

令和元年5月24日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08566

研究課題名(和文) 脳ペリサイトを基軸とした シヌクレインによる血液脳関門 - 脳神経の連動的障害発現

研究課題名(英文) Involvement of brain pericytes in alpha-synuclein-induced dysfunction of the blood-brain barrier and dopaminergic neurons

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は、シヌクレイン凝集とドパミン神経の変性・脱落を病理学的特徴とする神経変性疾患である。さらにPD患者では線条体の血液脳関門(BBB)の破綻が認められる。BBB構成細胞であるペリサイトの欠損・機能異常がBBBの機能低下および神経変性を惹き起こすことから、本研究ではシヌクレインによるBBBおよびドパミン神経障害におけるペリサイトの関与を調べた。シヌクレインはペリサイトからの炎症性メディエーター産生を促進し、BBB機能を低下させた。また、ペリサイトは液性因子を介してドパミン神経機能を亢進させた。シヌクレインはこのペリサイトによる機能亢進作用を阻害する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液脳関門機能低下と認知機能障害が相関することが明らかにされており、シヌクレインによって誘発される血液脳関門機能破綻が認知機能障害誘発に繋がるかもしれない。さらに、シヌクレイン単量体はペリサイトのドパミン神経機能亢進作用の抑制因子でもある。一方で、脳ペリサイトはシヌクレインを細胞内へ取り込み、分解することで、脳内での過剰なシヌクレイン蓄積を抑制しているかもしれない。従って、脳ペリサイトの機能低下はシヌクレイン病態の加速因子となり得る。今後in vivoでの検討が必要であるが、ペリサイトがシヌクレイン病態を解明する鍵になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is characterized by widespread distribution of aggregated α -synuclein (α -Syn) protein in inclusions known as Lewy bodies and loss of dopaminergic neurons in substantia nigra. α -Syn is secreted from neurons and transferred to neighboring cells. This cell-to-cell transmission of α -Syn is thought to underlie the progress of PD. In addition, disruption of the BBB occurred in the patients with PD. Here, we investigated whether brain pericytes is involved in loss of dopaminergic neurons and BBB disruption in PD. Brain pericytes inhibited dopaminergic neuronal cell death by decreasing expression of the cleaved caspase-3. Pericytes up-regulate the activity of dopaminergic neurons in healthy condition. Brain pericytes are sensitive to monomeric α -Syn in terms of the release of various inflammatory cytokines/chemokines and MMP-9 leading to BBB dysfunction. α -Syn-reactive pericytes could contribute to dysfunction of dopaminergic neurons and BBB in patient with PD.

研究分野：薬物動態学

キーワード：脳ペリサイト シヌクレイン 血液脳関門 炎症性サイトカイン ドパミン神経 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペリサイトは脳血管の周囲に存在する細胞群として発見されたが、その機能については近年まで不明であった。脳では特に平滑筋が被覆しない毛細血管に多く存在しており、その血管内皮細胞との数的比率は3:1~1:1程度と末梢血管に比べ非常に多い。ペリサイトは基底膜を隔てて脳血管内皮細胞を被覆し、アストロサイトの足突起とも接着している。ペリサイトの局在から、その主な役割として、毛細血管の収縮・弛緩による脳微小循環の血流調節および基底膜形成による血管安定化が挙げられる。さらにペリサイトは脳血管特異的な物質透過制御機構である血液脳関門を構成し、transforming growth factor- など様々な液性因子を介して、その機能の維持・強化に関わる。また、貪食、抗原提示、サイトカイン・ケモカイン産生など免疫担当細胞様作用や間葉系幹細胞や神経幹細胞としての特性も明らかにされつつある。遺伝子改変によって年齢依存的に脳微小血管周囲のペリサイトを欠損するマウスが作成され、生体におけるペリサイトの機能解明が飛躍的に進展した。このマウスは加齢に伴い血液脳関門障壁能が低下し、免疫担当細胞の脳浸潤やミクログリア活性化が起こり、学習・記憶障害などアルツハイマー病類似の症状や病理像を呈する。これらの機能欠失実験から得られた結果は、ペリサイトが血液脳関門だけでなく脳神経活動にも寄与しており、ペリサイトの欠失および機能異常が神経変性疾患の発症・進展に深く関与することを示唆する。

