神・神経疾患の増悪因子としても近年注目されている(Greene et al, Mol Psychiatry 2018; Menard et al, Nat Neurosci 2017)。こうした状況のなか申請者らは、Cldn5 以外で脳に高発現する Cldn10b、occludin がアストロサイトに発現することを見出した。

(2) アストロサイトが形成する endfoot と呼ばれる突起構造は、脳血管内皮細胞の周囲をくまなく覆い、BBB を強化する(Kisler et al, Nat Rev Neurosci 2017)。他方、脳血管障害、神経変性疾患の病態において、BBB の血管内皮細胞とアストロサイトにおいてどのような TJ 蛋白が発現し、それらがお互いにどのように協調しながら BBB 機能を制御しているか、又、アストロサイトにおける TJ が BBB 機能に影響があるかについて不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、アストロサイト、血管内皮における TJ の構築メカニズム、お互いの相互作用、生理的意義、神経疾患における病態生理的意義を解明し、BBB の操作技術を開発することを目的とした。本研究により、BBB の構築・制御原理や神経病態に対する治療戦略が新規に開発されると期待される

### 3. 研究の方法

(1) アストロサイト初代培養系、血管内皮、in vivo マウスを用いて、脳梗塞後における各種 Cldn、Cldn の重合制御に必須な裏打ち蛋白質である ZO-1 や ZO-2、膜蛋白質であるオクルディンやトリセルリンなどの発現を検討する。

(2) occludin KO マウス、各種 Cldn KO、astrocyte 特異的 cKO マウスなどによる脳梗塞後の細胞障害を検討。又、我々は cAMP 経路が BBB 機能に寄与することを発見(Kanki H, Sasaki T et al, J Neurosci 2020)、cAMP の下流の CRTC などの影響を遺伝子改変マウスを用いて検討。

### 4. 研究成果

(1) 我々は cAMP の下流の CRTC が脳虚血において重要であることを示してきた(Sasaki T et al, Neuron, 2011, Kanki H, Sasaki T et al, J Neurosci, 2020)。このため、CRTC1KO マウスに脳梗塞を作成すると、CRTC1KO マウスでは梗塞サイズ、神経機能予後が増悪することに加えて、BBB 障害が増悪していた。これは、CRTC1 依存性に miRNA-132 が制御されているが、miRNA-132 が TJ の裏打ち蛋白である TJAP-1 及び Cldn-1 の 3' UTR の miRNA-132 結合配列を介して制御していることを qPCR, 3UTR-luciferase の mutant 研究より証明した(図1)。

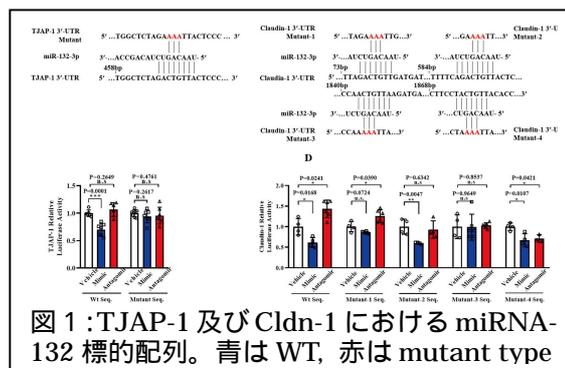


図1:TJAP-1 及び Cldn-1 における miRNA-132 標的配列。青は WT, 赤は mutant type

(2) 脳梗塞後の血管内皮における Cldn-5 と Cldn-1 については、脳梗塞後において Cldn-5 発現は低下し、Cldn-1 発現は上昇するが、CRTC1KO マウスにおいて Cldn-1 発現が顕著に上昇していた。脳梗塞後の BBB において異なる Cldn、つまり、Cldn-1/Cldn-5 の発現様式が BBB の機能に寄与していることが分かったことは新たな発見であり(図2, Yan H, Sasaki T et.al. Cell death dis, 2022 より改変引用) 今後の脳梗塞後の BBB 制御を考える上で重要な視点を齎すと考えられた。

