

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390348

研究課題名(和文) 脳小血管障害における基底膜の役割

研究課題名(英文) Role of basement membranes in small-vessel disease of brain

研究代表者

二宮 善文(NINOMIYA, YOSHIFUMI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70126241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：血液-脳関門の破綻や脳小血管の出血に基底膜の機能の異常が関与すること、及び、その分子機構を明らかにすることを目的とした。我々は、マウス静脈内に腫瘍壊死因子(TNF α)を投与し、血液-脳関門の破綻を誘導する脳炎モデルを作製した。そして血液-脳関門の破綻および基底膜の主成分であるIV型コラーゲンの変化についてWestern blot法および免疫組織染色法を用いて継続的に解析を行った。解析の結果、継続的にIV型コラーゲンは限定的に分解され、血液-脳関門の破綻と関連性のあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Abnormalities of the basement membranes in brain small vessels are considered to cause the break-down of blood-brain barrier (BBB) and intracerebral hemorrhage. We established the mouse encephalopathy model by the administration of TNF-alpha intravenously, in which BBB permeability increase transiently. To know the change of type IV collagen, as major component of the basement membranes, in the encephalopathy model, we performed Western blot and immunohistochemistry. The results suggested that the degradation of type IV collagen was associated with the break-down of BBB.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳小血管障害 コラーゲン 血液-脳関門

1. 研究開始当初の背景

脳毛細血管は、他の臓器の毛細血管とは異なり、内皮細胞と基底膜を覆うように裏打ちするアストロサイトが加わって、血液-脳関門を構築し、血液成分の物質透過を制御している。最近、脳小血管障害の原因遺伝子として複数の報告がなされ、脳の小血管が脆弱性に至る機序が明らかになってきた。本研究では、その原因遺伝子のひとつである I V 型コラーゲンに着目した。I V 型コラーゲン遺伝子の変異によって、内皮細胞とアストロサイトで作られる基底膜の機能が異常となり、脳小血管の出血を引き起こす可能性がある。

研究代表者は、これまでに基底膜の機能について追求し、様々な知見を得てきた。すなわち、その構成分子と遺伝子発現様式、脳における I V 型コラーゲンの分布と発現、アストロサイトの基底膜接着面に存在する新しい分子の発見、アストロサイトの基底膜（グリア境界膜）の構築に関する発見、さらに、I V 型コラーゲン 1 遺伝子の null マウスの表現型解析など、基底膜の機能に関する知見である。しかし、様々な組織や脳小血管の機能における I V 型コラーゲンの重要性は示されているものの、その分子機構については不明な点が多い。従って、本研究課題では脳小血管の出血と血液-脳関門の破壊における I V 型コラーゲンの役割について着目した。

2. 研究の目的

脳小血管障害を引き起こす機序として、異常な基底膜の構築が脳小血管を構成する血管内皮細胞、アストロサイト、基底膜の相互作用に異常をもたらす、血液-脳関門の破綻や脳小血管の出血という形質変化を導くという仮説を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当初、COL4A1 変異マウスの解析を中心に行うはずであったが、変異マウスの入手ができなかった。従って、当初の研究計画の後半に予定していた脳炎モデルを用いた研究を先行して行った。本脳炎モデルでは、血液-脳関門の破綻が知られているので、破綻時の I V 型コラーゲンの変化について解析を行った。

(1) マウス脳炎モデルの作製

Tsuge M らの方法に従い (Microbiol Immunol, 2010, 54, 417-424)、C57BL/6 成体雄マウスの尾静脈内に TNF を投与した。

(2) I V 型コラーゲンの Western blot 解析

脳炎モデルマウスの脳を継時的に採取し、ホモジネートし、SDS-PAGE を行った。さらに

膜に転写後、常法に従い、Western blot を行った。抗体は抗 I V 型コラーゲン 1 鎖抗体を用いた。

(3) I V 型コラーゲンの免疫組織染色

脳炎モデルマウスより脳を採取し、OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を作製し、常法に従って行った。抗体は抗 I V 型コラーゲン 1 鎖抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 脳炎モデルマウスにおいては、尾静脈内に TNF を投与後の 6 時間から 24 時間にエバンスブルーの透過性が増加することがわかっており、その間に血液-脳関門の破綻が起こっていると考えられる。我々は、0、6、12、24 時間後の I V 型コラーゲンを Western blot 法によって検出した。その結果、血液-脳関門が破綻すると思われる 6 時間以降に I V 型コラーゲンは限定的な分解を受けることが分かった。

(2) 脳炎モデルマウスにおける I V 型コラーゲンの分布について、免疫組織染色法により検討した。尾静脈内に TNF を投与後の 8 時間後において、I V 型コラーゲン 1 鎖の血管基底膜での染色性はコントロール群 (PBS 投与) よりも減弱していることが分かった。

