

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790113

研究課題名(和文) 脳ペリサイト産生シクロフィリンAによる脳インスリン抵抗性形成と糖尿病進展

研究課題名(英文) Involvement of pericytes-derived cyclophilin A in the development of insulin resistance in the brain

研究代表者

高田 芙友子 (TAKATA, Fuyuko)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：70412575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病における脳血管障害や認知機能障害などの中枢機能障害として血糖調節機能不全が発現すると考えられる。糖尿病病態下では、脳微小血管およびその構成細胞である脳ペリサイトのシクロフィリンA(CypA)の産生量が増加した。このCypAは糖尿病病態下で脳神経のインスリン抵抗性を惹起した。これらの結果は、脳ペリサイトは脳神経血管機構の基幹細胞として糖尿病病態の進展に関与する可能性を示唆する。本研究は、脳ペリサイトおよびCypAを糖尿病治療における新たな治療標的として提示するものである。

研究成果の概要(英文)：Brain pericytes in the microvasculature are periendothelial accessory structures of the blood-brain barrier (BBB). We previously demonstrated that pericytes increase insulin sensitivity in the hypothalamic neurons through soluble factors under the physiological conditions. However, under the pathological conditions such as diabetes mellitus (DM), a role of pericytes in hypothalamic insulin sensitivity remained obscure. The expression of cyclophilin A (CypA) and its receptor, CD147 in the brain and brain microvessels were increased in the obese mice with impaired glucose tolerance induced by high fat diet. CypA release from pericytes was much higher than that from other BBB-constituting cells under the physiological conditions. TNF- α increased CypA release from pericytes. The treatment of TNF- α combined with CypA decreased insulin sensitivity in the hypothalamic neurons. Therefore, pericytes and pericytally released CypA could be involved in insulin resistance in the central nervous system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脳ペリサイト cyclophilin A 脳インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌量低下やインスリン抵抗性に基づく作用低下による血糖値上昇を成因とする疾患である。慢性的な高血糖症状の問題点は、網膜症、腎障害、末梢神経障害への進展であり、近年、認知機能低下や痴呆症状の発症との関連性も明らかになりつつある。2型糖尿病治療薬の開発はめざましいが、克服されていない課題は多い。

2型糖尿病動物では高インスリン血症が認められるが、脳内にインスリンを投与すると高血糖が改善された (Nature, 1979; 282:503)。骨格筋・肝臓とは異なり、脳のグルコース取り込みはインスリン非依存的であるため、脳は2型糖尿病における標的臓器とは捉えられていなかった。しかし、脳が末梢からのインスリンを受容し肝臓でのグルコース産生を抑制することが明らかにされた。さらに糖尿病および肥満動物において、インスリン脳内移行量が減少することも報告された (Peptides, 1997; 18:1577, Diabetes, 2000; 49: 1525)。これらの知見は、インスリンの脳移行低下を包含した「中枢性インスリン感受性機構障害」が2型糖尿病形成に関与することを示す。

薬物療法により血糖が管理されている2型糖尿病患者においても認知機能障害が認められる (Ann Neurol, 2008; 64:698)。この成績は、糖尿病による認知機能障害の発症抑制に関して、末梢のインスリン分泌不良やインスリン抵抗性の改善による血糖管理だけでは効果が不十分であることを示唆する。さらにインスリンは脳内の神経伝達物質放出促進・神経成長を促進する作用を有するが、脳