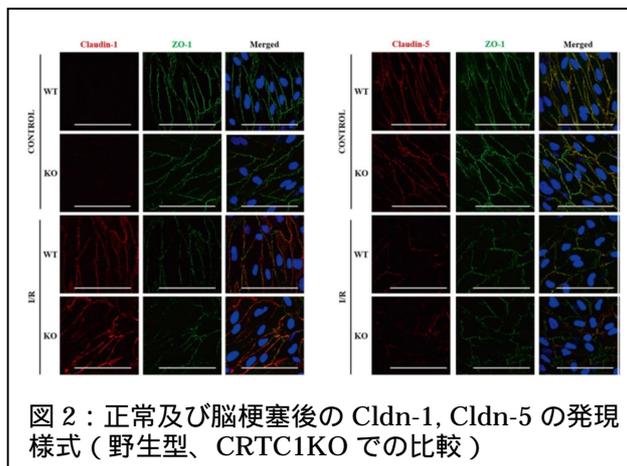


図2: 正常及び脳梗塞後の Cldn-1, Cldn-5 の発現様式(野生型、CRTC1KO での比較)

(3) 我々はアストロサイトに TJ の構築と機能の分子基盤である接着分子クロロディン(Cldn)が発現することを見出した(図3)。そこで、神経病態下における、特に、脳梗塞後における BBB におけるアストロサイト、血管内皮における Cldn、オクルディン(occludin)などの TJ 蛋白の動態を検討した。Occludin

も BBB では、脳血管内皮に加えて、アストロサイトにも発現している。

(4) 脳梗塞後の BBB の主な TJ 関連蛋白について検討した。オクルディン、Cldn-5, ZO-1 の mRNA 発現は急性期から低下し、オクルディンと同じ MARVEL ファミリーのトリセルリンは脳梗塞後 6 時間まで維持されていたが、その後徐々に減少(図4)。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、Cldn-5 と ZO-1 の発現が低下した。このトリセルリンの発現は未だに報告されておらず、BBB を考える上で非常に重要であり、今後、脳梗塞後の BBB 制御を介した治療戦略において重要と考えられる。

(5) 次に、occludin ノックアウトマウスを作成し意義を検討。オクルディンは生理的な状態においてはノックアウトマウスを作製しても BBB の構築は保たれ、他方、in vivo での検討も少なく、病態での意義も不明のため検討した。オクルディン KO マウスでは、脳梗塞による梗塞サイズが増大し、神経機能が急性期から慢性期まで悪化し、死亡率が上昇した(図5, Sugiyama S, Sasaki T et.al., *Sci Rep*, 2023 より改変引用)。

(6) オクルディン KO では WT よりクローディン-5 と ZO-1 の mRNA、蛋白発現量が低下していた(図6)。分子量 10kDa の蛍光ラベルデキストランの血管外漏出は、脳梗塞後 7 日後でも KO が野生型よりも増大していた。これらの検討より、オクルディンは、特に脳梗塞後において、Cldn-5 と ZO-1 の発現を制御することにより BBB 機能を調節し、脳梗塞後の急性期から慢性期に至るまで BBB 障害に関与し、神経学的な悪化をもたらしていた。このように、脳梗塞後などの神経病態においては、オクルディンと各種 Cldn 及び、裏打ち蛋白である ZO-1 などが相互制御しながら BBB 機能を維持していることが分かった。

(7) オクルディン KO を検討する中で、オクルディンが血管新生に関与していることもわかり、これはオクルディンの新たな機能を示唆するものである(図7)。

(8) 顕微鏡による解析を他の方法にて検証した。脳梗塞後の各種 Cldn の発現を詳細に検討するために、シングルセル RNAseq(sc-RNAseq)を施行した。従来まで脳で報告されてきた Cldn について検討すると、脳梗塞後においても Cldn-3 の発現はなく、Cldn-5 は血管内皮に特異的であり、Cldn-10 はアストロサイトに特異性が高いことが示唆された。また、既報通り、Cldn-11 はオリゴデンドロサイト、線維芽細胞様細胞に発現が多いことが分かった。これら sc-RNAseq によるアストロサイトにおける Cldn-10 の発現様式は、我々の顕微鏡解析、qPCR とも相関している。また、我々も、Cldn-3 の脳梗塞後の役割を検討するために、Cldn-3 KO マウスを作製し脳梗塞を作成したが、梗塞サイズなどでは野生型と顕著な差がないことがわかり、sc-RNAseq において Cldn-3 が発現していないことと一致するとも思われた。

