

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461271

研究課題名(和文) 血液脳関門を介した脳内A $\beta$  除去システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of the system eliminating amyloid-beta across the blood-brain barrier

研究代表者

佐野 泰照 (SAN0, 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では我々が樹立したヒトBBB由来脳微小血管内皮細胞株(TY10株)およびペリサイト株(HBPCT株)を用い、ヒトBBBにおけるA $\beta$  除去機構に関する両細胞の役割について検討した。結果、P-gpやABCG2はHBPCTよりもTY10に多く発現しており、LRP1はTY10よりもHBPCTに多く発現していた。さらにHBPCTにLRP1の阻害蛋白であるRAPをあらかじめ作用させると、RAPのない群に比し有意にA $\beta$  の取り込みが低下した。以上より、ヒトBBBにおいては脳微小血管内皮細胞ではABC transporterを介して、またペリサイトではLRP1によりA $\beta$  除去が行われている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The clearance of amyloid  $\beta$  from the brain could be a novel therapeutic target for Alzheimer's disease (AD). Although LRP1 and ABC transporters were the A $\beta$  transporters at the blood-brain barrier (BBB), conflicting data exist regarding the contribution of these proteins to the clearance of A $\beta$  through the BBB. In this study, we examined the expression of LRP1, p-glycoprotein, ABCG2 in the human brain pericytes (HBPCT) and human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) using real time PCR, western blot, and immunostaining analyses. LRP1 were mainly expressed in HBPCT, not HBMECs. On the other hand, P-glycoprotein and ABCG2 were predominantly expressed in HBMECs. In addition, we disclosed that RAP, an inhibitor of LRP1, decreased the uptake of FAM-A $\beta$  40 into HBPCT cells. These results indicated that A $\beta$  could be transported across not only HBMEC but also HBPCTs via these receptor and transporter.

研究分野：神経内科学

キーワード：血液脳関門 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景  
アルツハイマー病に特徴的な老人斑アミロイドは A $\beta$  蛋白からなり、A $\beta$  の蓄積がアルツハイマー病の発症や進展に關与しているとするアミロイド仮説は現在アルツハイマー病の病因として広く受け入れられている。しかしアルツハイマー病脳で A $\beta$  が蓄積する機序についてはいまだ不明な点が多い。家族性アルツハイマー病の一部では A $\beta$  の産生亢進が発症に關与しているとされている。しかしながら孤発性のアルツハイマー病に關しては A $\beta$  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 $\beta$  の除去能力の低下が A $\beta$  の脳内レベルを上昇させ、アルツハイマー病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 $\beta$  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 $\beta$  除去機構として注目されている。また、末梢臓器で産生された A $\beta$  が BBB を通じて脳内へ取り込まれるシステムも存在する。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経由した物質透過は厳密に制限されている。したがって A $\beta$  が BBB を乗り越えるには 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。A $\beta$  排出の担い手として LDL receptor-related protein-1 (LRP1)、LRP2、P 糖タンパク (P-glycoprotein: Pgp) などが報告されており、A $\beta$  の末梢から脳内への BBB を介した取り込みには receptor for advanced glycation end products (RAGE) が關与していると報告されている。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 $\beta$  の排出に關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 $\beta$  輸送システムの解明が急務となっている。

## 2. 研究の目的

我々が樹立した温度感受性ヒト脳微小血管内皮細胞株 (TY10 株) およびペリサイト株 (HBPCT 株) で構成されるヒト *in vitro* BBB モデルを用いて A $\beta$  のヒト BBB を介した除去システムを分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

温度感受性ヒト脳微小血管内皮細胞株 (TY10 株) およびペリサイト株 (HBPCT 株) を用い、従来 A $\beta$  の BBB 輸送に關与しているとされるトランスポーター (P-gp, ABCG2) や受容体 (LRP1, LRP2) のヒト脳微小血管内皮細胞およびペリサイトにおける発現を RT-PCR、ウエスタンブロッティング、および免疫染色を用いて詳細に検討した。また、HBPCT 株および LRP1 の阻害蛋白である RAP を用い、ヒトペリサイトが A $\beta$  の BBB を介した除去に關与しているか否かを検討した。

