

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：87301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791759

研究課題名（和文） 血液脳関門における肝細胞増殖因子の影響

研究課題名（英文） The effect of hepatocyte growth factor (HGF) on the blood-brain barrier

研究代表者

山田 成美 (YAMADA NARUMI)

独立行政法人 国立病院機構・長崎医療センター・臨床研究センター・救命救急・医師

研究者番号：30463532

研究成果の概要（和文）：

ラット脳毛細血管内皮細胞において、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor；HGF）のレセプターである c-met の発現が、Western Blotting および Real time-PCR 法を用いて確認された。ラット脳毛細血管内皮細胞を用いた血液脳関門（Blood-Brain Barrier；BBB）単層 *in vitro* モデルで、BBB の tight junction 機能の指標である Transendothelial electrical resistance (TEER) の測定および透過性試験を行うと、コントロール群に比し HGF 投与群で TEER の上昇が認められ、透過性は低下した。よって HGF により血液脳関門の tight junction 機能が増強し、HGF は BBB に対して保護的に作用する可能性が示唆された。この機序として、HGF 投与下の BBB における claudin-5, occludin, ZO-1 等の tight junction 構成タンパクの増加を予測し検証したが、Western Blotting や免疫染色の結果、有意な変化が見られなかった。そこで adherens junction の構成タンパクである E-cadherin をみたところ HGF 投与下で増加がみられ、また免疫染色では HGF 投与下で F-actin の増強が確認された。これにより、HGF は BBB において細胞骨格の強化および再構成を行うことで保護的に作用すると考えられた。

また、ラット脳毛細血管内皮細胞を用いた BBB のタイトジャンクション機能において、Transforming growth factor- β (TGF- β) が HGF と相反する作用を有することが確認された。

研究成果の概要（英文）：

Immunofluorescent staining, western blot analysis and RT-PCR indicated that rat brain microvascular endothelial cells (RBECs) expressed c-Met as the HGF receptor.

The effect of HGF on barrier function was investigated using an *in vitro* model of the blood-brain barrier (BBB) with a primary culture of RBECs. HGF decreased permeability to sodium fluorescein and Evans blue albumin through the RBECs monolayer, and dose-dependently increased transendothelial electrical resistance (TEER). It was thought that HGF had a protective effect on BBB function by initially targeting the TJ. However, immunofluorescent staining and Western blot analysis indicated that HGF treatment did not significantly change the tight junction proteins claudin-3, claudin-5, occludin and ZO-1 in RBECs. In comparison, E-cadherin as adherens junction protein was increased by HGF treatment. HGF reduced cortical actin bands and increased stress fiber density in

F-actin bands. HGF altered immunohistochemical staining pattern of F-actin bands. HGF seems to act on the BBB to strengthen BBB integrity, but the mechanism was not caused by changes of tight junction proteins. Other mechanisms, for example, cytoskeletal rearrangement could be a candidate mechanism for the effect of HGF on BBB.

Furthermore, in the tight junctional function of BBB in RBECs, it was indicated that Transforming growth factor-beta (TGF- β) had opposite effects from HGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：血液脳関門(BBB), 肝細胞増殖因子(HGF), tight junction, adherens junction, TEER, 透過性

1. 研究開始当初の背景

救急・集中治療領域において、低酸素・脳虚血、炎症等による脳障害は高頻度に遭遇する病態であり、患者の予後を決定する重要な問題である。脳障害の原因となる脳浮腫は死に直結する病態であるが、その一因に血液脳関門 (blood brain barrier ; BBB) の破綻があげられる。BBBの強化・保護は、各種侵襲から脳保護を行うために重要であると考えられる。

ラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞を培養した単層in vitro BBBモデルを用いた当研究の予備実験で、さまざまな薬剤やサイトカイン、ホルモンが血液脳関門を強化する可能性が示唆されたが、その一つにHepatocyte growth factor(HGF)がある。HGFは、肝細胞のみならずさまざまな細胞で細胞増殖促進・抗アポトーシス・血管新生などの再生・保護を担う生理活性を有し、再生・修