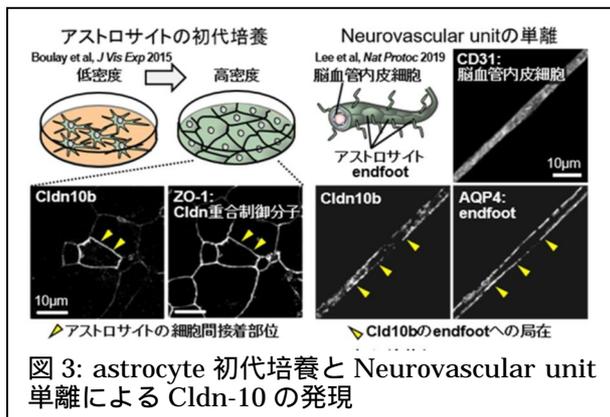


図3: astrocyte 初代培養と Neurovascular unit 単離による Cldn-10 の発現

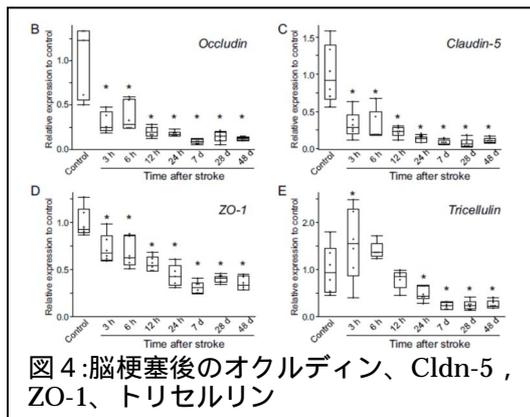


図4: 脳梗塞後のオクルディン、Cldn-5, ZO-1、トリセルリン

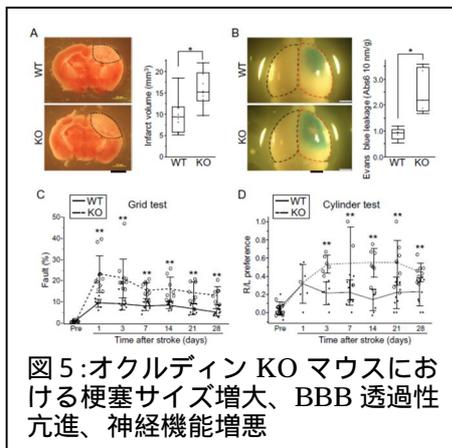


図5: オクルディン KO マウスにおける梗塞サイズ増大、BBB 透過性亢進、神経機能増悪

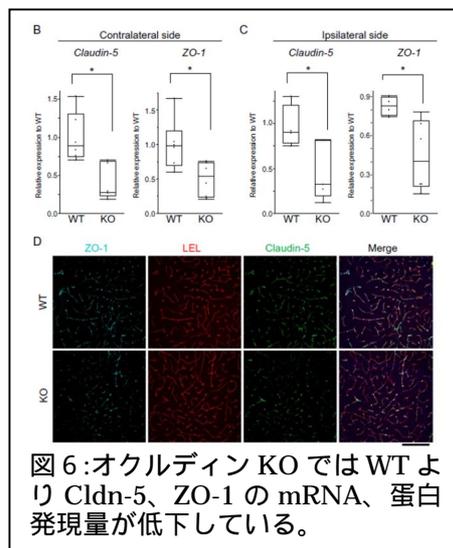


図6: オクルディン KO では WT より Cldn-5、ZO-1 の mRNA、蛋白発現量が低下している。

(9)次に、astrocyte 特異的 cKO マウスを作製し、脳梗塞モデルを作製した。アストロサイト特異的 Cldn KO マウスにおいて、梗塞サイズや神経機能は野生型と比して差があり、アストロサイトにおける Cldn が脳梗塞後の BBB 機能に寄与することが示唆された(現在、論文投稿準備中)。脳梗塞後では脳血管内皮細胞での occludin, Cldn-5 と ZO-1 と、アストロサイトにおける occludin、及び、Cldn が協調して機能していることが示唆された。