内炎症下では脳神経のインスリンシグナル不全が引き起こされる (Neural Dev 2010;5:7)。

これらの知見は、2型糖尿病形成および進展における中枢機能異常の関与を示唆する。しかし、中枢での血糖調節機能障害および認知機能障害の改善に関する課題は取り残されたままである。それでは、2型糖尿病における中枢機能障害はどのように惹起されるのか？初期過程での持続的な高血糖状態は恒常性維持機能を凌駕したエネルギー摂取の結果である。本申請者らは、糖尿病における血糖調節機構を含む中枢機能障害は、インスリン血液脳関門透過不良および脳神経インスリン感受性不良(本申請者はこれらを脳インスリン抵抗性と定義した)に端を発すると考え、その病態形成機構として脳血管内皮細胞-脳ペリサイトおよび脳ペリサイト-海馬・視床下部神経の機能的連関に着目した。脳血管内皮細胞が脳ペリサイト、グリア細胞と共に構成する血液脳関門(BBB)と脳神経は高度なネットワーク機能から成る「脳神経血管機構」を形成して高次脳機能を維持しており、この機能障害は様々な病態を引き起こす (Neuron. 2008;57:178)。最近、脳ペリサイト欠損マウスでは、脳血管内皮細胞およびアストロサイト機能が低下し血液脳関門が脆弱化することが報告され、脳神経血管機構における脳ペリサイトの重要性がさらに支持された。そこで、本申請者はこれら血液脳関門と脳神経の「中継制御装置」である脳ペリサイトに着眼し、糖尿病病態下の脳ペリサイト機能異常による脳神経血管機構異常が糖尿病進展に寄与する可能性を追求する。

2 . 研究の目的

2 型糖尿病における脳血管障害や認知機能障害などの中枢機能障害として血糖調節機能不全が考えられる。本研究では、血液脳関門および視床下部・海馬機能を調節する「脳神経血管機構 (neurovascular unit ; NVU)」の基幹細胞として「脳ペリサイト」を捉え、本細胞が糖尿病病態下で、シクロフィリン A (CypA) などの液性因子を介して血液脳関門・脳神経のインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病病態の形成・進展を担う可能性を追求する。本研究は糖尿病治療における新たな治療標的を提示しようとするものである。

3 . 研究の方法

(1) 初代培養 BBB 細胞の採取 ; 脳血管内皮細胞、脳ペリサイトおよびアストロサイトはそれぞれ 2-8 週齢、3 週齢および生後 1-2 日の wistar rat から単離培養した。

(2) 視床下部神経細胞インスリン感受性の評価 ; 視床下部神経細胞株 GT1-7 にインスリンを 2 時間処理後、GT1-7 細胞内 Akt のリン酸化タンパク質発現量を指標として、インスリン感受性を評価した。GT1-7 インスリン感受性に対する CypA の影響は、糖尿病悪化因子メチルグリオキサール (MG) および TNF- α を GT1-7 に 24 時間負荷した後に、インスリンを 2 時間刺激した際の Akt リン酸化タンパク質発現量の変化を用いて評価した。

(3) 糖尿病モデルマウスの作製 ; ICR マウスに high fat diet (HFD) を 2, 4 および 8 週間それぞれ負荷し、肥満誘発性糖尿病モデルマウス (DM マウス) を作製した。モデルマウスは、HFD 負荷期間依存的な体重増加・血糖値上昇を示した。DM マウスから血漿、脳および脳微小血管を採取し、western blot 法により CypA および CD147 発現量を測定した。また、MILLIPLEX®を用いて、血漿および脳内での

それぞれ 13 種類の代謝ホルモンおよび 32 種類のサイトカイン/ケモカイン濃度を測定した。DM マウスにおいて、血漿中では C-peptide、インスリン、レプチン、G-CSF、IL-13 が、脳内では IL-1、2、12、13、15 および KC が増加していた。

(4) 脳ペリサイトからの CypA 産生に対する糖尿病悪化因子の影響 ; 脳ペリサイトを無血清培地で 12 時間処理した後、糖尿病悪化因子である TNF- α (100 ng/mL) を 24 時間処理した。処理後、濃縮した培養上清中の CypA を western blot 法により測定した。ペリサイトの TNF- α に対する応答性は、MMP-9 産生の継時的変化を指標として評価した。

4 . 研究成果

(1) 糖尿病病態下における脳内 CypA 発現量の変化

DM マウスにおける CypA およびその受容体 CD147 の発現量の変化 ; 高脂肪食を 8 週間摂取させた DM マウスでは、脳内 CypA および CD147 発現量の有意な増加、また、脳血管内皮細胞およびペリサイトを含む脳微小血管のそれら発現量の軽度増加が認められた。従って、肥満誘発性糖尿病病態下では、脳内 CypA-CD147 シグナル経路が活性化している可能性がある。BBB を構成する脳微小血管およびペリサイトがこの脳内 CypA-CD147 シグナル活性化に促進的な働きをすることが推測される。