## 4. 研究成果

P-gp や ABCG2 といった ABC transporter は

HBPCT よりも TY10 に多く発現しており，LRP1 や LRP2 は TY10 よりも HBPCT に多く発現していた．さらに HBPCT に LRP1 の阻害蛋白である RAP をあらかじめ作用させると，RAP のない群に比し有意に A $\beta$  の取り込みが低下した．以上より，ヒト BBB では脳微小血管内皮細胞では ABC transporter を介して，またペリサイトでは LRP1 により A $\beta$  除去が行われていることが明らかとなった．

#### 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 12 件)

1. Sano H, Sano Y, Ishiguchi E, Shimizu F, Omoto M, Maeda T, Nishihara H, Takeshita Y, Takahashi S, Oishi M, Kanda T. Establishment of a New Conditionally Immortalized Human Skeletal Muscle Microvascular Endothelial Cell Line. *J Cell Physiol*. 2017. doi: 10.1002/jcp.25772. 印刷中 査読あり
2. Spampinato SF, Merlo S, Sano Y, Kanda T, Sortino MA. Astrocytes contribute to A $\beta$ -induced blood brain barrier damage through activation of endothelial MMP9. *J Neurochem*. 2017 May 10. doi: 10.1111/jnc.14068. 印刷中 査読あり
3. Takeshita Y, Obermeier B, Cotleur AC, Spampinato SF, Shimizu F, Yamamoto E, Sano Y, Kryzer TJ, Lennon VA, Kanda T, Ransohoff RM. Effects of neuromyelitis optica-IgG at the blood-brain barrier in vitro. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;4(1):e311. doi: 10.1212/NXI.0000000000000311. 査読あり
4. Sano Y, Nakano Y, Omoto M, Takao M, Ikeda E, Oga A, Nakamichi K, Saijo M, Maoka T, Sano H, Kawai M, Kanda T. Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy derived from non-Hodgkin lymphoma: neuropathological findings and results of mefloquine treatment. *Intern Med*. 2015; 54: 965-70. doi: 10.2169/internalmedicine.54.2308. 査読あり
5. Spampinato SF, Obermeier B, Cotleur A, Love A, Takeshita Y, Sano Y, Kanda T, Ransohoff RM. Sphingosine 1 Phosphate at the Blood Brain Barrier: Can the Modulation of S1P Receptor 1 Influence the Response of Endothelial Cells and Astrocytes to Inflammatory Stimuli? *PLoS One*. 2015;10 :e0133392. doi: 10.1371/journal.pone.0133392. 査読あり
6. Nishihara H, Shimizu F, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Kanda T. Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3):e0121488. doi: 10.1371/journal.pone. 査読あり
7. Karassek S, Starost L, Solbach J, Greune L, Sano Y, Kanda T, Kim K, Schmidt MA. Pertussis Toxin Exploits Specific Host Cell Signaling Pathways for Promoting Invasion and Translocation of *Escherichia coli* K1 RS218 in Human Brain-derived Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2015; 290: 24835-43. doi: 10.1074/jbc.M115.650101. 査読あり
8. Takeshita Y, Obermeier B, Cotleur A, Sano Y, Kanda T, Ransohoff RM. An in vitro blood-brain barrier model combining sheer stress and endothelial cell/astrocyte co-culture. *J Neurosci Method* 2014. 232: 165-172. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.013. 査読あり
9. Shimizu F, Tasaki A, Sano Y, Ju M, Nishihara H, Oishi M, Koga M, Kawai M, Kanda T. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis disrupt the blood-brain barrier. *PLoS One* 2014. 9(3): e92872. doi: 10.1371/journal.pone.0092872. 査読あり
10. Tasaki A, Shimizu F, Sano Y, Fujisawa M, Takahashi T, Haruki H, Abe M, Koga M, Kanda T. Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85: 419-430, 2014. doi: 10.1136/jnnp-2013-305907. 査読あり
11. Shimizu F, Omoto M, Sano Y, Matsui N, Miyashiro A, Tasaki A, Maeda T, Koga M, Kaji R, Kanda T. Sera from patients with multifocal motor neuropathy disrupt the blood-nerve barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85: 526-537, 2014. doi: 10.1136/jnnp-2013-305405. 査読あり
12. Shimizu F, Sawai S, Sano Y, Beppu M, Misawa S, Nishihara H, Koga M, Kuwabara S, Kanda T. Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlations with clinical subtypes. *PLoS One* 9: e104205, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0104205 査読あり

