

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15092

研究課題名（和文）血液脳関門を強化するアストロサイトでのタイトジャンクションの構築

研究課題名（英文）Astrocytes form tight junctions to organize blood brain barrier

研究代表者

田中 啓雄（Tanaka, Hiroo）

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：70795905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：生体が有する最も強固なバリアシステムの一つとして血液脳関門（BBB）が知られる。BBBを構成する脳血管内皮細胞は、細胞間接着装置タイトジャンクション（TJ）を介して互いに接着して脳血管を構築する。このときTJは内皮細胞間の隙間を密閉し、強固な細胞間バリアとして機能する。本研究では、脳血管の周囲をくまなく覆う間葉系細胞のアストロサイトが、神経病態下にてTJを構築し、BBBを強化する可能性を見出し、アストロサイトにおける未知のTJ構築/制御原理と、それによる脳機能保護メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来の脳血管内皮細胞を中心としてきたBBBの構築/制御原理に新機軸を生み出し、神経疾患に対する新規治療戦略の提示や、脳内へのドラッグデリバリーシステムの開発基盤の開拓につながった。また、クロロディンを含む様々なTJ関連分子による細胞間バリア構築制御メカニズムも明らかにでき、TJの多様性構築原理の理解につながった。

研究成果の概要（英文）：The blood-brain barrier (BBB) is known as one of the most robust barrier systems in living organisms. It is known that in BBB, tight junctions (TJs) seal the gaps between brain endothelial cells, functioning as a strong intercellular barrier. In this research, we have discovered that astrocytes, mesenchymal cells that thoroughly cover the surroundings of cerebral blood vessels, potentially construct TJs under neuropathological conditions, thereby strengthening the BBB. This research has revealed new evidence for the regulation of astrocyte-based BBB organization, providing novel strategic interventions for the BBB in neurological disorders.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生体バリア 血液脳関門 細胞間バリア タイトジャンクション クロロディン

## 1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の主要な構成要素として、脳血管内皮細胞にて構築される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。脳血管内皮細胞はTJを介して互いに接着し、隙間のない脳血管構造をつくる (図1)。このときTJは内皮細胞間の隙間を密閉して、物質透過を制限し、強固な細胞間バリアを構築する。一般的にTJは、細胞間接着分子クローディン (Claudin: Cldn) が互いに相互作用し、TJストランドと呼ばれる線状の重合体を形成して構築される (代表者ら和文/英文総説 Ann N Y Acad Sci 2017; Trends Biochem Sci 2019; 膜タンパク質工学ハンドブック 2020) (図1)。

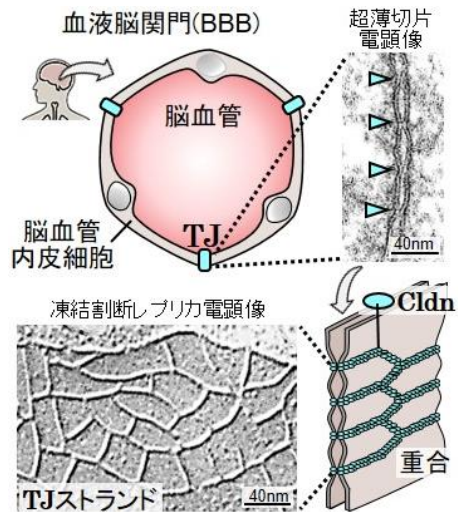


図1. Cldnを基盤に構築される脳血管内皮細胞 TJ

Cldnの特徴として、27種のメンバーからなるファミリーを形成し、各メンバーが示す細胞間バリア特性が異なることが挙げられる (代表者ら FEBS Lett 2011)。多くはTJを介した物質透過を制限するバリア型Cldnに分類される。なかでもバリア型Cldn5は脳血管内皮細胞のTJを構築するため、BBB研究において最も重要な研究対象のひとつとされ、また、統合失調症や鬱病への関与から近年注目される (Menard et al, Nat Neurosci 2017; Greene et al, Mol Psychiatry 2018)。一方で、一部のCldnはチャンネル型とされ、TJを介した物質透過を制限しながらも、TJ内に細胞間チャンネルを形成し、イオンや水を選択的に透過させる。代表者はCldn分子種の多様性に着目してきた経緯から、特定のCldn分子種が、脳血管内皮細胞の周囲に存在する間葉系脳グリア細胞のアストロサイトの高発現することを発見した。アストロサイトはendfootと呼ばれる足突起を形成して脳血管の周囲をくまなく覆い、また、神経病態下に活性化して脳炎症の拡大を抑制すると知られる (Kisler et al, Nat Rev Neurosci 2017)。神経病態下に活性化したアストロサイトは、endfoot間の接着部位にTJを構築し、BBBを強化する可能性が示された。

