

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460113

研究課題名(和文)肥満症による末梢慢性炎症の脳内伝播過程において「鍵」となる脳ペリサイトの病変化

研究課題名(英文) A key role of the brain pericytes in the induction and development of brain inflammation under the pathophysiological conditions of obesity-associated diabetes.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症に伴う末梢慢性炎症は糖尿病を発症させる。この末梢炎症は、脳機能低下の危険因子である。しかし、末梢炎症が、どのような機構で脳内へ伝播し、脳機能障害を惹起させるかは解明されていない。そこで、我々は、血液と脳実質のインターフェイスであり、血液脳関門(BBB)構成細胞の中で最も炎症性サイトカインであるTNF- α に応答する脳ペリサイトに着目した。本研究ではTNF- α やトロンビンなどの肥満関連因子が、脳ペリサイトに作用し、BBB機能障害やミクログリア活性化を誘導することを明らかにした。脳ペリサイトは、末梢から脳内へ炎症を伝播する「鍵」となる細胞と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Obesity-associated diabetes is due to chronic peripheral inflammation and this is a major risk factor for brain dysfunction. However, it is unknown how the peripheral inflammation spreads to the brain to induce the central nervous system dysfunction. To address this question, we focused on brain pericytes, one of the constituents of the blood-brain barrier (BBB). Pericytes located around the microvessel are the interface between blood and brain parenchyma and have a high ability to respond to inflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α . In this study, we provided evidences that activated brain pericytes due to obesity-related factors such as TNF- α and thrombin have a specific property of lowering BBB function and activating microglia to develop brain inflammation under the conditions of peripheral inflammation.

研究分野：薬物動態学

キーワード：脳ペリサイト 肥満症 TNF-alpha トロンビン 血液脳関門 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

肥満症は世界的に5億人の成人が罹患し蔓延する「現代病」である。本邦においても、BMI 25 kg/m²以上の肥満成人は2300万人に達しその半数が肥満症を発症している。肥満症は、肥満組織の肥大を起点として進行する全身性の慢性炎症疾患である。その病態は、肥満細胞やマクロファージ活性化に伴う炎症性サイトカイン(TNF- α など)、ケモカイン(MCP-1)、レジスチン、遊離脂肪酸(FFA)、C反応性蛋白(CRP)などの肥満増悪因子の産生増大を基盤として形成される。この低度の炎症が持続する問題点は、全身のインスリン抵抗性を惹き起こし糖尿病、高脂血症、高血圧そして動脈硬化症へと症状を進展・悪化させることにある。

一方、疫学的研究により、肥満症患者において摂食や情動行動などの脳機能の障害だけでなく認知機能障害も易発症であることが明らかになった。高脂肪食を負荷した肥満モデル動物において、脳の炎症担当細胞ミクログリアの活性化、炎症性サイトカインの上昇に伴い認知機能低下が認められることから、肥満症による脳機能障害もまた慢性炎症を成因とすることが考えられる。

米国食品医薬品局(FDA)は、最近相次いで、長期投与可能で内臓脂肪を減少させる肥満症治療薬 Lorcaserin および Phentermine/topiramate を承認した。本邦においても厚労省は、2013年9月にセチリスタットを承認した。肥満症治療薬は、体重減少だけでなくHbA1cやLDLも減少させることから、肥満増悪因子産生の低下に伴い末梢組織の慢性炎症を改善すると考えられる。しかし、肥満症による脳機能障害に対する効果については不明であり、末梢炎症の改善が脳内炎症の低減に導くか否かは究明すべき課題である。すなわち、肥満症により脳内炎症経路が持続的に駆動される

と末梢炎症とは独立した脳独自の炎症病態が形成されるのか否かを追求する必要がある。

脳は“脳が生きる”環境の恒常性を厳密に保つ必要があり、高次に分化した特異的バリアである血液脳関門(BBB)により保護されている。そのため、末梢のマクロファージなどの免疫担当細胞は脳内へ容易には浸潤できない。

