

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860177

研究課題名(和文)「血液細胞と血液脳関門構成細胞」のクロストークを標的とした脳微小出血病態の解明

研究課題名(英文) Effects of blood inflammatory marker and anticoagulant drugs on the blood-brain barrier

研究代表者

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：60399186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳微小出血が血液脳関門(BBB)のバリア機能の脆弱化および脳血管内皮細胞上の血球接着分子と血液細胞の接着によって惹き起こされると捉え、これらに影響を与える炎症性メディエーターや抗凝固薬の抽出を試みた。(1)臨床的に脳微小出血との関連が報告されているCRPおよびIL-18はBBBのバリア機能を破綻させず、血球接着分子発現に影響をおよぼさなかった。(2)炎症性サイトカインIL-1, TNF- $\alpha$ や新規経口抗凝固薬dabigatranはBBB機能を障害することから脳微小出血のリスクファクターとなり得るかもしれない。(3)血液細胞と脳血管内皮細胞の接着がBBB機能障害を増悪しうる。

研究成果の概要(英文)：Cerebral microbleeds (CMBs) occurs at the capillaries where the blood-brain barrier (BBB) exists. Dysfunction of the BBB allows extravasation of red blood cells. Therefore, the BBB disruption would be a starting point of CMBs. The aim of this study is to elucidate the effects of anticoagulant drugs and blood inflammatory markers associated with CMBs on the BBB. Major findings of this study are follows; (1) C-reactive protein and interleukin (IL)-18, which are elevated in the patients with CMBs, did not disrupt the BBB, (2) Inflammatory cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  impaired brain endothelial barrier through ERK1/2 activation and increased expression of ICAM-1, VCAM-1 and CD36 in brain endothelial cells, (3) an novel oral anticoagulant drug dabigatran induced the BBB hyperpermeability without affecting tight junction protein expression, but apixaban and rivaroxaban enhanced the BBB function, (4) macrophage-brain endothelial cell adhesion might decrease occludin expression.

研究分野：薬理学

キーワード：血液脳関門 CRP IL-18 IL-1 TNF- $\alpha$  血液細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳微小出血は頭部 MRI 検査によって、脳深部など脳毛細血管が走行する領域で偶発的に発見される脳毛細血管特有の病変である。内径の大きい脳動脈血管で認められるような脳動脈瘤や脳動脈硬化を主因とする脳出血とは異なり、脳微小出血自体は無症候であるために見過ごされることが多い。しかし、脳微小出血が様々な脳疾患（脳卒中、認知症など）へと進展する危険因子であることを示す疫学的報告が集積されつつあり（Neurology, 2012）、その予防法を構築するためには、発症機序の解明が喫緊の課題となっている。

脳毛細血管は脳の血管群のなかで、「血液脳関門（Blood-brain barrier; BBB）」とよばれる循環血液中物質の脳実質への移行を選択的に制御する障壁機能が存在する唯一の血管群である。解剖学的には、脳毛細血管では脳細動脈で認められる平滑筋細胞が脳血管周皮細胞（ペリサイト）に置き換わり、ペリサイトが脳毛細血管内皮細胞と基底膜を共有して BBB を構成する。この BBB の破綻が赤血球の脳実質内への浸潤、すなわち微小出血を許容する。そのため脳微小出血の発症には高血圧、血管壁にアミロイド  $\beta$  が沈着するアミロイドアンギオパシー、ラクナ梗塞に付随した BBB の破綻が関与するとされてきた。しかし、これら既往とは無関係に脳微小出血は加齢とともに増加することから（Stroke, 2010）、上記所見とは独立した特異的な発症機序を考える必要がある。

では、何が、脳毛細血管からの「出血」すなわち「BBB 破綻」の成因となるのか？未だ機序は不明であるが脳微小出血の病理像として、以下の知見が明らかとなっている。

(1) 出血に先行して、脳血管内皮細胞表面への赤血球の集積が認められる（J Cereb Blood Flow Metab., 2012）。正常時では脳血管内皮細胞上には赤血球は接着しないため、赤血球が何らかの原因によって、脳血管内皮細胞