## 2. 研究の目的

アストロサイトや脳血管内皮細胞における TJ の構築/制御原理と、これらが一体となって脳機能を保護するメカニズムを解明し、新しい BBB の構築/制御原理を提示する。

## 3. 研究の方法

神経病態下にて、脳血管内皮細胞や活性化したアストロサイトが、Cldnを含む TJ 関連分子を基盤に、脳機能を保護する機構を明らかにする。アストロサイトについての実験系では、in vitro 系 (アストロサイト初代培養系)、semi-in vivo 系 (アストロサイトの endfoot 構造を保持した単離脳血管) を用い、in vivo マウス個体レベルでの解析を補完する。特に個体レベルでの解析では、光凝固法による脳梗塞や、MOG ペプチド投与による脳脊髄炎などの神経病態マウスモデルを作製する。また、Cldnに加えて、BBBの構築制御に関わると想定されえるオクルディンや TJ 裏打ちタンパク質を含む TJ 関連タンパク質などの細胞間バリア構築制御メカニズムについても明らかにする。

#### 4. 研究成果

① **BBBにおける TJ 構築メカニズム** マウス脳切片の蛍光抗体染色を行い、超解像顕微鏡イメージングを行った。脳血管内皮細胞マーカーである CD31、アストロサイトの endfoot マーカーである AQP4、および、Cldn の共染色により、特定の Cldn 分子種が脳血管内皮細胞を覆うように局在し、AQP4 と共局在していた。この結果から、アストロサイトの endfoot に特定の Cldn 分子種が存在することを明らかできた(図 2)。これらのマウス脳切片から得られた結果は、マウスから単離した semi-in vivo 単離脳血管でも再現された。一方で、TJ の構築には Cldn だけでなく、その重合制御に必須な裏打ちタンパク質 ZO-1/ZO-2 や膜タンパク質オクルディン/トリセルリンなども必要である。これらの TJ 構築分子が、神経病態下にて、活性化したアストロサイトの endfoot に集積することを示すため、in vitro アストロサイト初代培養系での検討を行った。マウス由来のアストロサイト初代培養系では、IL1 $\alpha$ /TNF $\alpha$ /C1q などのサイトカインを添加することで、アストロサイトが活性化されることが知られる。サイトカインの添加により、アストロサイトの細胞間接着部位に Cldn だけでなく、オクルディンや ZO1 などの TJ 関連タンパク質が集積することを明らかにした。以上の結果から、脳血管内皮細胞だけでなくアストロサイトに分布する Cldn などの TJ 関連分子が BBB を構築制御する可能性が示された。

② **BBB を構成する TJ の細胞間バリア/細胞間チャネル特性** 脳血管内皮細胞やアストロサイトには数種の Cldn が発現分布する。これらの Cldn 分子種の細胞間バリアや細胞間チャネル特性について、培養上皮細胞系で評価した。これらの Cldn 分子種は、細胞間バリアまたは細胞間チャネルを構築するだけでなく、他の Cldn 分子種との共発現下でその特性が様々に変化することが明らかにでき、TJ の多様性構築原理の理解が得られた。今後、個体レベルでのさらなる検討が必要である。

③ **BBB を構成する TJ による脳機能保護メカニズム** アストロサイトと脳血管内皮細胞との関連の視点から BBB 研究を進めていく過程で、脳血管内皮細胞のタイトジャンクション構成分子オクルディンが神経病態に関わる知見が共同研究により得られた。野生型マウスにて、光凝固法による脳梗塞モデルを作製したところ、脳血管内皮細胞にてオクルディンの発現低下がみられ、神経病態下の BBB におけるオクルディンの重要性が示唆された。これら脳梗塞モデルにて、オクルディンノックアウトマウスの脳血管における蛍光色素 FD-10 の透過が、野生型マウスと比較し亢進していた。さらに、オクルディンノックアウトマウスでは梗塞部位が拡大するとともに、グリッド歩行テストでの歩行異常など、神経病態が悪化する結果が得られた。以上の結果から、脳血管内皮細胞の TJ 細胞間バリアがオクルディンにより制御され、脳梗塞における脳機能保護に関わることを明らかにした。