それでは肥満症により形成された末梢炎症はどのようにして脳内へ伝播されるのだろうか？

末梢組織・器官の慢性炎症が脳組織へと誘導される仕組みは明らかになっていない。BBBは、脳血管内皮細胞、アストロサイト及びペリサイトで構成され、自発的および刺激誘発的にサイトカインなどの生理活性物質を産生し、血液中および脳実質へ放出する能力を有する。急性炎症病態(脳梗塞など)ではBBBの構造的破綻により免疫担当細胞が脳内へ浸潤するが、肥満症ではBBBの構造的破綻を伴うことなく、血液中の肥満増悪因子により緩徐に脳の炎症病態が進行すると本申請者は想定した。すなわち、BBBは循環血液中の生理活性物質を介して末梢からの情報を脳へと誘導する「インターフェイス」として中継することにより、末梢炎症を脳内へ伝播し神経活動に変調をきたす可能性がある。本申請者は、これまでにBBB構成細胞である脳血管内皮細胞・ペリサイト・アストロサイトの炎症刺激応答の差異に着目し、ペリサイトが最も高応答性であることを明らかにし、炎症伝播過程におけるBBBインターフェイスの中核を担う可能性を提起した。

ペリサイトの炎症刺激感受性と炎症性メディエーター放出能：ペリサイトは、他のBBB構成細胞である内皮細胞、アストロサイトと比較して、Tumor necrosis factor

(TNF)- α 刺激による matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) IL-6、IL-1 α 、MIP-1 α などの炎症性メディエーターの産生量が最も多かった。

炎症刺激感受性ペリサイトによるミクログリアの活性化：TNF- α で刺激されたペリサイトは、ミクログリアの強力な活性化作用を示した。一方、脳血管内皮細胞およびアストロサイトによる活性化作用は極めて弱かった。興味深いことに、ミクログリア単独では TNF- α により活性化しなかった。

以上の知見は、BBB 構成細胞の中で、ペリサイトが炎症性刺激に対する検出器として、さらに多様な炎症性メディエーターを放出する奏効器として働くことにより、直接あるいはミクログリア活性化を介して脳内炎症を形成する可能性を示唆する。従って、ペリサイトは、低度で慢性的な脳内炎症を伝播する過程の各段階（炎症の検出・誘導・形成）に介入しうる「複雑な制御装置」であると考えられる。

それでは肥満症においてこの複雑な装置を駆動するものは何か？

肥満増悪因子である FFA、TNF- α 、CRP などは、末梢血管において platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) β シグナルを活性化し心血管イベントを悪化させる。脳ペリサイトもまた、PDGFR β を発現していることから、肥満増悪因子に応答する可能性がある。

以上を総合し、本申請者はペリサイトを肥満症による末梢慢性炎症の脳内誘導機構における「基幹細胞」と捉え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

内臓脂肪型肥満を基因とする肥満症による脳機能（認知機能や摂食行動など）の障害は、発症メカニズムが不明で、その治療標的につ

いては究明すべき課題として残されている。本申請者は、肥満症による脳機能障害の形成・進展は、肥満による末梢炎症の脳内への伝播に起因すると仮説し、本研究を企てた。すなわち、この過程における基幹細胞として「脳微小血管周皮細胞（脳ペリサイト）」を捉え、本細胞の肥満関連因子によるペリサイトの病変が炎症伝播機構の駆動力となる可能性を追求する。

3. 研究の方法

肥満誘発性炎症モデルマウスの作製；雄性 ICR マウスに high fat diet (HFD) を 8-20 週間給餌させて、肥満誘発性炎症モデルマウスを作製した。

末梢炎症モデルマウスの作成；雄性 ICR マウスに 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) を投与し、末梢炎症モデルマウスを作製した。LPS は炎症誘発性物質であり、肥満糖尿病時に血液中の LPS 濃度が増加することが知られている。