表面に接着・集積したと考えられる。

(2) 微小出血病変にヘモグロビン分解産物であるヘモジデリンを貪食したマクロファージおよび鉄を細胞内に取り込んだペリサイトが認められる（Stroke, 2011）。この事象は、マクロファージやペリサイトが二次防御機構として脳実質内へ滲出してきた赤血球を貪食したことにより起こるとされるが、常態下では遊走能および貪食能を持たないペリサイトの異常化を示していると考えられる。この異常化したペリサイトの役割は不明である。従って、脳毛細血管の BBB としての機能的特異性とあわせて考えれば、脳微小出血は赤血球の脳毛細血管上への接着・集積を契機とした BBB の異常により、脳毛細血管透過性が亢進し、赤血球の血管外滲出を許容する BBB 病態であると捉えることができる。

脳ペリサイトは BBB の障壁能を強化する一方で、病態下ではこの機能障害を増悪させるという相反的な機能をもつ。これらの実験成績から、BBB の破綻はペリサイトの病変が主因となると言える。また、ペリサイトは直接血液細胞と接することはないが、血液細胞の接着分子 ICAM, VCAM を発現することは興味深い（予備データ）。以上の知見を総合し、脳微小出血の発症は、(1) 脳ペリサイトが赤血球の内皮細胞上への接着・集積を促進し、(2) 赤血球と脳血管内皮細胞の接着によって BBB 機能が低下し、(3) 浸潤した赤血球・マクロファージと脳ペリサイトとの相互作用により、BBB の破綻が増悪されるという多段階連続的な結果であると考えられる。

## 2. 研究の目的

脳微小出血保有例で炎症バイオマーカーである高感度 C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) の血中濃度が高いことが知られており (Miwa et al.,

2011)、脳血管の炎症が脳微小出血発症に関係していると考えられる。また、抗凝固薬であるワーファリン服用中の脳内出血患者では脳微小出血が多く(Lovelock et al., 2010)、ワーファリン同様脳出血の副作用がある新規経口抗凝固薬は脳微小出血を増加させる可能性が考えられる。

そこで本研究では、BBBのバリア機能脆弱化および脳血管内皮細胞上の血球接着分子との結合が赤血球の血管外流出の契機となると考え、以下の項目を明らかにすることを目的とする。

(1) 出血リスク増大因子と考えられる新規抗凝固薬および炎症性メディエーターであるCRP、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ が脳血管内皮細胞透過性、Tight junctionタンパクおよび血球接着分子発現量へ与える影響

(2) 上記の出血リスク増大因子の脳血管内皮細胞に対する作用に脳ペリサイトがおよぼす影響

(3) マクロファージの脳血管内皮細胞上への接着が惹き起こす血液脳関門破綻機序

初めに脳血管内皮細胞を用いて検討を行った後に、脳ペリサイトが脳微小出血へと至る過程を修飾し、脳微小出血発症に関与する可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

(1) In vitro 血液脳関門モデル作製：ラット大脳皮質から単離・培養した脳血管内皮細胞を培養インサート(Costar Transwell®)を用いて培養し、in vitro 血液脳関門モデルを作製した。

(2) タイトジャンクションタンパクおよび接着分子発現量解析：出血リスク増大因子と考えられる新規抗凝固薬および炎症性メディエーターであるCRP、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を脳血管内皮細胞に負荷し、一定時間後に脳血管内皮細胞を回収し、タンパク質を抽出す

る。脳血管内皮細胞上の接着分子であるRAGE、CD36、ICAM-1、VCAM-1の発現量の変動をwestern blot法にて比較した。

(3) BBBバリア機能解析：出血リスク増大因子と考えられる新規抗凝固薬および炎症性メディエーターであるCRP、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を上記in vitro BBBモデルの血液側に負荷し、一定時間後に経内皮電気抵抗値(TEER)を測定し、sodium fluorescein (Na-F)を負荷して脳実質側へ移行したNa-Fを経時的に回収した。脳実質側へ移行したNa-F量から透過係数を算出し、バリア機能の指標とした。

