

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659460

研究課題名(和文) インビトロ血液脳関門システム構築による虚血性脳細胞傷害の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis for the ischemic brain damage using in vitro blood-brain barrier system

研究代表者

下濱 俊 (Shimohama, Shun)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60235687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞(MSC)の血液脳関門(BBB)通過機構を明らかにするために、脳微小血管内皮細胞(BMEC)よりなるインビトロBBBモデルを用いて検討を行った。その結果、MSCがBMEC層の細胞間隙を通過する「現場」をリアルタイムイメージングにより捉えることに成功した。また、MSC通過中のBMECでのタイトジャンクション構成タンパクClaudin-5の動態と細胞内カルシウム動態を同時にリアルタイム観察するための実験系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：To study transmigration of mesenchymal stem cells (MSCs) across the blood-brain barrier (BBB), we developed an in vitro BBB system consisting of rat brain microvascular endothelial cells (BMECs). Time-lapse imaging using this system revealed that MSCs transmigrated across the BMEC monolayer through transiently formed intercellular gaps between the BMECs. In addition, we developed an in vitro imaging system for simultaneous analysis in real time between claudin-5, a tight junction protein, and intracellular calcium dynamics in BMECs during MSC transmigration.

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：血液脳関門 骨髄幹細胞 脳実質浸潤 セルマイグレーション リアルタイムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は、その採取が容易であり、かつ培養技術が確立している。また、自家移植が可能なことから拒絶反応を考慮する必要もないため臨床への応用が期待されている。実験動物を用いた研究から脳梗塞後の神経障害に対する有用性が示されており、(J Clin Neurosci, 16, 12-20 (2009))、ヒトにおいてもその有用性が報告されている (Ann Neurol, 57, 874-882 (2005))。静脈内に投与された MSC の脳保護作用機構の全容を解明するためには、MSC の 1) 血液脳関門 (BBB) 通過機構、2) 脳傷害部位集積機構、3) 傷害部位における神経細胞生存促進機構の 3つの段階について、その分子メカニズムが明らかにされることが必要である。3) 傷害部位における神経細胞生存促進機構については、従来型の分散共培養系を用いた研究手法でのアプローチが容易であり、すでに、MSC による神経細胞生存促進に関与する因子として神経成長因子などが報告されている (Stem Cell Res, 3, 63-70 (2009)、J Neurochem, 114, 1569-1580 (2010))。一方、1) BBB 通過機構と 2) 脳傷害部位集積機構については、従来型の培養系での解析は困難であり、その分子機構はほとんど不明のままである。

研究代表者は、脳微小血管内皮細胞 (BMEC) よりなるインビトロ BBB モデルを活用し、MSC の BBB 通過をリアルタイム観察で捉えるとともに、各種受容体拮抗薬、酵素阻害薬、中和抗体、siRNA を用いた薬理的・細胞生物学的解析により BBB 通過の分子機構を明らかにできると考えた。また、申請者は遺伝子改変によりミクログリアにおいて EGFP を発現するマウスから作製した脳スライス培養系を用いた検討により、神経細胞傷害部位へのミクログリア遊走のリアルタイム観察とそれを用いた評価系の構築にも成功しており、本手法を応用することで MSC の脳傷害部位遊走の評価系構築とそれを用いたメカニズムの解析が可能であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、MSC の BBB 通過機構と脳傷害部位集積機構の解明を目的として、研究期間内に、(1) インビトロ BBB モデルを応用したリアルタイムイメージング系の構築と、それを用いた MSC および BMEC の細胞動態解析、(2) BMEC におけるタイトジャンクション構成タンパク Claudin-5 の動態と細胞内カルシウム動態の同時イメージング系の構築、(3) MSC の脳障害部位遊走の評価系構築、を行うことを計画したが、初年度の研究において、(1) の研究に比べ、(3) の研究に遅れが生じた。(1) のリアルタイムイメージング系を活用し、種々の蛍光標識タンパク質および蛍

光イメージングプローブタンパク質を用いることにより、MSC の BBB 通過機構に関して先端的かつ独創的な研究成果が得られることが期待できたため、以後の研究では、(1) および (2) の研究に注力した。そのため、以下の方法、結果、考察では、(1) および (2) の研究に関して述べる。