パーキンソン病は黒質・線条体のドパミン神経の変性・脱落および脳の広範囲に認められるLewy小体を病理的特徴とする神経変性疾患である。Lewy小体の主要構成成分は蓄積したシヌクレインのリン酸化および凝集体であり、これが神経機能障害および細胞死を誘発し、パーキンソン病の発症・病態進展に相関する。Lewy小体の出現に加え、パーキンソン病患者脳における顕在化した病理像として、脳内炎症と血液脳関門の破綻がある。パーキンソン病の進展において炎症の関与が示唆されており、実際、パーキンソン病患者の死後脳において神経細胞、オリゴデンドロサイトおよびアストロサイトのシヌクレイン凝集体の集積、さらには脳内炎症反応に重要なミクログリアの形態学的変化なども認められている。ミクログリアやアストロサイトは細胞外のシヌクレイン凝集体に反応し、炎症性サイトカインを産生する。これらの知見はシヌクレインが神経毒性だけでなく、脳内炎症を惹き起こすことを示している。さらに、パーキンソン病患者の線条体では血液脳関門の破綻が認められ、血漿タンパク質であるフィブリノーゲンの血管外漏出が認められる。Kuanらはシヌクレイン凝集体がヒト脳血管内皮細胞と神経細胞の共培養系において脳血管内皮細胞透過性を亢進させることを明らかにしており、パーキンソン病患者で認められる血液脳関門の破綻にシヌクレインが関与することが考えられる。

現在、パーキンソン病におけるペリサイトの役割は不明であるが、近年、脳神経細胞 - ペリサイト間で tunneling nanotube を介したシヌクレインの細胞間搬送が明らかとなった。神経細胞間および神経細胞 - グリア細胞間でのシヌクレインの伝播に加え、ペリサイトを介した経路もシヌクレイン病変拡大に関与するかもしれない。さらに末梢血中のシヌクレインは血液脳関門を透過することから、ペリサイトも脳内においてシヌクレインに曝露されると推察される。我々はペリサイトが腫瘍壊死因子(TNF-)やthrombinに高感受性であり、様々な炎症性サイトカイン産生を介して血液脳関門の機能低下を惹き起こすことを明らかにしている。アミロイドのような異常タンパク質もペリサイトの炎症性反応を惹起することが報告されている。

2. 研究の目的

以上の知見から、本研究では α シヌクレインによる血液脳関門およびドパミン神経細胞の機能低下におけるペリサイトの役割を明らかにすることを企てた。具体的には以下の項目を明らかにする。

- (1) シヌクレインによる血液脳関門機能低下機序
- (2) 血液脳関門構成細胞のシヌクレイン取り込み機序
- (3) 脳ペリサイトがシヌクレインに反応して産生する液性因子の同定
- (4) 脳ペリサイト由来因子によるドパミン神経保護および機能調節

3. 研究の方法

(1) シヌクレインの血液脳関門機能に対する作用：3週齢Wistarラットの脳皮質から単離培養した脳血管内皮細胞とペリサイトをTranswell®インサート(Costar社)を用いて、脳血管内皮細胞単独培養系および脳血管内皮細胞 - ペリサイト共培養系の2種類のin vitro血液脳関門モデルを作製した。このモデルでは培養インサートの内側が血管管腔側、外側が脳実質側となる。両細胞は接触していないものの、それぞれが産生する液性因子を介した情報を受容することができる。ヒト α シヌクレイン(AnaSpec社、10, 20, 50 μ g/ml)を上記in vitro BBBモデルの血管管腔側または脳実質側に負荷し、一定時間後に、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。

(2) α シヌクレインの細胞内取り込み：35 mm培養dishにWistarラットから単離培養した初代培養脳血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトを播種し、シヌクレインを負荷した。一定時間後に、acid wash bufferでwash後、全タンパク質を抽出し、western blot法にて細胞内