### 4. 研究成果

(1) CRP、IL-18による脳血管内皮細胞透過性の変化

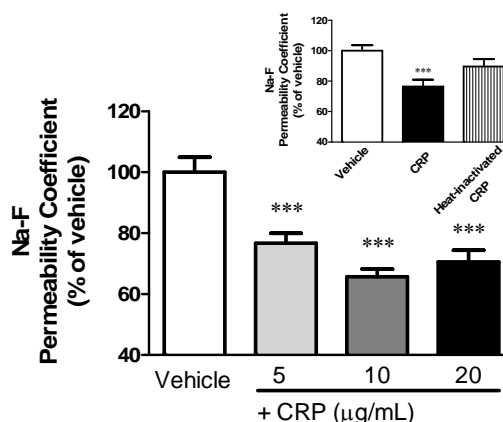


図1 CRPの脳血管内皮細胞透過性に対する作用

CRP (5, 10, 20  $\mu\text{g/mL}$ ), IL-18 (10, 50, 100  $\text{ng/mL}$ )は濃度依存的に脳血管内皮細胞透過性を減少させた(図1)。また、CRPを65、30 minインキュベートし熱処理により失活させると、CRPによる脳血管内皮細胞透過性の減少作用は消失した。このときのタイトジャンクションタンパク(claudin-5、occludin、ZO-1)の発現量を調べたところ、CRPおよびIL-18ともにclaudin-5、occludin、ZO-1の

mRNA 量およびタンパク発現量に影響を与えないことがわかった。また、細胞内 cAMP 量の変化も認められなかった。

CRP による脳血管内皮細胞透過性の減少作用は脳ペリサイトとの共培養系でも認められたことから、脳血管内皮細胞 - 脳ペリサイト間の相互作用の寄与は小さいと考えられた。

#### (2) CRP, IL-18 処理による接着分子発現量の変化

CRP (5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), IL-18 (10, 50, 100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) を 24 時間負荷した際の接着分子 ICAM-1, VCAM-1, CD36, RAGE 発現量の変化を調べると、CRP, IL-18 いずれもこれらの接着分子の発現量を大きく変化させなかった。

#### (3) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ による脳血管内皮細胞透過性の変化

IL-1 $\beta$ (10  $\text{ng}/\text{mL}$ )および TNF- $\alpha$ (10  $\text{ng}/\text{mL}$ )は脳血管内皮細胞透過性を亢進させた。このとき脳血管内皮細胞の claudin-5 および occludin の発現量が減少していた。この脳血管内皮細胞透過性の亢進 ERK1/2 阻害剤である U0126 存在下で抑制された。これらの結果から、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  は ERK1/2 を介して claudin-5 および occludin の発現量を減少させることで脳血管内皮細胞のバリア機能を障害することが示唆された。

#### (4) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 処理による接着分子発現量の変化

脳血管内皮細胞に IL-1 $\beta$ (1, 5, 10, 20  $\text{ng}/\text{mL}$ ) および TNF- $\alpha$ (1, 5, 10, 20  $\text{ng}/\text{mL}$ )を 24 時間処理した際の接着分子(ICAM-1、VCAM-1、CD36、RAGE)の発現量の変化を検討したところ、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  処理により脳血管内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1、CD36 の発現量は濃度依存的に増加した。一方で、RAGE の発現量は変化しなかった。

#### (5) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ による接着分子発現量増加に対するシグナル伝達阻害剤の作用

IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  によって増加した VCAM-1, ICAM-1 および CD36 の発現量は NF- $\kappa\text{B}$  阻害剤の併用により減少した。また、p38 阻害剤は IL-1 $\beta$  による CD36 発現量増加と TNF- $\alpha$  による VCAM-1, CD36 の発現量増加を抑制する傾向が見られた。従って、これらの発現には NF- $\kappa\text{B}$  および p38 MAPK が関与することが分かった。

#### (6) 経口抗凝固薬による脳血管内皮細胞透過性の変化

Apixaban (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ), Rivaroxaban (50  $\mu\text{M}$ ), Dabigatran(10,20,50  $\mu\text{M}$ )を負荷して 24 時間後の脳血管内皮細胞透過性の変化を図 2 に示した。

