

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790994

研究課題名(和文) 血液脳関門における A β 輸送システムの改変

研究課題名(英文) Analyses for transport of Amyloid beta through the blood-brain barrier

研究代表者

佐野 泰照 (SANO, Yasuteru)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20379978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) では、A β 蛋白の蓄積が発症や病気の進展に関与している。本研究ではヒトの血液脳関門 (BBB) を介した A β 蛋白輸送機序を明らかにする目的で、我々の樹立したヒト *in vitro* BBB モデル (TY09 細胞) を用いた解析を行った。その結果、LRP1 と ABCG2 が A β 蛋白輸送に関与していることが示された。また、リファンピシンによって ABCG2 と LRP1 の遺伝子発現が増大することも明らかになった。これらの知見は、A β の脳内濃度を減少させるという新たな AD の治療あるいは AD の予防法開発に進展するという点で非常に意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：The clearance of amyloid beta (Ab) from the brain could be a novel therapeutic target for Alzheimer disease. We examined the role of efflux transporters as well as LRP1 on Ab transport on human BBB. Our results using a new human *in vitro* blood-brain barrier (BBB) model suggest that ABCG2 as well as LRP1 act to prevent the blood-borne Ab from entering brain at the human BBB. In addition, we also elucidated that rifampicin up-regulates the expression of LRP1 and ABCG2 in endothelial cells derived from human BBB.

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：アミロイド 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) に特徴的な老人斑アミロイドは A β 蛋白からなり, A β の蓄積が AD の発症や進展に関与しているとするアミロイド仮説は現在 AD の病因として広く受け入れられている. しかし AD 脳で A β がアミロイドとして蓄積する機序についてはいまだ不明な点が多い. 家族性 AD の一部では A β の産生亢進が発症に関与しているとされている. しかしながら孤発性の AD に関しては A β の産生が亢進しているという証拠は得られていないため, A β の除去能力の低下が A β の脳内レベルを上昇させ, AD 発症の一因となっている可能性が注目されている. 脳内の A β は分解を受けずに血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を介して循環血液中へ排出されることが明らかになり, A β 除去機構として注目されている. BBB の首座は脳微小血管内皮細胞からなり, 隣接する内皮細胞間に形成された tight junction によって細胞間隙を經由した物質透過は厳密に制限されている. したがって脳から血液中へ A β が排出されるためには BBB に存在する受容体やトランスポーターを介して内皮細胞をトランスサイトーシスにより通過する必要がある. その A β 排出の担い手として近年 LDL receptor-related protein-1 (LRP-1) や P 糖タンパク (P-glycoprotein: Pgp) に関心が寄せられている. しかし, これらの知見は線維芽細胞を用いた実験系での解析であったり, トランスジェニックマウスを用いた研究が大部分で, ヒト由来の BBB 構成内皮細胞を用いた *in vitro* での研究はほとんどなされてこなかったのが現状である. また, マウスの *in vivo* の解析にて LRP-1 は A β の排出に関与していないとする報告も最近なされており, ヒトの血液脳関門由来の材料を用いたヒト A β 輸送システムの解明が急務となっている.

2. 研究の目的

A β の血液脳関門を介したヒトでの輸送に関わる蛋白を明らかにする. また, A β 輸送にかかわる蛋白の発現を制御しうる物質の検索を行うことを目的とする.

3. 研究の方法

我々の樹立したヒト *in vitro* BBBモデル (TY09細胞) に発現している LRP1, ABCG2, P-glycoprotein (P-gp), MRP4 を RNA 干渉技術 (siRNA) を用いて減少させ, これらの蛋白の発現を減少させた TY09細胞と control の TY09細胞における 125 I-A β_{1-40} の取り込みを比較することによって, これらの輸送蛋白がヒト BBB にて A β 輸送に関与しうるか否かの検討を行った.

さらに, 図 1 のような *in vitro* BBBモデルを作成し, P-gp や ABCG2 の発現を減少させた系と, control の系における血液側から脳側へ 125 I-A β の透過量を比較した.

また, リファンピシンとカフェインが LRP1, p-gp, ABCG2 の発現を制御するか否かをリアルタイム PCR を用いて検討した.

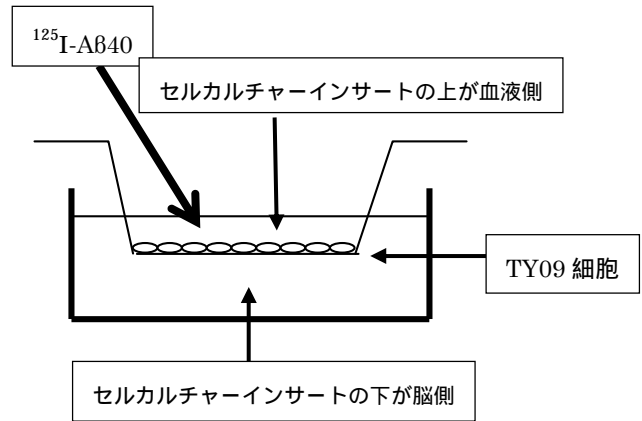


図 1

4. 研究成果

LRP1 と ABCG2 を siRNA にて発現を減少させると TY09細胞への A β の取り込みが増加した. 一方, P-gp と LRP4 蛋白の減少は A β の TY09細胞への取り込みには影響を与えなかった. また, 上記図 1 の実験系で TY09細胞の ABCG2 の蛋白発現を減少させると A β の血液側から脳側への透過量が増加した. 一方, P-gp 発現の減少は A β の TY09細胞を介した透過量に影響を及ぼさなかった. 以上より, ヒトの血液脳関門では LRP1 と ABCG2 が A β を脳側から血液側へ押し戻す (あるいは排出する) 方向へ機能している可能性があることが示された. また, リファンピシンによって ABCG2 と LRP1 の発現が増大することも明らかになった. すなわち, リファンピシンは ABCG2 と LRP1 の発現を増強させ, A β の脳内濃度を減少させる方向へ作用する可能性が示された. これらの知見は, A β の脳内濃度を減少させるという新たな AD の治療あるいは AD の予防法開発に進展しうるという点で非常に意義深いものである.