復因子として注目されている。BBBのタイトジャンクション機能評価法として経内皮細胞電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance ; TEER) 値測定があるが、HGFによりTEERの明らかな上昇がみられ、HGFにはBBBのタイトジャンクション強化作用すなわちBBB保護作用があると考えられた。末梢血管内皮細胞においてはタイトジャンクション機能を低下させるとの報告があり、当研究の予備実験でも同様の結果が得られたが、脳血管内皮細胞では逆の作用を有することが考えられる。また、脳毛細血管内皮細胞でのHGF受容体の発現をみたが、RT-PCR法およびWestern Blottingにてその存在は確認された。しかし、BBBにおけるHGFの詳細な影響および作用機序については未だ解明されていない。

中川らが開発した三層in vitro BBB再構成モデル (BBB Kit™) は、世界で初のラット初代

培養の脳毛細血管内皮細胞、アストロサイトおよびペリサイトの共存培養法による *in vitro* BBB再構成モデルで、きわめて生体に近い環境でのBBB機能を有する。(特許出願) HGFは生体侵襲下で分泌量やその作用が変化することが知られており、三層*in vitro* BBB再構成モデル (BBB Kit™) を用いてBBBに対するHGFの影響を検討することで、より生体に近い環境でのHGFの作用をみることができると考えられる。

以上をふまえ、ラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞を培養した単層*in vitro* BBBモデルを用いて、HGFが血液脳関門に与える影響およびその作用機序について研究を行う。更にラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト及びアストロサイトを共培養した三層*in vitro* BBB再構成モデル (BBB Kit™) を用いて単層モデルとの比較検討を行い、加えて病態モデルでのHGFの影響も検証する。

2. 研究の目的

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) の機能に対する、Hepatocyte Growth Factor (HGF) の影響を明らかにする。ラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞を用いた単層 *in vitro* BBB モデルを用いて、HGF が BBB に与える影響およびその作用機序について研究する。また、ペリサイト及びアストロサイトを共培養した三層 *in vitro* BBB 再構成モデル (BBB Kit™) を用い、より生体に近い環境での HGF の作用を比較検討し、更に病態モデルを用いて BBB に対する HGF の作用を検証する。

3. 研究の方法

(1) ラット脳毛細血管内皮細胞における、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor ;

HGF) のレセプターである *c-met* の発現を、免疫染色、Western Blotting および Real time-PCR 法を用いて確認する。

(2) ラット脳より分離した脳毛細血管内皮細胞を用いて単層 BBB *in vitro* モデルを作成し、HGF 作用下の BBB のタイトジャンクション (TJ) 機能評価を行った。TJ 機能評価は TEER 値測定及び透過性試験にて行う。

(3) 免疫染色、Western Blotting、Real-time PCR 法にて、HGF 作用下の *claudin-3, 5, occludin, ZO-1* などの tight junction protein の変化、遺伝子発現を検討する。

(3) 細胞骨格を形成する F-actin について HGF 作用下での変化を免疫染色で検討する。

(4) adherens junction の構成タンパクである E-cadherin について HGF 作用下での変化を Western Blotting を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) ラット脳毛細血管内皮細胞において、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor ; HGF) のレセプターである *c-met* の発現が確認された。

図 1. BBB における *c-met* の発現 (免疫染色)

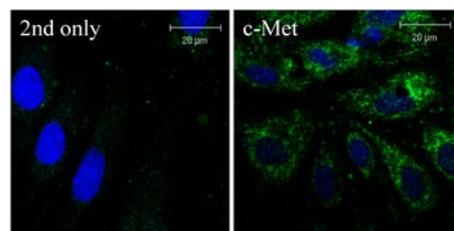


図 2. BBB における *c-met* の発現 (Western Blotting)

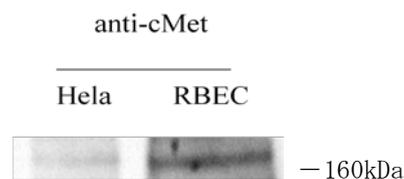
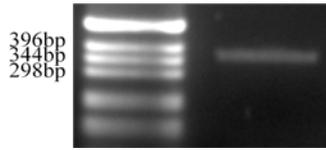


図 3. BBB における c-met の発現

(Real time-PCR)