## 3. 研究の方法

### (1) インビトロ BBB モデルの作製

全細胞に緑色蛍光タンパク EGFP を発現する SD-Tg (CAG-EGFP) ラット (4-6 週齢) あるいは雄性 Wistar/ST ラット (4-6 週齢) から、BMEC を調製し、コラーゲンあるいはマトリゲルでコーティングした多孔質細胞培養インサート (Transwell; 膜面積  $0.33 \text{ cm}^2$ 、ポアサイズ  $0.4 \mu\text{m}$ ) 上面に、 $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  の密度で播種することで作製した (図 1)。

### (2) MSC の調製および蛍光標識

4-6 週齢の雄性 Wistar/ST ラット大腿骨髄より MSC を調製し、赤色蛍光色素 PKH26 により細胞膜の標識を行った。

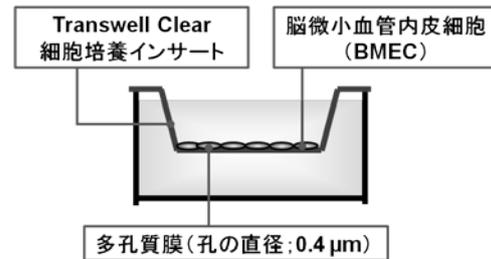


図 1 インビトロ BBB モデルの模式図

### (3) MSC の経内皮細胞遊走試験

インビトロ BBB モデルの upper チャンバーへの PKH26 標識 MSC 播種前および MSC 播種後 6、12、24 時間において、倒立蛍光顕微鏡を用いて、MSC および BMEC を観察した。その後、細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

### (4) 経内皮電気抵抗値 (TEER) 測定

Millcell ERS および Endohm for 6 mm Culture Cup を用いて、電気抵抗値を測定した。測定した電気抵抗値からブランクを減じた値に、Transwell 多孔質膜の面積 ( $0.33 \text{ cm}^2$ ) を乗じることにより、TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) を算出した。

### (5) リアルタイムイメージング

SD-Tg (CAG-EGFP) ラットより作成したインビトロ BBB モデルに PKH26 標識 MSC を播種し、共焦点レーザー顕微鏡ステージ上に設置した培養チャンバー内で、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  条件下で MSC 播種後 2 時間から 22 時間まで 12 分間隔で画像を取得した。

### (6) Venus-Claudin-5 および R-GECO の BMEC への導入

4-6 週齢の雄性 Wistar/ST ラットから単離した BMEC に組換えレンチウイルスを感染さ

せることで、Claudin-5 と黄色蛍光タンパク Venus との融合タンパク Venus-Claudin-5 を発現させた。同様に、組換えレンチウイルスを用いて、赤色蛍光カルシウムセンサータンパク R-GECO を BMEC に発現させた。

#### (7) カルシウムイメージング

R-GECO 導入 BMEC をガラスボトムディッシュに播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で、5 秒間隔で 15 分間画像を取得した。画像取得開始 5 分後にカルシウムイオノフォア A23187 (10 μM) を処置し、さらにその 5 分後に EGTA (10 mM) を処置した。同様に、Venus-Claudin-5 および R-GECO 同時導入 BMEC を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で、1 秒ごとに 10 分間画像を取得した。画像取得開始 5 分後に ATP (300 μM) を処置した。

### 4. 研究成果

(1) インビトロ BBB モデルを応用したリアルタイムイメージングによる MSC-BMEC 細胞動態解析

①MSC 播種密度が BMEC 層の形態およびバリア機能に与える影響

まず、MSC 播種密度の違いが BMEC 層に与える形態学的な影響を蛍光顕微鏡画像により検討した。MSC 播種密度が  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の場合、6 時間以降の BMEC 層では内皮細胞間隙の著しい拡大が観察され、そ