BBB 構成細胞における CypA 産生量および CD147 発現量の比較 ; DM マウスにおいて BBB を構成する脳微小血管で CypA および CD147 発現量の増加が認められたことから、脳微小血管を構成する脳血管内皮細胞、ペリサイトおよび脳微小血管を取り囲むアストロサイトにおける CD147 および CypA 産生量を比較検討した。CypA 産生量は BBB 構成細胞の中でペリサイトが最も多かった。CD147 はいずれの BBB 構成細胞にも発現していた。

これらの結果は、ペリサイト由来 CypA が血液脳関門構成細胞間 cross talk の情報伝達因子である可能性を示唆する。

ペリサイト由来 CypA 産生に対する糖尿病悪化因子の影響；糖尿病病態下では血液中の TNF- α などが増加することにより末梢組織のインスリン抵抗性が形成され病態が進展する。そこで、糖尿病悪化因子 TNF- α によるペリサイトの CypA 産生に対する影響を検討した。TNF- α 処理によりペリサイトの CypA 産生量は増加した。従って、脳ペリサイトは、糖尿病病態下での脳内 CypA-CD147 シグナル活性化に促進的役割を担っている可能性がある。

(2) 糖尿病病態時における視床下部神経のインスリン感受性に対する CypA の作用

糖尿病病態時に脳内あるいは血液中で増加する炎症性サイトカイン TNF- α および糖化産生物質 MG をマウス視床下部神経細胞 GT1-7 に負荷することにより糖尿病病態時の視床下部神経モデルを作製した。このモデルを用いて糖尿病病態下での視床下部神経のインスリン感受性に対する CypA の作用について検討した。CypA は、MG によるインスリン感受性低下を変化させなかったが、TNF- α によるインスリン感受性低下を増悪させることが判った。

(3) 糖尿病による BBB 機能低下における CypA の役割

我々は DM マウスでは BBB 機能が低下することをすでに明らかにしている。この BBB 機能低下により、脳内インスリン抵抗性形成に関与する TNF- α などの糖尿病悪化因子が脳内へ流入している可能性がある。そこで、糖尿病病態下において脳内で増加する CypA が BBB 機能低下に関与する可能性を明らかにする目的で、in vitro BBB モデルを用いて CypA の BBB 機能に対する作用を検討した。

In vivo を概挿した in vitro BBB モデル作製；Transwell®を用いて脳血管内皮細胞、ペリ

サイトおよびアストロサイトからなる in vitro BBB モデルを作製した。本モデルの有用性については、年齢依存的な BBB 機能変化における in vivo と in vitro の相関性に関する実験等により明らかにした（発表論文 2, 3）。

BBB 機能に対する CypA の作用；In vitro BBB モデルの脳実質側に CypA を負荷したところ、tight junction 機能の指標である TEER および Na-F 透過性は変化しなかった。従って、糖尿病における BBB 機能低下には脳ペリサイト由来 CypA が関与していない可能性が示唆された。

BBB 機能低下改善薬の探索；糖尿病病態下での BBB 機能低下は、血漿中の炎症性糖尿病悪化因子により誘導され、それら因子の脳内への流入（発表論文 4, 5）が、CypA による脳内インスリン抵抗性形成を促進させることが考えられる。そこで、in vitro BBB モデルを用いて、血液中の糖尿病悪化因子の脳内流入を抑制する血液脳関門機能強化薬剤を探索した。糖尿病治療薬であるメトホルミンが BBB 機能を亢進したことから（発表論文 1）メトホルミンは末梢のインスリン抵抗性に対してだけでなく、脳内のインスリン抵抗性についても有効である可能性が明らかとなった。