(2) ラット脳毛細血管内皮細胞を用いた血液脳関門 (Blood-Brain Barrier ; BBB) 単層 in vitro モデルで、BBB の tight junction 機能の指標である TEER の測定および透過性試験を行うと、コントロール群に比し HGF 投与群で TEER の上昇が認められ、透過性は低下した。よって HGF により血液脳関門の tight junction 機能が增强し、HGF は BBB に対して保護的に作用する可能性が示唆された。

図 4. HGF 投与下での TEER の変化

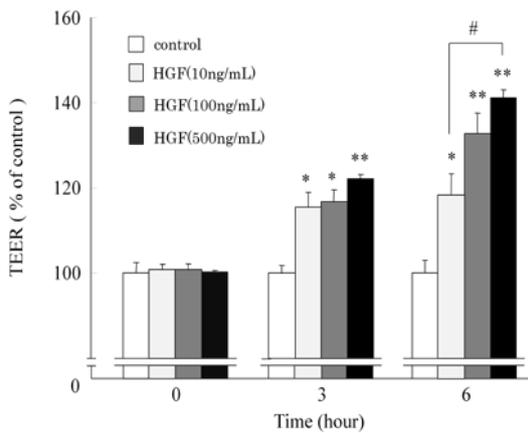
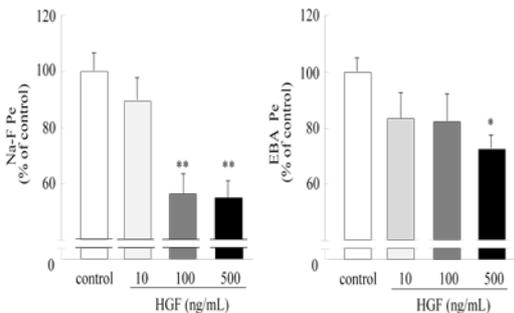


図 5. HGF 投与下での透過性の変化

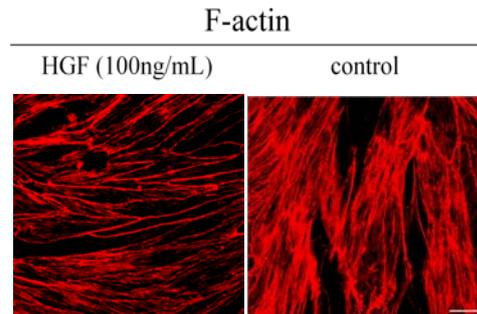


(3) HGF 投与下で BBB の TEER 上昇および透過性の低下がみられた機序として、HGF 投与下の BBB における claudin-5, occludin, ZO-1 等の tight junction 構成タンパクの増加を予測し検証したが、Western Blotting や免疫染色の結果、有意な変化が見られなかった。

(4) adherens junction の構成タンパクである E-cadherin をみところ HGF 投与下で増加がみられた。

(5) 免疫染色では HGF 投与下で F-actin の增强と再構成が確認された。これにより、HGF は BBB において細胞骨格の強化および再構成を行うことで保護的に作用すると考えられた。

図 6. HGF 投与下の F-actin の変化



そのほか、ラット脳毛細血管内皮細胞を用いた BBB のタイトジャンクション機能において、Transforming growth factor- β (TGF- β) が HGF と相反する作用を有することが確認された。

以上、血液脳関門 (BBB) における肝細胞増殖因子 (HGF) の保護作用について、その機序を一部ではあるが解明するデータを得た。BBB の保護・強化という観点で、HGF と TGF- β の相互作用を含め、今後も検証を継続する予定である。

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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① Comparison between in vitro-BBB effects of HGF and TGF- β . Narumi Yamada, Shinsuke Nakagawa, Gohei So, Dinh Ha Duy Thuy, RieTatsumi, Kunihiko Tanaka, Maria A. Deli, Masami Niwa. 13th Blood-Brain Barrier Symposium, Zurich, 2010. 9. 1-4
- ② Comparison between in vitro-BBB effects of HGF and TGF- β /in vitro-BBBモデルにおけるHGFとTGF- β の作用の比較. 山田成美、中川 慎介、宗 剛平、デインハドゥイ トゥイ、巽 理恵、田中 邦彦、デリ A マリア、丹羽 正美 第84回日本薬理学会年会 横浜 2011. 03. 22-24

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 成美 (YAMADA NARUMI)

独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・救命救急・医師

研究者番号 : 22791759