(3) 以上の結果により、I V 型コラーゲンは血液-脳関門の破綻と同様の時間経過で分解を受けており、両者の現象には深い関連性があると示唆される。また、我々の用いた脳炎モデルにおいては出血を引き起こさない。従って、I V 型コラーゲンの変化が出血を起こすメカニズムに関しては、血液-脳関門の破綻に関わるメカニズムと異なると考えられ、本研究では明らかにできなかった。

近年、細胞外マトリックスの構成成分の分解産物が様々な生理的活性を有することが明らかとなってきている。本研究での Western blot 法による解析から、I V 型コラーゲンは限定的な分解を受けており、ある分子量をもつバンドが一過性に検出された。脳炎や血液-脳関門の破綻で生ずる病理において、I V 型コラーゲンの分解産物の積極的な働きがあるとすれば新知見である。その生物学的重要性について、さらに詳細な検討を要すると思う。

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 19 件)

Inagaki J, Takahashi K, Ogawa H, Asano K, Faruk Hatipoglu O, Cilek MZ, Obika M, Ohtsuki T, Hofmann M, Kusachi S, Ninomiya

Y, Hirohata S. ADAMTS1 inhibits lymphangiogenesis by attenuating phosphorylation of the lymphatic endothelial cell-specific VEGF receptor. *Exp Cell Res*. 査読有, 323(2), 2014, 263-75. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.03.002.

Maehara A, Nishida K, Furutani M, Matsumoto E, Ohtsuka A, Ninomiya Y, Oohashi T. Light and electron microscopic detection of inflammation-targeting liposomes encapsulating high-density colloidal gold in arthritic mice. *Inflamm Res*, 査読有, 63(2), 2014, 139-47. DOI: 10.1007/s00011-013-0682-4.

Demircan K, Yonezawa T, Takigawa T, Topcu V, Erdogan S, Ucar F, Armutcu F, Yigitoglu MR, Ninomiya Y, Hirohata S. ADAMTS1, ADAMTS5, ADAMTS9 and aggrecanase-generated proteoglycan fragments are induced following spinal cord injury in mouse. *Neurosci Lett*, 査読有, 544, 2013, 25-30. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.02.064.

Momota R, Narasaki M, Komiyama T, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A. Drosophila type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. *Int J Biochem Cell Biol*. 査読有, 45(5), 2013, 1003-11. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.001.

Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*. 査読有, 8(2), 2013, e55578. DOI: 10.1371/journal.pone.0055578.

Miura A, Akagi S, Nakamura K, Ohta-Ogo K, Hashimoto K, Nagase S, Kohno K, Kusano K, Ogawa A, Matsubara H, Toyooka S, Oto T, Ohtsuka A, Ohe T, Ito H. Different sizes of centrilobular ground-glass opacities in chest high-resolution computed tomography of patients with pulmonary veno-occlusive disease and patients with pulmonary capillary hemangiomatosis. *Cardiovasc Pathol*. 査読有, 22, 2013, 287-293. DOI: 10.1016/j.carpath.2012.12.002.

Shinaoka A, Momota R, Shiratsuchi E, Kosaka M, Kumagishi K, Nakahara R, Naito I, Ohtsuka A.: Architecture of the subendothelial elastic fibers of small blood vessels and variations in vascular type and size. *Microsc Microanal*. 査読有, 19(2), 2013, 406-14. DOI: 10.1017/S1431927612014341.

Hirashima K, Iyama K, Baba Y, Honda Y, Sado Y, Ninomiya Y, Watanabe M, Takamori H, Beppu T, Baba H. Differential expression of basement membrane type IV collagen 2 and 6 chains as a prognostic factor in patients with extrahepatic bile duct carcinoma. *J Surg Oncol*. 査読有, 107(4), 2013, 402-7. DOI: 10.1002/jso.23225.

Obika M, Ogawa H, Takahashi K, Li J, Hatipoglu OF, Cilek MZ, Miyoshi T, Inagaki J, Ohtsuki T, Kusachi S, Ninomiya Y, Hirohata S. Tumor growth inhibitory effect of ADAMTS1 is accompanied by the inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Sci*. 査読有, 103(10), 2012, 1889-97. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02381.x.

Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, Kusachi S, Ninomiya Y, Oohashi T. Bra12 is indispensable for

the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J Comp Neurol*. 査読有, 520(8), 2012, 1721-36. DOI: 10.1002/cne.23009.

Kanazawa T, Furumatsu T, Hachioji M, Oohashi T, Ninomiya Y, Ozaki T. Mechanical stretch enhances COL2A1 expression on chromatin by inducing SOX9 nuclear translocalization in inner meniscus cells. *J Orthop Res*. 査読有, 30(3), 2012, 468-74. DOI: 10.1002/jor.21528.

Takeda Y, Hashimoto H, Fumoto K, Danura T, Naito H, Morimoto N, Katayama H, Fushimi S, Matsukawa A, Ohtsuka A, Morita K. Effects of pharyngeal cooling on brain temperature in primates and humans: a study for proof of principle. *Anesthesiology*, 査読有, 117(1), 2012, 117-125. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3182580536.