(4) まとめ

糖尿病病態下では、脳ペリサイト/脳微小血管組織の CypA 産生増加およびその受容体 CD147 発現増加に伴う CypA-CD147 シグナル活性化が、視床下部神経のインスリン感受性低下を惹起する可能性が示唆された。この脳神経血管機構の異常が糖尿病病態の形成・進展に寄与するものと推測される。

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 5 件)

- 1: Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Kaneshima S, Matsuo M, Sakaguchi S, Takeshige Y, Yamauchi A, Kataoka Y. Metformin induces up-regulation of blood-brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Apr19;433(4):586-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.036. 査読有
- 2: Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(3):492-5. 査読有
- 3: Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Matsumoto J, Machida T, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Sato K, Kataoka Y, Koizumi S. In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from neonatal and adult rats retain age-related barrier properties. *PLoS One.* 2013;8(1):e55166. doi: 10.1371/journal.pone.0055166. 査読有
- 4: Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Sumi N, Machida T, Takahashi H, Yamauchi A, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia lower

P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett.*

2012 Aug 22;524(1):45-8. doi:

10.1016/j.neulet.2012.07.004. 査読有

5: Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa T, Harada E, Miyaji H, Koga M, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y.

Brain pericytes among cells

constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis

factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J*

Neuroinflammation. 2011 Aug 26;8:106. doi:

10.1186/1742-2094-8-106. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 高田英友子、道具伸也、松本純一、町田崇、山内淳史、片岡泰文
メトホルミンによる血液脳関門機能強化
第15回応用薬理シンポジウム 2013年9月28日 ~ 2013年9月29日 コクヨホール
2. 道具伸也、高田英友子、松本純一、町田崇、高橋弘之、山内淳史、片岡泰文
脳ペリサイト由来液性因子による血液脳関門障害
第86回日本薬理学会年会 2013年03月21日 ~ 2013年03月23日 福岡国際会議場 J
Pharmacol Sci. vol. 121 sup. 1 2013
3. 高田英友子
乳幼児と成人期の血液脳関門in vitroモデル
第14回応用薬理シンポジウム 2012年09月03日 ~ 2012年09月04日 ベルクラシック甲府
4. 高田英友子、道具伸也、松本純一、町田崇、高橋弘之、山内淳史、片岡泰文
脳ペリサイトは血液脳関門構成細胞のなかで最大の TNF- 誘発性 MMP-9 産生能と細胞遊走能を有する
第85回日本薬理学会年会2012年3月16日国立

京都国際会館 J Pharmacol Sci. vol. 118 sup. 1
2012

5. 道具伸也、高田芙友子、松本純一、高橋弘之、町田崇、一木奈津子、関菜摘子、山内淳史、片岡泰文

脳ペリサイトはマクロファージの脳実質内浸潤を阻害する

第85回日本薬理学会年会2012年3月16日国立
京都国際会館 J Pharmacol Sci. vol. 118 sup. 1
2012

6. 町田崇、道具伸也、高田芙友子、松本純一、高橋弘之、宮地晴樹、園木優唯、山内淳史、片岡泰文

脳ペリサイトに特異的な TNF- α 誘発性 MMP-9 産生における活性酸素種および ERK1/2・Akt の遅延的活性化の関与

第85回日本薬理学会年会2012年3月16日国立
京都国際会館 J Pharmacol Sci. vol. 118 sup. 1
2012

7. 松本純一、道具伸也、高田芙友子、堂籠航、川口真奈美、山内淳史、片岡泰文

脳ペリサイトの IL-6 放出機構

第 64 回日本薬理学会西南部会 2011 年 11 月
20 日 KKR ホテル博多

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：血液脳関門障害症候群治療薬

発明者：高田芙友子、道具伸也、片岡泰文、松本純一、金嶋修司

権利者：福岡大学

種類：PCT国際出願

番号：PCT/JP2011/079266

出願年月日：2011 年 12 月 12 日

国内外の別：外国

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高田 芙友子 (TAKATA, Fuyuko)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：70412575

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

片岡 泰文 (KATAOKA, Yasufumi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：70136513

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：60399186

松本 純一 (MATSUMOTO, Junichi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10550064

町田 崇 (MACHIDA, Takashi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：30586144