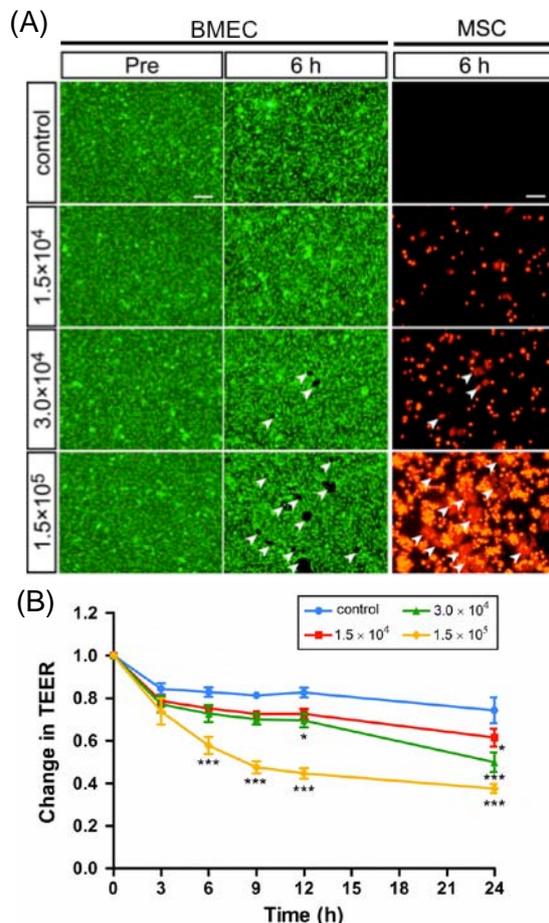


図 2 MSC 播種密度が BMEC 層の (A) 形態および (B) バリア機能に与える影響

A) 矢頭は MSC 播種 6 時間後において BMEC 細胞間隙が拡大した部分を示す。Scale bar = 100 μm

B) \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. control

の間隙は接着形態を示す MSC によって覆われていた。 $3.0 \times 10^4$   $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> では、BMEC 層の形態的变化は軽微であった (図 2A)。

続いて、MSC 播種密度の違いが BMEC 層のバリア機能に与える影響をイオン透過性の指標である TEER により検討した。その結果、TEER は MSC 播種密度依存的な低下を示した。MSC 播種密度が  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の場合、6 時間以降では測定を行ったいずれの時間でも有意に TEER の有意な低下が見られ

た (図 2B)。 $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> では、少なくとも、播種 12 時間後までは、TEER の有意な低下は見られなかった。

図 2A の蛍光顕微鏡画像より、BMEC 層への播種後の MSC の形態には丸い形をした浮遊形態と細胞質を広げた接着形態があることが観察された。そこで、経内皮細胞遊走試験開始 24h 後の MSC の局在を共焦点レーザー顕微鏡により検討した。浮遊形態を示した MSC ( $2.94 \pm 0.21$  cells/mm<sup>2</sup>) は BMEC 層上面に接着していることが観察された (図 3A)。一方、接着形態を示した MSC のうち大部分 ( $29.18 \pm 2.92$  cells/mm<sup>2</sup>) は BMEC に近接し (図 3B)、サンプルの縦断面を観察したところ BMEC 層と Transwell インサート膜の間に存在することが観察された (図 3D)。その他の接着形態を示した MSC ( $3.99 \pm 1.47$  cells/mm<sup>2</sup>) は Transwell インサート膜下面に存在し (図 3C)、BMEC 層に続いてインサート孔を通過する MSC も存在することが示された。

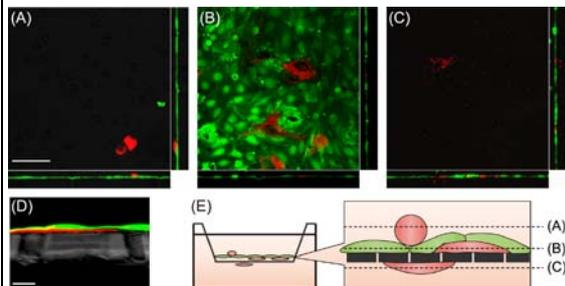


図 3 BMEC 層への播種 24 時間後における MSC の局在

MSC 播種 24 時間後における BMEC 層 (緑) および MSC (赤) の共焦点蛍光顕微鏡画像。MSC は  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように Transwell の upper チャンバーに播種した。(A-C) 三つの異なる z 位置 (A; BMEC 層上, B; 内皮細胞直下, C; Transwell インサート膜裏面) における共焦点画像。(D) Transwell インサート膜の縦断面。(E) BMEC 層への播種 24 時間後の MSC 局在の模式図。図中の点線は (A)-(C) を撮影した z 位置を示している。Scale bar = 50 μm (A-C), 10 μm (D)