脳ペリサイトの単離；3-4 週齢ラットより脳ペリサイトを単離培養し、肥満関連因子に対する応答性を評価した。

4. 研究成果

肥満糖尿病マウスにおける脳ペリサイトの変化；高脂肪食(HFD)を 8 週間負荷したマウスにおいて、PDGFR β 発現細胞数および脳微小血管における PDGFR β 発現量に変化は認められなかった。一方で HFD を 18-20 週間負荷したマウスにおいて、PDGFR β 発現細胞数に変化は認められなかったが、脳微小血管における PDGFR β 発現量は有意に増加した (Fig. 1)。また HFD を 18-20 週間負荷したマウスにおいて、ミクログリアマーカーである Iba-1 の発現量が軽微に上昇した (Fig. 2)。

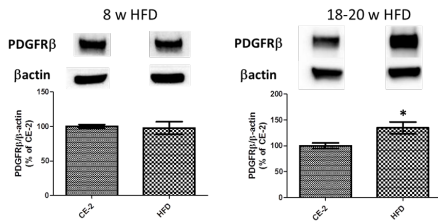


Fig. 1. The expression of PDGFR β in the brain microvessels isolated from mice fed HFD for 8 or 18-20 weeks.

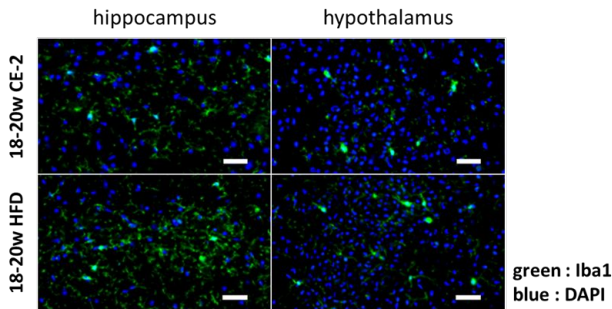


Fig. 2. Iba-1 expression in the hippocampus and hypothalamus of mice fed HFD for 18-20 weeks.

肥満関連因子応答性ペリサイト(活性化ペリサイト)の探索;肥満病態下において、血液中では、TNF- α 、LPS、thrombin および OSM の量が変化する。これら、肥満関連因子が脳ペリサイトに及ぼす影響について検討した。

肥満関連因子応答性ペリサイトによる BBB 障害;HFD 負荷マウスにおいて、BBB 機能が低下することをこれまでに明らかにした。脳ペリサイトは BBB 機能維持に直接関わるため、肥満関連因子応答性ペリサイトの BBB 機能に対する影響を検討した。肥満関連因子である thrombin は、脳ペリサイトに作用し、PAR1/PKC を介して MMP-9 を産生させ、BBB 機能を低下させた。Oncostatin M (OSM) は、脳血管内皮細胞の STAT3 を持続的に活性化することで BBB 機能を低下させた。OSM による BBB 機能低下に脳ペリサイトが関与するか検討したところ、脳ペリサイトの存在下で、OSM による BBB 機能障害作用は増強された。以上のことから脳ペリサイトは肥満関連因子に応答し、応答ペリサイトは BBB 障害を誘導することが分かった。

肥満関連因子である LPS マウスにおける脳ペリサイトの病変化;LPS をマウスに投与し、ペリサイトマーカーである PDGFR β 発現量およびミクログリアマーカーである Iba-1 発現量を検討した。LPS 投与により脳内 PDGFR β の発現細胞数および Iba-1 発現量は増加した。LPS による PDGFR β 発現量の上昇は PDGFR β 阻害薬であるイマチニブにより抑制された。LPS 投与したマウスより脳微小血管を採取し、TNF- α 受容体である TNFR2 の発現量を確認したところ、LPS により TNFR2 の発現量が上昇し、この上昇はイマチニブ併用により抑制される傾向を認めた。また、脳微小血管における MMP-9 発現も、LPS 投与により増加し、イマチニブ併用により軽微に抑制された。これらのデータは LPS に誘導された末梢炎症が、脳ペリサイトの PDGFR β /TNFR2 の発現量上昇を誘導し、ミクログリアの活性化に与する可能性を示している。