に取り込まれた シヌクレイン量を測定した。

(3) α シヌクレインが産生を誘導するサイトカインの測定：脳ペリサイトが α シヌクレインに反応して培養上清中に遊離するサイトカインを、Milliplex®キット(Millipore 社)および ELISA キットを用いて測定した。測定した生理活性物質は血液脳関門機能を低下させることが知られる interleukin (IL)-1β、IL-6、monocyte chemotactic protein (MCP)-1、matrix metalloproteinase (MMP)-9 および TNF-α である。

(4) ドパミン神経マーカータンパク質の発現量解析：ドパミン神経細胞モデルとしてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。上記(1)と同様に Transwell®インサート(Costar 社)を用いて、脳ペリサイトと SH-SY5Y を共培養した。24 時間共培養後の SH-SY5Y の全タンパク質を抽出し、western blot 法にてドパミン神経細胞のマーカータンパク質である tyrosine hydroxylase (TH)、Dopamine transporter (DAT)、vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) の発現量の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) シヌクレインによる血液脳関門機能低下

ヒト α シヌクレイン(AnaSpec 社、10, 20, 50 μg/ml)を脳実質側に負荷したところ、脳血管内皮細胞 - 脳ペリサイト共培養系でのみ、有意な Na-F 透過の亢進が認められた(図 1A)。一方、血管側に同濃度の α シヌクレインを負荷した場合、この Na-F 透過性亢進は認められなかった(図 1B)。これらの結果は、脳ペリサイトが α シヌクレインの標的であり、刺激放出された脳ペリサイト由来液性因子が α シヌクレインによる血液脳関門機能低下の起因となることを示唆する。さらに、α シヌクレインは単量体よりも多量体および凝集体の方が細胞毒性および炎症反応誘発作用が強力であるため、24 時間後の培養液中の α シヌクレインを Native PAGE によって確認したところ、単量体のバンドのみ検出された(図 1C)。従って、この血液脳関門機能障害作用は α シヌクレイン単量体によるものと考えられる。

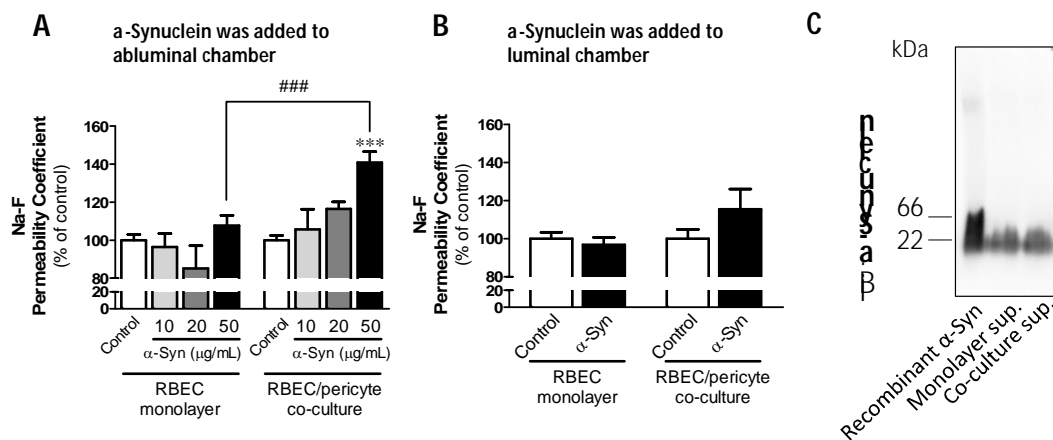


図 1 シヌクレインによる血液脳関門機能低下

(2) シヌクレインによる炎症性メディエーター産生

表 1 に示すように、脳ペリサイトは α シヌクレイン単量体(50 μg/ml)に反応し、脳血管内皮細胞よりも多量にこれら炎症性メディエーターを産生した。従って、脳ペリサイトは α シヌクレイン単量体に反応し、これらの炎症性メディエーターを産生することで α シヌクレインによる血液脳関門の機能低下を誘発すると考えられる。