②BMEC 層を通過する MSC のリアルタイムイメ

## ージング

上述の検討から MSC 播種によって BMEC 層が形態的、機能的に大きく影響を受けない  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> を MSC 播種密度として選択し、BMEC 層を通過する MSC のリアルタイムイメージングを行った。その結果、BMEC 層を通過する MSC は内皮細胞間隙を通過することにより BMEC 層を通過し、その際に生じた間隙は元の状態に戻ることを観察された (図 4)。

以上のように、本研究において、インビトロ BBB モデルを応用したリアルタイムイメージング系を構築し、本系を用いて MSC が内皮細胞間隙を通過する傍細胞経路によって BMEC 層を通過することを示した。

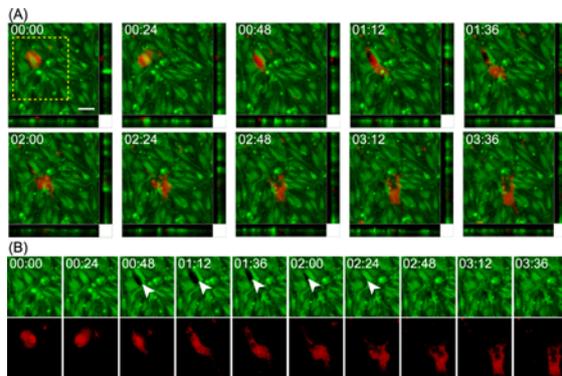


図 4 BMEC 層を通過する MSC のリアルタイムイメージング

(A) MSC (赤) および BMEC (緑) の 24 分間隔のリアルタイムイメージング画像。各画像はそれぞれ xy, xz, yz 画像により構成されている。Scale bar = 25  $\mu$ m。 (B) (A) 左上の画像に示した黄色破線内の領域の単色蛍光画像。矢頭は内皮細胞間隙が拡大している部分を指している。

(2) タイトジャンクション構成タンパク質 Claudin-5 の動態と細胞内カルシウム動態の同時リアルタイムイメージング系の構築

### ①BMEC への Venus-Claudin-5 導入

組換えレンチウイルスベクターを用いて、BMEC に Claudin-5 と黄色蛍光タンパク Venus との融合タンパク Venus-Claudin-5 を導入し、その局在および発現量を蛍光顕微鏡観察およびウエスタンブロットにより解析した。導入された Venus-Claudin-5 は細胞膜近傍への局在が観察された (図 5)。また、免疫染色により、Venus-Claudin-5 と ZO-1 との共局在も観察された。発現量に関しては、内在性 Claudin-5 に対して Venus-Claudin-5 は約 1.6 倍発現していた。一方で、内在性 Claudin-5 発現量は Venus-Claudin-5 の発現によって変化しなかった。

続いて、Venus-Claudin-5 導入が BMEC バ

リア機能に与える影響を TEER により検討した。その結果、多孔質膜インサートに播種後 48、72 時間において、Mock と比較してバリア機能が有意に上昇することが確認された (図 6)。