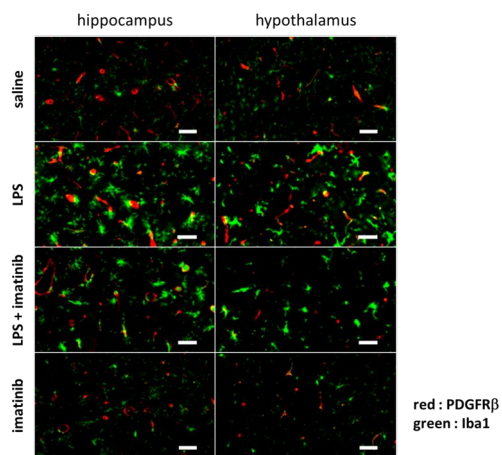


Fig.3. The localization of PDGFR β positive cells and Iba-1 positive cells in the hippocampus and hypothalamus of LPS (10 mg / kg i.p.) and LPS plus imatinib (100 mg / kg p.o.) treated ICR mice.

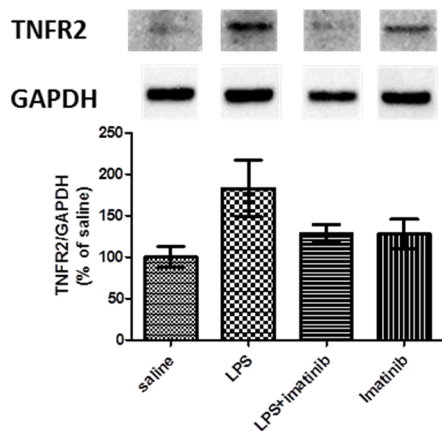


Fig. 4. The expression of TNFR2 in the brain microvessels isolated from the LPS and LPS plus imatinib treated mice.

肥満関連因子応答性ペリサイトによるミクログリアの活性化; 脳ペリサイトは TNF- α に応答し、MMP-9、MIP-1 α および IL-6 を産生する。TNF- α 応答性ペリサイトは、I κ B-NF κ B および JAK-STAT3 経路を介して IL-6 産生し、ミクログリアの IL-1 β 発現量産生を誘導した。また TNF- α 応答性ペリサイトは、ミクログリアの遊走能を増強させた。

以上のことから、肥満などの末梢炎症病態下では、脳ペリサイトが肥満関連因子に応答し、BBB 機能低下およびミクログリアの活性化を介して脳内炎症を誘導する可能性がある。

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 8 件)

1: Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Sakaguchi S, Kimura I, Yamauchi A, Kataoka Y. Oncostatin M-induced blood-brain barrier impairment is due to prolonged activation of STAT3 signaling in vitro. *J Cell Biochemistry*. 2018 in press. 査読有

2: Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Machida T, Hatip FFB, Hatip-Al-Khatib I, Yamauchi A, Kataoka Y. TNF- α -sensitive brain pericytes activate microglia by releasing IL-6 through cooperation between I κ B-NF κ B and JAK-STAT3 pathways. *Brain*

Res. 2018 Apr 24. pii: S0006-8993(18)30217-8. doi:

10.1016/j.brainres.2018.04.023. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29702085. 査読有

3: Machida T, Takata F, Matsumoto J, Miyamura T, Hirata R, Kimura I, Kataoka Y, Dohgu S, Yamauchi A. Contribution of thrombin-reactive brain pericytes to blood-brain barrier dysfunction in an in vivo mouse model of obesity-associated diabetes and an in vitro rat model. *PLoS One*. 2017 May 10;12(5):e0177447. doi: 10.1371/journal.pone.0177447. eCollection 2017. PubMed PMID: 28489922; PubMed Central PMCID: PMC5425209. 査読有