[学会発表](計 9 件)

1. 佐野泰照, 尾本雅俊, 石口絵梨, 西原秀昭, 竹下幸男, 前田敏彦, 古賀道明, 神田隆 皮膚筋炎の治療における副腎皮質ステロイドの筋微小血管内皮細胞への影響第 28 回日本神経免疫学会学術集会・長崎市(長崎ブリックホール), 2016 年 9 月 29, 30 日
2. Sano Y, Omoto M, Maeda T, Nishihara H, Takeshita Y, Kanda T  
The effects of glucocorticoid to endomysial microvessels in the treatment for dermatomyositis.  
第 57 回日本神経学会学術大会・神戸市(神戸国際会議場), 2016 年 5 月 18 日-21 日
3. Sano Y, Omoto M, Kanda T  
Establishment of a new human muscle microvascular endothelial cell line.  
American Academy of Neurology (AAN) 68th Annual Meeting, Vancouver Canada, Apr15-21, 2016
4. 佐野 泰照, 前田 敏彦, 安部 真彰, 川井 元晴, 神田 隆 ヒト血液脳関門を介したアミロイドβ 蛋白排出における ABC 輸送体の役割 第 34 回日本認知症学会学術集会 青森市(リンクステーションホール青森他) 2015.10.2
5. 佐野 泰照, 尾本 雅俊, 佐野 宏徳, 前田 敏彦, 安部 真彰, 西原 秀昭, 神田 隆  
ヒト筋微小血管内皮細胞の細胞生物学的特徴 第 27 回日本神経免疫学会学術集会 岐阜市(長良川国際会議場) 2015.9.15.
6. Yasuteru Sano, Hironori Sano, Toshihiko Maeda, Masaaki Abe, Masatoshi Omoto, and Takashi Kanda. Establishment of a new human muscle microvascular endothelial cell line 第 56 回日本神経学会学術大会 新潟市(朱鷺メッセ他) 2015. 5. 22.
7. Yasuteru Sano, Mariko Oishi, Hiroyo Haruki, Fumitaka Shimizu, Masaaki Abe, and Takashi Kanda Analysis of factors regulating the expression of AQP4 in human astrocyte 12th International Congress of NeuroImmunology, Mainz, Germany, Nov 9-13, 2014.
8. Yasuteru Sano, Kazuyuki Saito, Masaaki Abe, Hideaki Nishihara, and Takashi Kanda  
Role ATP-binding cassette transporters in efflux of amyloid-β at the human blood-brain barrier 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience2014, 横浜市(パシフィコ横浜), 2014 年 9 月 11-13 日
9. 佐野泰照, 清水文崇, 前田敏彦, 安部真彰, 大石真莉子, 佐野宏徳, 西原秀

昭, 神田 隆 血液脳関門の Aβ 蛋白輸送担体を制御する因子の検索 第 55 回日本神経学会学術大会・福岡市(福岡国際会議場), 2014 年 5 月 21 日-24 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 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
- (4) 研究協力者  
なし