Murakami S, Fujita N, Kondo H, Takeda I, Momota R, Ohtsuka A, Fujino H. Abnormalities in the fiber composition and capillary architecture in the soleus muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Scientific World Journal*, 査読有, 2012, Art. ID 680189. DOI: 10.1100/2012/680189

Minematsu H, Otani T, Oohashi T, Hirai M, Oie K, Igarashi K, Ohtsuka A. Development of an active targeting liposome encapsulated with high-density colloidal gold for transmission electron microscopy. *J Electron Microscop (Tokyo)*, 査読有, 60(1), 2011, 95-99. DOI: 10.1093/jmicro/dfq071.

Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A,

Mori S, Nishibori M. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*, 査読有, 42(5), 2011, 1420-1428. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.598334.

Momota R, Naito I, Ninomiya Y, Ohtsuka A. Drosophila type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol*, 査読有, 30, 2011, 258-266. DOI: 10.1016/j.matbio.2011.03.008.

Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, Naomoto Y, Ninomiya Y. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol*. 査読有, 30(1), 2011, 3-8. DOI: 10.1016/j.matbio.2010.09.003.

Saito K, Yonezawa T, Minaguchi J, Kurosaki M, Suetsugu S, Nakajima A, Nomoto H, Morizane Y, Sado Y, Sugimoto M, Kusachi S, Ninomiya Y. Distribution of (IV) collagen chains in the ocular anterior segments of adult mice. *Connect Tissue Res*. 査読有, 52(2), 2011, 147-56. DOI: 10.3109/03008207.2010.492062.

Kinnunen AI, Sormunen R, Elamaa H, Seppinen L, Miller RT, Ninomiya Y, Janmey PA, Pihlajaniemi T. Lack of collagen XVIII long isoforms affects kidney podocytes, whereas the short form is needed in the proximal tubular basement membrane. *J Biol Chem*. 査読有, 286(10), 2011, 7755-64. DOI: 10.1074/jbc.M110.166132.

〔学会発表〕(計 36件)

大橋俊孝ら、リジンオリゴマープローブからなる間接軟骨特異的 X 線プローブの創出、

日本軟骨代謝学会、2014年2月28日～3月1日、京都府医師会館

米澤朋子ら、脊髄損傷におけるI V型コラーゲン鎖の発現と分布の継時的変化、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2013年6月28日～29日、和歌山県立医科大学

百田龍輔ら、致死となるマルチプレキシン(XV/XVIII型コラーゲン)変異ショウジョウバエの解析、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2013年6月28日～29日、和歌山県立医科大学

大橋俊孝ら、マウス聴覚内側台形体核(MNTB)におけるペリニューロナルネット形成、MBSJ2013、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド

百田龍輔ら、Drosophila multiplexin mutants manifest ecdysone deficiency, Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2013年11月24日～27日、Hong Kong Academy of Medicine Jockey Club Building

堀田輝ら、アストロサイトのサイトカイン産生におけるI V型コラーゲンの役割、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2012年6月7日～8日、日本青年館ホテル

米澤朋子ら、The expression of interleukin-6 is attenuated by type IV collagen in cultured astrocytes, 日本神経科学会、2012年9月18日～21日、名古屋国際会議場

三好亨ら、The inhibitory role of an angiotensin II converting enzyme inhibitor on gelatinase activity in experimental abdominal aortic aneurysm, 日本血管生物医学会、2012年12月5日～7日、あわぎんホール

斎藤健司ら、マウス眼におけるI V型コラーゲン鎖の分布、日本結合組織学会・マトリックス研究会、2011年6月10日～11日、別府ビーコンプラザ

〔図書〕(計3件)

米澤朋子、二宮善文、日本臨床、先天代謝異常症候群、2012、4 (683-686)

大橋俊孝ら、日本臨床、先天代謝異常症候群、2012、5 (700-704)

二宮善文、他、朝倉書店、血管生物医学事典、2011、2 (53-55)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mbb-okayama.com/>

(1)研究代表者

二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70126241

(2)研究分担者

米澤 朋子 (YONEZAWA TOMOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30304299

大橋 俊孝 (OOHASHI TOSHITAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50194262

(3)連携研究者

廣畑 聡 (HIROHATA SATOSHI)

岡山大学・国際センター・准教授

研究者番号：90332791

大塚 愛二 (OHTSUKA AIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50168986

(4)研究協力者

幡中 邦彦 (HATANAKA KUNIHICO)

岡山大学・医学部・客員研究員

斎藤 健司 (SAITO KENJI)

岡山大学・医学部・客員研究員

百田 龍輔 (MOMOTA RYUSUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

小川 弘子 (OGAWA HIROKO)

岡山大学・大学病院・助教

稲垣 純子 (INAGAKI JYUNKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教