④ **その他の TJ 構築制御因子の解析** Cldn やオクルディン以外の TJ 関連タンパク質の解析についても共同研究により進めた。TJ の裏打ちタンパク質である LUZP1 が微小管依存的にミオシン軽鎖の脱リン酸化を抑制することで、アピカル収縮を促進し、TJ の上皮細胞間バリアを制御するメカニズムの解明に貢献した。また、TJ 裏打ちタンパク質 COBL が、微小管依存的に液-液相分離して、アクチンの重合を促進し、細胞間バリアを動的に制御するメカニズムの解明にも貢献した。

以上の成果により、BBB を構成する TJ について、その多彩な構築制御メカニズムを明らかにし、BBB 操作基盤の開拓につながった。

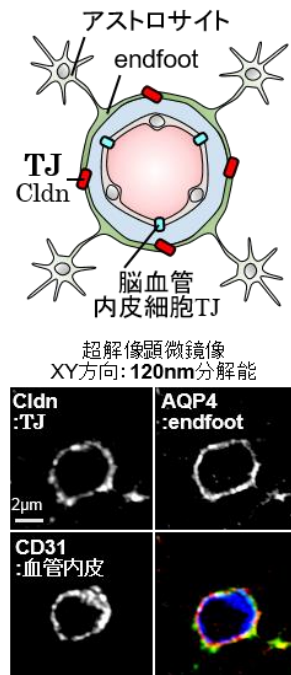


図 2. アストロサイトの endfoot への Cldn の集積

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiratsuchi Gen, Konishi Satoshi, Yano Tomoki, Yanagihashi Yuichi, Nakayama Shogo, Katsuno Tatsuya, Kashihara Hiroka, Tanaka Hiroo, Tsukita Kazuto, Suzuki Koya, Herawati Elisa, Watanabe Hitomi, Hirai Toyohiro, Yagi Takeshi, Kondoh Gen, Gotoh Shimpei, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 25
2. 論文標題 Dual-color live imaging unveils stepwise organization of multiple basal body arrays by cytoskeletons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 1176 ~ 1207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s44319-024-00066-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Koya, Yamaga Kosuke, Tokumasu Reitaro, Katsuno Tatsuya, Tanaka Hiroo, Chiba Shuhei, Yagi Takeshi, Katayama Ichiro, Tamura Atsushi, Murota Hiroyuki, Tsukita Sachiko	4. 巻 1523
2. 論文標題 Double mutation of <i>claudin 1</i> and <i>claudin 3</i> causes alopecia in infant mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 51 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nyas.14980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 -
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 Tsukita Kazuto, Kitamata Manabu, Kashihara Hiroka, Yano Tomoki, Fujiwara Ikuko, Day Timothy F., Katsuno Tatsuya, Kim Jaewon, Takenaga Fumiko, Tanaka Hiroo, Park Sungsu, Miyata Makoto, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Takahashi Ryosuke, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adf6358	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 該当する

1. 著者名 Yano Tomoki, Tsukita Kazuto, Kanoh Hatsuho, Nakayama Shogo, Kashihara Hiroka, Mizuno Tomoaki, Tanaka Hiroo, Matsui Takeshi, Goto Yuhei, Komatsubara Akira, Aoki Kazuhiro, Takahashi Ryosuke, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 40
2. 論文標題 A microtubule LUZP1 association around tight junction promotes epithelial cell apical constriction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104712	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中啓雄、田村淳、月田早智子
2. 発表標題 上皮細胞間接着装置タイトジャンクションによる外分泌システムの構築と生体防御
3. 学会等名 第92回 日本動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>帝京大学 先端総合研究機構 生体バリア細胞生物学研究室  <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/</a>  帝京大学 先端総合研究機構 生体バリア細胞生物学研究室  <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/</a></p>
---

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