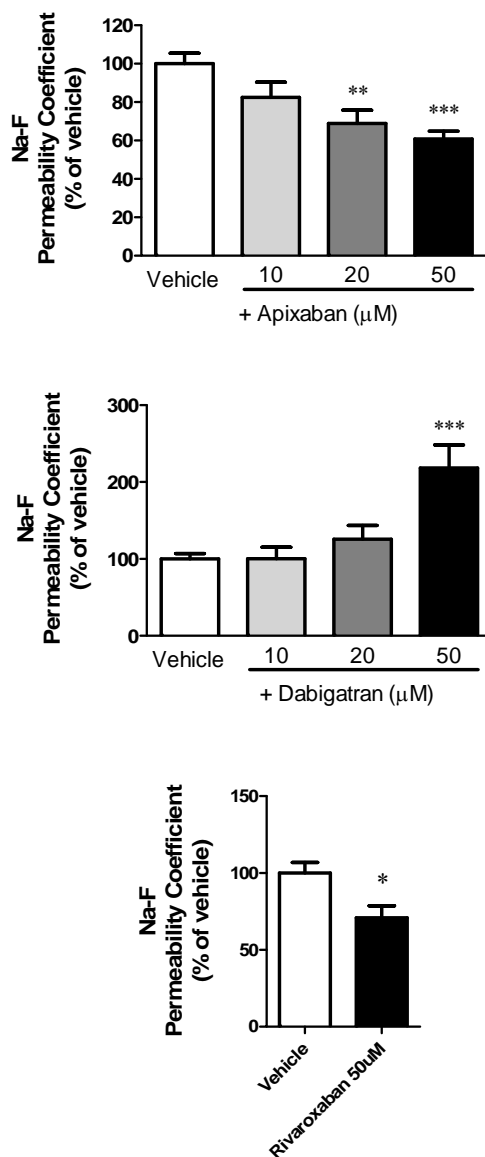


図 2 Apixaban, Dabigatran, Rivaroxaban の脳

## 血管内皮細胞透過性に対する作用

Apixaban および Rivaroxaban は脳血管内皮細胞透過性を低下させたが、Dabigatran は濃度依存的に脳血管内皮細胞透過性を亢進させることがわかった。いずれの薬物もこのときの claudin-5、occludin、ZO-1 の発現量には影響をおよぼさなかった。

### (7) マクロファージと脳血管内皮細胞の接着によるタイトジャンクションへの影響

IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  (それぞれ 1 ng/mL) とマクロファージ細胞株(J774A.1 細胞)を脳血管内皮細胞に 24 時間処理し、J774A.1 細胞存在下でのタイトジャンクションタンパク発現量の変動を調べた。IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  によって J774A.1 細胞の脳血管内皮細胞への接着は増加し、このときの脳血管内皮細胞のタイトジャンクションタンパク occludin の発現量が J774A.1 細胞非存在下と比較して、減少している傾向が認められた。

以上の成果から、本研究では以下の知見が得られた。

(1) 臨床的に脳微小出血との関連が報告されている CRP および IL-18 は BBB のバリア機能および血球接着分子発現に影響をおよぼさないことがわかった。従って、これらは直接的に BBB を破綻させて脳微小出血を惹き起こすわけではなく、BBB 機能を亢進する作用を有することから代償的な血中濃度の上昇である可能性、および、今回指標とした血球接着分子発現増加および BBB 機能障害とは独立した機構で脳微小出血を惹き起こす可能性が考えられる。

(2) 炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  や新規経口抗凝固薬 dabigatran は BBB 機能を傷害することから脳微小出血のリスクファクターとなり得るかもしれない。

(3) 血液細胞と脳血管内皮細胞の接着が

BBB 機能障害を増悪しうる。

## 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 2 件)

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  
査読なし

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. 査読有

[学会発表](計 3 件)

木村郁哉, 道具伸也, 高田芙友子, 松本純一, 川原庸平, 山内淳史, 片岡泰文  
 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体による BBB 機能の亢進

第 136 回日本薬学会年会

2016 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜

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 $\delta/\theta$  シグナルはトロンビン誘発性 MMP-9 産生及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 3 月 9-11 日, パシフィコ横浜

古瀬由奈, 道具伸也, 高田芙友子, 松本純一, 木村郁哉, 吉田 愛, 有留尚孝, 岩尾悠可, 納富 夕, 山内淳史, 片岡泰文

IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  による血液脳関門機能障害における細胞内情報伝達機構

第 68 回日本薬理学会西南部会 2015 11

月 21 日, 下関

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

道具 伸也 (DOHGU, Shinya)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 60399186