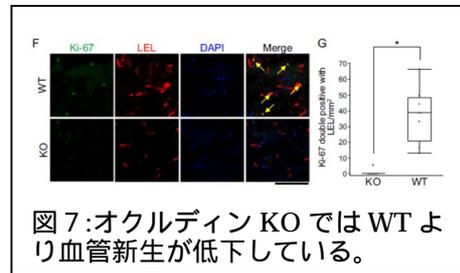


図7:オクルディン KO ではWT より血管新生が低下している。

(10)ヒトの脳梗塞患者の死後脳において梗塞部位の Cldn-5、Cldn-10、ZO-1 の発現を免疫染色にて検討した。Cldn-5 については、図8に示すように、脳梗塞部位内部、梗塞の外にある血管に強陽性を示したが、梗塞内部の血管において、Cldn-5 の脱落は均一に低下するのではなく、不均一に低下していた。

他方、Claudin-10、ZO-1 はいずれも染色像が得られず(図9)抗体、染色条件など更なる検討を進めている。今回の脳梗塞患者における Cldn-5 の不均一な脱落は、脳梗塞内部であれば均一に Cldn-5 が脱落するであろうという従来の予測を覆し、今後の脳梗塞後の BBB への治療介入を検討する上で、重要な示唆を示している。

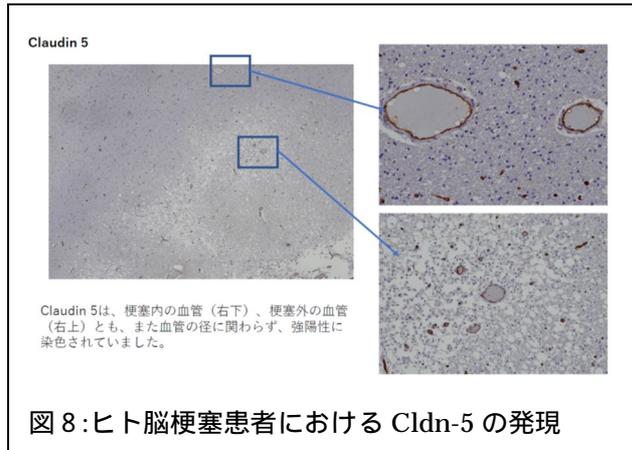


図8:ヒト脳梗塞患者における Cldn-5 の発現

(11) AAV-Cldn5、AAV-Cldn-10 を作製して、初代アストロサイト、in vivo への遺伝子治療をこころみるも、安定した発現が得られなかった。今回の検討は、カプシド血清型を9型を用いて作成したため、更に、AAV-9の変異型、その他の血清型を用いた検討を施行する予定である。

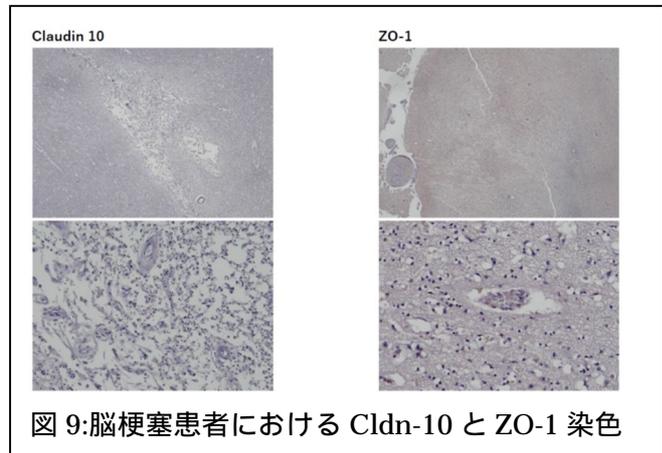


図9:脳梗塞患者における Cldn-10 と ZO-1 染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3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 -