表 1 脳血管内皮細胞およびペリサイトの シヌクレイン誘発性炎症性メディエーター産生

	脳血管内皮細胞		ペリサイト	
	未処置	α シヌクレイン	未処置	α シヌクレイン
IL-1β (pg/ml)	ND	0.0 ± 0.0	ND	694.5 ± 278.6
IL-6 (pg/ml)	632.8 ± 429.3	2515 ± 1117	644.7 ± 369.6	202055 ± 57674
MCP-1 (pg/ml)	3564 ± 1047	9546 ± 706	5086 ± 1214	36764 ± 5520
MMP-9 (ng/ml)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	9.3 ± 2.3
TNF-α (pg/ml)	ND	ND	9.5 ± 5.3	1406 ± 279

脳血管内皮細胞およびペリサイトにそれぞれ α シヌクレイン(50 μg/ml)を 24 時間負荷した後の培養上清中の濃度を測定した。結果は平均値 ± 標準誤差 (n=4) で示した。ND: 検出限界以下

(3) シヌクレインの細胞内取り込み

脳血管内皮細胞、脳ペリサイトおよびアストロサイトにおける α シヌクレインの細胞内取り込み量は濃度依存的に増加した。これらの細胞内取り込みは sertraline で阻害されなかったことから、クラスリン介在性エンドサイトーシスとは別の機構であることが示唆される。また、免疫抑制薬 cyclosporin A によって、脳ペリサイトへの細胞内取り込みが阻害されたことから、P-gp もしくはカルシニューリンが関与する可能性がある。また、脳ペリサイトでの 24 時間後の細胞内取り込み量は、lysosome 阻害剤である bafilomycin A1 存在下で増加していた。このとき、オートファジー関連タンパクである LC3 および p62 も増加していたことから、脳ペリサイトでの α シヌクレイン分解にはオートファジーが関与することが示唆された。この作用は脳血管内皮細胞およびアストロサイトでは認められなかった。

(4) 脳ペリサイト由来因子によるドパミン神経細胞マーカータンパク質の発現量変化

脳ペリサイトが脳血管のみならず脳神経活動にも影響しうることから、脳ペリサイトがドパミン神経細胞マーカータンパクである TH、DAT および VMAT2 発現量を増加させるか検討した。ドパミン神経細胞モデルとしてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、脳ペリサイトと SH-SY5Y を共培養すると、SH-SY5Y の TH および VMAT2 発現量の増加が認められた。脳ペリサイトがドパミン神経のドパミン産生および遊離を亢進することが示唆された。従って、この脳ペリサイトのドパミン神経機能亢進作用が α シヌクレインによって障害され、ドパミン神経活動が低下する可能性がある。現在この機序について詳細を検討中であるが、 α シヌクレインが脳ペリサイトの神経成長因子発現量を減少させる可能性を示す予備成績を得ている。これに加えて α シヌクレインに反応したペリサイトが産生する炎症性メディエーターの TH 発現に対する影響についても検討中である。

(5) 脳ペリサイト由来因子によるドパミン神経細胞保護

ドパミン神経細胞モデルとして SH-SY5Y を用いた。脳ペリサイト存在下では神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA)による SH-SY5Y 細胞傷害が抑制された。この作用は脳ペリサイト培養上清においても認められ、脳ペリサイトが恒常的に神経細胞保護因子を放出していることが示唆された。また、脳ペリサイトは抗酸化ストレス応答経路である Nrf2/Keap1/HO-1 非依存的に、6-OHDA によるアポトーシス実行因子 caspase-3 の活性化を抑制することがわかった。また、7 週齢 ICR 雄性マウスの線条体に 6-OHDA を投与し、パーキンソン病モデルマウスを作製した。この動物に脳ペリサイト由来エクソソームを 6-OHDA 投与と同時に投与した。アポモルフィン誘発性回転運動を評価したところ、投与 2 週間後において、エクソソーム投与群で統計的に有意ではないものの運動障害改善効果が認められた。脳ペリサイト由来エクソソームがパーキンソン病の治療薬となる可能性が示唆され、今後至適投与量・タイミングなどを詳細に検討していく必要がある。