### ②BMEC への R-GECO 導入

組換えレンチウイルスベクターを用いて、BMEC に赤色蛍光カルシウムセンサータンパク R-GECO を導入し、カルシウムイオノフォ

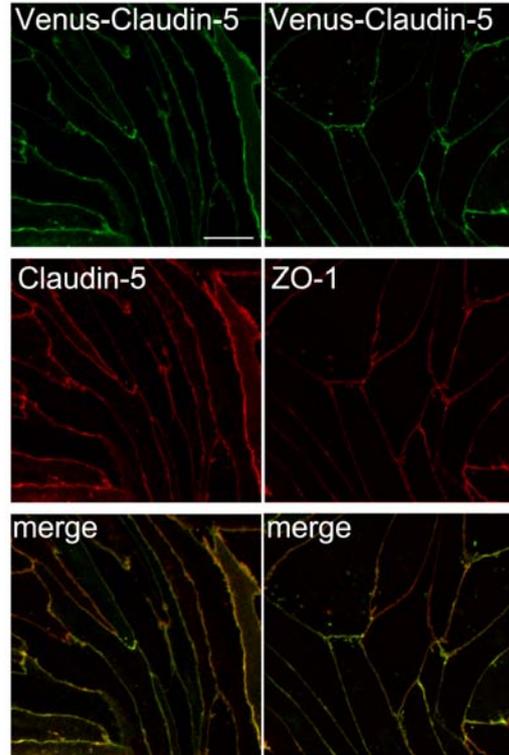


図 5 BMEC への Venus-Claudin-5 導入  
Venus-Claudin-5 を発現させた BMEC における Claudin-5 および ZO-1 の免疫染色画像。Scale bar = 20  $\mu$ m

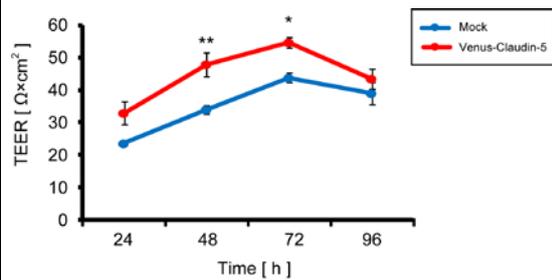


図 6 Venus-Claudin-5 導入による BMEC バリア機能変化

Mock および Venus-Claudin-5 を導入した BMEC 層の TEER 測定。BMEC を多孔質膜インサートに播種後、24、48、72、96 時間において TEER を測定した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Mock

ア A23187、および 2 価イオンキレート試薬 EGTA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をリアル

タイムに検出可能であるかを検討した。その結果、A23187 処置によって蛍光強度の増大が観察された。また、EGTA を処置することで、A23187 処置による蛍光強度増大の抑制が観察された (図 7)。

### ③Venus-Claudin-5 および BMEC 内カルシウム濃度変化の同時観察

Venus-Claudin-5 および R-GECO を導入した BMEC において、Venus-Claudin-5 動態お

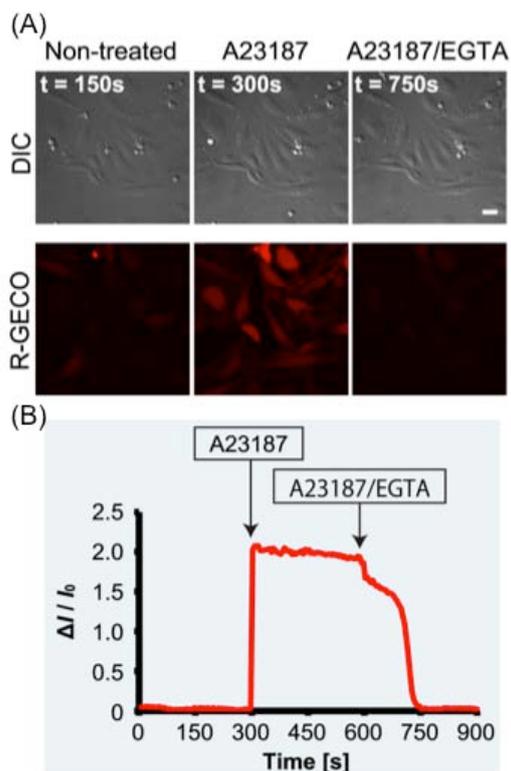


図 7 R-GECO 導入 BMEC におけるカルシウムイメージング

R-GECO 導入 BMEC に A23187 (10  $\mu$ M, 測定開始 5 分後) および EGTA (10mM, 測定開始 10 分後) を処置した際の蛍光画像を 5 秒間隔で 15 分間取得した。(A) 代表的なタイムポイント (t = 150, 300, 750s) における微分干渉像 (DIC, 上段) と 蛍光画像 (下段)。Scale bar = 20  $\mu$ m。(B) R-GECO の蛍光強度変化。各タイムポイントにおける蛍光強度変化は、以下の式で算出した ( $\Delta I = (I_t - I_0) / I_0$ ;  $I_t$  は時間 t における蛍光強度、 $I_0$  はベースラインの蛍光強度を表している)。