4: Machida T, Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Kimura I, Koga M, Nakamoto K, Yamauchi A, Kataoka Y. Role of thrombin-PAR1-PKC θ / δ axis in brain pericytes in thrombin-induced MMP-9 production and blood-brain barrier dysfunction in vitro. *Neuroscience*. 2017 May 14;350:146-157. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.026. Epub 2017 Mar 24. PubMed PMID: 28344073. 査読有

5: Dohgu S, Takata F, Kataoka Y. Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2015 Jul;146(1):63-5. doi: 10.1254/fpj.146.63. Japanese. PubMed PMID: 26165344. 査読無

6: Machida T, Takata F, Matsumoto J, Takenoshita H, Kimura I, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericytes are the most thrombin-sensitive matrix metalloproteinase-9-releasing cell type constituting the blood-brain barrier in vitro. *Neurosci Lett*. 2015 Jul 10;599:109-14. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.028. Epub 2015 May 19. PubMed PMID: 26002077. 査読有

7: Takahashi H, Takata F, Matsumoto J, Machida T, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 20;457(4):532-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.016. Epub 2015 Jan 15. PubMed PMID: 25597994. 査読有

8: Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M,

Futagami K, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett.* 2014 Aug 22;578:133-8. doi: 10.1016/j.neulet.2014.06.052. Epub 2014 Jun 30. PubMed PMID: 24993300. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1: Fuyuko Takata-Tsuji, Shinya Dohgu, Takashi Machida, Junichi Matsumoto, Ikuya kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka, An interaction between thrombin and pericytes mediates the blood-brain barrier dysfunction in obesity-associated diabetes. 12th international conference on cerebral vascular biology, 2017 Dec, Melbourne Australia

2: Fuyuko Takata-Tsuji, Shinya Dohgu, Junichi Matsumoto, Ikuya kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka, TNF- α -stimulated brain pericytes activate microglia to induce inflammation at the neurovascular unit. 19th international symposium on signal transduction at the Blood-Brain Barriers, 2016 Sep, Copenhagen Denmark

3: 道具伸也、町田崇、高田芙友子、木村郁哉、松本純一、山内淳史、片岡泰文 脳ペリサイトの PAR1-PKC / シグナルは トロンピン誘発性 MMP-9 産生および血液脳関門障害に關与する 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 横浜

4: 町田崇、道具伸也、高田芙友子、松本純一、平田亮介、宮村知幸、山内淳史、片岡泰文 糖尿病による BBB 機能不全における トロンピン反応性脳ペリサイトの役割 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 名古屋

5: 松本純一、道具伸也、高田芙友子、町田崇、二神幸次郎、山内淳史、片岡泰文 脳ペリサイトは TNF- α に応答してグリア細胞より多量の IL-6 を遊離する。- 脳ペリサイトの IL-6 産生における細胞内シグナル経路の役割 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 名古屋

6: 高田芙友子、松本純一、道具伸也、町田崇、山内淳史、片岡泰文 脳ペリサイトは TNF- α に応答してマイクログリアを活性化する 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 名古屋

7: 船越美帆、松本純一、高田芙友子、道具伸也、町田崇、穴井佑佳、二神幸次郎、山内淳史、片岡泰文 TNF- α に対する脳ペリサイト応答を介するミクログリア活性化機構 第 67 回日本薬理学会西南部会 2014 年 11 月 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

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

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号: 60399186

片岡 泰文 (KATAOKA, Yasufumi)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号: 70136513

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

松本 純一 (MATSUMOTO, Junichi)
福岡大学・薬学部・助教
町田 崇 (MACHIDA, Takashi)
福岡大学・薬学部・助教