以上の結果から、本研究では以下の知見が得られた。

- (1) シヌクレイン単量体は脳ペリサイトに作用し、様々な炎症性メディエーター産生・放出を介して血液脳関門機能を低下させる。
- (2) 脳ペリサイトには α シヌクレイン特異的な分解機構がある。
- (3) 脳ペリサイトはドパミン神経細胞を保護し、その機能を調節している。 α シヌクレイン単量体はこの作用の抑制因子となり得る。

軽度認知機能障害を呈する高齢者の海馬領域における血液脳関門機能は、同年代の健常高齢者よりもさらに低下していることが MRI 造影像から明らかにされており、シヌクレインによって誘発される血液脳関門機能破綻が認知機能障害誘発に繋がるかもしれない。さらに、シヌクレイン単量体はペリサイトのドパミン神経機能亢進作用の抑制因子でもある。一方で、脳ペリサイトはシヌクレインを細胞内へ取り込み、分解することで、脳内での過剰なシヌクレイン蓄積を抑制しているかもしれない。従って、脳ペリサイトの機能低下はシヌクレイン病態の加速因子となり得る。今後 in vivo での検討が必要であるが、ペリサイトがシヌクレイン病態を解明する鍵になる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka
Monomeric α -synuclein induces blood-brain barrier dysfunction through activated brain pericytes releasing inflammatory mediators in vitro. *Microvasc Res* 124, 61-66 (2019)
2. ペリサイトを基軸とした α シヌクレインによる血液脳関門および神経細胞の連動的障害
道具伸也
Medical Science Digest, 45(3), 28-12 (2019)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Role of Brain Pericytes in Parkinson's disease
Shinya Dohgu
1st Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research March, 2019, Nagasaki
2. 脳ペリサイトにおける α シヌクレインの取り込みおよび分解機構
道具伸也、矢野瑞紀、横谷みき、高田英友子、松本純一、木村郁哉、山内淳史、片岡泰文
第 92 回日本薬理学会年会 2019 年 3 月 大阪
3. 脳ペリサイトによる α - シヌクレインの細胞内取り込み機構
矢野瑞紀、道具伸也、横谷みき、高田英友子、松本純一、木村郁哉、山内淳史、片岡泰文
第 71 回日本薬理学会西南部会 2018 年 11 月 福岡
4. In response to monomeric α -synuclein, brain pericytes release inflammatory cytokines to impair brain endothelial barrier
Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka.
18th World congress of basic and clinical pharmacology July, 2018. Kyoto
5. α -Synuclein-reactive pericytes contribute to the blood-brain barrier dysfunction through the release of inflammatory cytokines in vitro.
Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka.
12th International Conference on Cerebral Vascular Biology 2017 年 11-12 月 メルボルン
6. 脳ペリサイトは 6-OHDA 誘発性ドパミン神経細胞障害を防御する
有留尚孝、道具伸也、牛尾誠幸、藤田侑里、木村郁哉、高田英友子、片岡泰文、山内淳史
第 19 回 七隈アルツハイマー病・パーキンソン病研究会 2017 年 4 月 福岡
7. 脳ペリサイトは 6-OHDA 誘発性ドパミン神経細胞障害を防御する
有留尚孝、道具伸也、牛尾誠幸、藤田侑里、木村郁哉、高田英友子、片岡泰文、山内淳史
第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 長崎
8. 脳ペリサイトによる 6-OHDA 誘発性ドパミン神経細胞傷害の保護機構
有留尚孝、道具伸也、牛尾誠幸、藤田侑里、木村郁哉、片岡泰文、山内淳史
第 69 回日本薬理学会西南部会 2016 年 11 月 松山

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高田 英友子

ローマ字氏名：TAKATA, Fuyuko

所属研究機関名：福岡大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：70412575

研究分担者氏名：山内 淳史

ローマ字氏名：YAMAUCHI, Atsushi

所属研究機関名：福岡大学

部局名：薬学部

職名：教授
研究者番号(8桁): 90341453

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。