1. 著者名 Yan Haomin, Sasaki Tsutomu, Kanki Hideaki, Hirata Yoshiyuki, Nishiyama Kumiko, Hisada Sunao, Matsumura Shigenobu, Nagaoka Yasuo, Sumiyoshi Takaaki, Nagano Seiichi, Nakata Akiko, Yoshida Minoru, Uesato Shinichi, Mochizuki Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 MDMX elevation by a novel Mdmx <sup>p53</sup> interaction inhibitor mitigates neuronal damage after ischemic stroke	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25427-4	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 -

1. 著者名 Yan Haomin, Kanki Hideaki, Matsumura Shigenobu, Kawano Tomohiro, Nishiyama Kumiko, Sugiyama Shintaro, Takemori Hiroshi, Mochizuki Hideki, Sasaki Tsutomu	4. 巻 7
2. 論文標題 MiRNA-132/212 regulates tight junction stabilization in blood brain barrier after stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-021-00773-w	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10件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yan Haomin, Sasaki Tsutomu, Kanki hideaki, Nishiyama Kumiko, Nagano Seiichi, Mochizuki Hideki
2. 発表標題 Mdmx plays a crucial role in neuronal damage after ischemic stroke.
3. 学会等名 第28回遺伝子細胞治療学会学術集会 (JSGCT2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shintaro Sugiyama, Tsutomu Sasaki, Hiroo Tanaka, Yan Haomin, Takeshi Ikegami, Hideaki Kanki, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita, Hideki Mochizuki.
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回日本神経学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 勉
2. 発表標題 急性期脳梗塞のHot topics 基礎と病理
3. 学会等名 第41回日本画像医学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 佐々木勉、Yan Haomin、神吉秀明、河野友裕、杉山慎太郎、松村成暢、望月秀樹
2. 発表標題 Examination of regulation of expression of nAChR by TMEM35 after cerebral ischemia
3. 学会等名 第62回日本神経学会総会.
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yan Haomin、神吉秀明、河野友裕、杉山慎太郎、西山久美子、松村成暢、望月秀樹
2. 発表標題 MiRNA-132 / 212 regulates Tight Junction Stabilization in Blood-Brain Barrier after Stroke
3. 学会等名 第62回日本神経学会総会.
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Shintaro Sugiyama, Tsutomu Sasaki, Hiroo Tanaka, Yen Haomin, Hideaki Kanki, Atsushi Tamura, Sachiko Tsukita, Hideki Mochizuki
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回日本神経学会総会.
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 佐々木勉、権泰史、河野友裕、岡崎周平、松村泰志、Huang Ao, 服部聡、藤堂謙一、望月 秀樹
2. 発表標題 がん診断時の好中球/リンパ球比はがん診断から2年以内の脳梗塞発症を予測する
3. 学会等名 Stroke 2022 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 佐々木勉、神吉秀明、河野友裕、西山久美子、久田素、松村成暢、望月秀樹
2. 発表標題 スフェロイド神経培養におけるCa <sup>2+</sup> 振動に対する塩誘導性キナーゼSIKの影響
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神経再生促進のチャレンジと脳梗塞メカニズムの検討
2. 発表標題 佐々木勉
3. 学会等名 第65回日本神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sasaki T, Kanki H, Kawano T, Yan H, Ikegami T, Nishiyama K, Okazaki S, Todo K, Matsumura S, Nagano S, Mochizuki H
2. 発表標題 Effect of salt-inducible kinase on Ca <sup>2+</sup> oscillations in primary neuronal cultures
3. 学会等名 第65回日本神経学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 佐々木 勉、権 泰史、藤堂 謙一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 703
3. 書名 最新臨床脳卒中学（第2版）上 最新の診断と治療 治療概論 慢性期の内科治療	

1. 著者名 藤堂 謙一、佐々木 勉、望月 秀樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 703
3. 書名 最新臨床脳卒中学（第2版）下 最新の診断と治療 ラクナ梗塞の急性期治療	

〔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
研究分担者	田村 淳  (Tamura Jun)  (00362525)	帝京大学・医学部・准教授    (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	松村 成暢  (Matsumura Shigenobu)  (70467413)	大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・准教授    (24403)	

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