および細胞内カルシウム濃度変化を同時観察可能かどうか検討した。また、実際に生体内に存在する分子による細胞内カルシウム濃度変化が観察可能かどうかを検討するため、刺激物質として ATP (300  $\mu$ M) を使用した。リアルタイムイメージングを行った結果、ATP を処置することで、1 細胞において

Venus-Claudin-5 動態および細胞内カルシウム濃度変化を同時に観察することができた (図 8)。

以上のように、組換えレンチウイルスを用いて Venus-Claudin-5 および R-GECO を BMEC に導入することにより、Claudin-5 の分子動態と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を同時イメージン

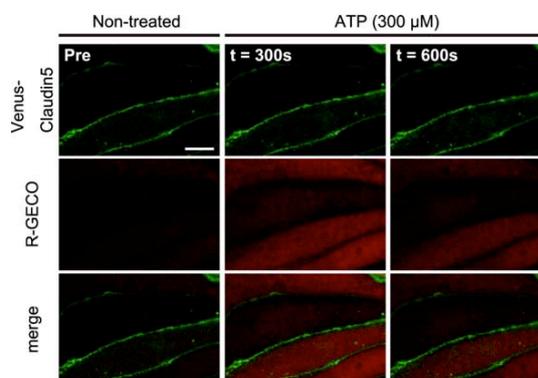


図 8 Venus-Claudin-5 および R-GECO 導入 BMEC におけるカルシウムイメージング

Venus-Claudin-5 と R-GECO を導入した BMEC に ATP (300  $\mu$ M, 測定開始 5 分後) を処置した際の蛍光画像を 1 秒間隔で 10 分間取得した。代表的なタイムポイント (Pre, t = 300, 600s) におけるリアルタイムイメージング画像。Scale bar = 10  $\mu$ m。

ができる実験系を構築した。

### (3) まとめ

本研究により、MSC の BBB 通過機構の一端が明らかとなった。また、インビトロ BBB モデルを用いたリアルタイムイメージング系を構築し、組換えレンチウイルスを用いた遺伝子導入により、タイトジャンクション構成タンパク Claudin-5 の動態と細胞内カルシウム動態の同時イメージング系を構築した。本研究で構築したイメージング系は、MSC やその他血球系細胞の BBB 通過機構の解析に有用であると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Matsushita T, Kibayashi T, Katayama T, Yamashita Y, Suzuki S, Kawamata J, Honmou O, Minami M, Shimohama S. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett*, 502:41-45 (2011) (査読有) doi:10.1016/j.neulet.2011.07.021

〔学会発表〕(計4件)

(1) 木林達也、片山貴博、松下隆司、永井健治、下濱俊、南雅文

Development of an in vitro imaging system for the study of the mechanisms underlying mesenchymal stem cell transmigration across the blood brain barrier.

第55回日本神経化学会大会

2012年9月30日-10月2日

神戸国際会議場(兵庫)

(2) 片山貴博、木林達也、松下隆司、本望修、下濱俊、南雅文

Mesenchymal stem cells transmigrate across the blood-brain barrier through transiently formed interendothelial gaps.

第85回日本薬理学会年会

2012年3月14-16日

国立京都国際会館(京都)

(3) 木林達也、松下隆司、片山貴博、下濱俊、南雅文

In vitro 血液脳関門モデルを用いた骨髄間葉系幹細胞の動態解析

第62回日本薬理学会北部会

2011年9月29-30日

江陽グランドホテル(宮城)

(4) 片山貴博、松下隆司、木林達也、本望修、下濱俊、南雅文

Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed interendothelial gaps.

第54回日本神経化学会大会

2011年9月26-28日

ホテル瑠璃光(石川)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

下濱 俊 (SHIMOHAMA SHUN)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60235687

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

南 雅文 (MINAMI MASABUMI)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：20243040