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 13 件)

1. Sano Y and Kanda T. Blood-neural barrier: Overview and latest progress. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2013;4:220-227. 査読有. DOI: 10.1111/cen3.12021
2. Maeda T, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T,

- Obinata M, Ueda M, Kanda T. Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines. *Clin Exp Neuroimmunol*. 4: 326-338, 2013. 査読有. DOI: 10.1111/cen3.12045
3. Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Omoto M, Tasaki A, Oishi M, Koga M, Saito K, Takahashi T, Nakada T, Kanda T. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J Neurol Sci*. 2013 Aug 15;331(1-2):136-44. 査読有. doi: 10.1016/j.jns.2013.05.035.
 4. Saito K, Shimizu F, Koga M, Sano Y, Tasaki A, Abe M, Haruki H, Maeda T, Suzuki S, Kusunoki S, Mizusawa H, Kanda T. Blood-brain barrier destruction determines Fisher/Bickerstaff clinical phenotypes: an in vitro study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Jul;84(7):756-65. 査読有. doi: 10.1136/jnnp-2012-304306.
 5. Nakamichi K, Kishida S, Tanaka K, Suganuma A, Sano Y, Sano H, Kanda T, Maeda N, Kira J, Itoh A, Kato N, Tomimoto H, Kurane I, Lim CK, Mizusawa H, Saijo M. Sequential changes in the non-coding control region sequences of JC polyomaviruses from the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol*. 2013 Mar;158(3):639-50. 査読有. doi: 10.1007/s00705-012-1532-3.
 6. Abe M, Sano Y, Maeda T, Shimizu F, Kashiwamura Y, Haruki H, Saito K, Tasaki A, Kawai M, Terasaki T, Kanda T. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines: a new in vitro blood-nerve barrier (BNB) model. *Cell Struct Funct*. 2012;37(2):89-100. 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672995>
 7. Sano Y, Kashiwamura Y, Abe M, Dieu LH, Huwyler J, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Saito K, Tasaki A and Kanda T. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2012; 3:1-12. 査読有. doi: 10.1111/cen3.12001
 8. Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, Kanda T. Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res*. 2012 Feb;37(2):401-9. 査読有. doi: 10.1007/s11064-011-0626-8.
 9. Sano Y, Kanda T. Isolation and properties of endothelial cells forming the blood-nerve barrier. *Methods Mol Biol*. 2011;686:417-25. 査読有. doi:10.1007/978-1-60761-938-3_21.
 10. Sano Y, Shimizu F, Kawai M, Omoto M, Negoro K, Kurokawa T, Fujisawa H, Suzuki M, Okayama N, Suehiro Y, Hinoda Y, Kanda T. p.Arg332Cys mutation of NOTCH3 gene in two unrelated Japanese families with CADASIL. *Intern Med*. 2011;50(22):2833-8. 査読有. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082899>
 11. Shimizu F, Sano Y, Tominaga O, Maeda T, Abe MA, Kanda T. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*. 2011 Jun;54(6):1517-26. 査読有. doi: 10.1007/s00125-011-2107-7.
 12. Kashiwamura Y, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Kawai M, Kanda T. Hydrocortisone enhances the function of the blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res*. 2011 May;36(5):849-55. 査読有. doi: 10.1007/s11064-011-0413-6.
 13. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, Ueda M, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kanda T. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells *J Cell Physiol*. 2011 Jan;226(1):255-66. 査読有. doi: 10.1002/jcp.22337
- [学会発表](計 5 件)
1. Yasuteru Sano. Role of LRP1 and ATP-binding cassette transporters in efflux of amyloid- at the human blood-brain barrier. *Neuroscience 2013*. Nov 12, 2013. San Diego, USA.
 2. 佐野泰照. アミロイド 蛋白の血液脳関門を介した輸送機構の解析. 第35回神経組織培養研究会. 2013年6月29日-30日. 吹田(ホテル阪急エキスポパーク).
 3. 佐野泰照. アミロイド 蛋白の血液脳関

- 門を介した輸送機構の解析～続報．第54回日本神経学会学術大会．2013年5月29日-6月1日．東京（東京国際フォーラム）
4. 佐野泰照．アミロイド 蛋白の血液脳関門を介した輸送機構の解析～第二報．第53回日本神経学会総会．2012年05月22日～24日．東京（東京国際フォーラム）
 5. 佐野泰照．アミロイド 蛋白の血液脳関門を介した輸送機構の解析．第 52 回日本神経学会総会．2011 年 5 月 19 日．名古屋（名古屋国際会議場）

〔図書〕(計 1 件)

1. 佐野泰照 他，中山書店，最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄，2012，410

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 泰照 (SANO, Yasuteru)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20379978

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし