

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590158
 研究課題名（和文） 血液-組織関門を形成する細胞群が関わる臓器特異的関門の形成と破綻の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of formation and dissolution of organ specific barrier clustered by the cells composing blood-tissue barrier
 研究代表者
 中島 恵美（NAKASHIMA EMI）
 慶應義塾大学・薬学部・教授
 研究者番号：90115254

研究成果の概要：

脳や胎盤では他臓器に比べ血液と臓器間での物質交換が厳密に制御されており、その物質交換の場は「関門」と呼ばれる。この関門が破綻すると毒性物質の蓄積や組織液の滲出により重篤な場合には臓器不全となる。本研究ではこの関門の形成、維持、破綻の機序を解明することを目的とした。本研究により関門構造の維持に重要な関門の分解を抑制する成分を見出した。また関門を構成する血管部の形成機構を一部明らかにした。これらの成果により、関門が破綻した病態に対する薬物治療法の開発等に応用が期待される。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:薬学・医療系薬学

キーワード:血液-組織関門、周皮細胞、血管内皮前駆細胞、基底膜、組織分化、血管新生、条件的不死化細胞株

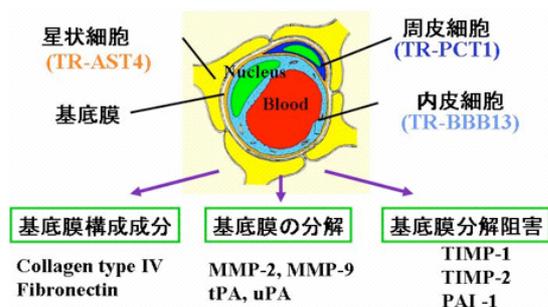
1. 研究開始当初の背景

血液-組織関門の機能と構造の破綻をきたす疾患は多く、薬物や毒性物質の蓄積、組織液の滲出、浮腫、多臓器不全などの病態を引き起こす。病的血管における周皮細胞の欠落や血管内皮細胞の異常増殖が問題となっている。本研究の全体構想は、「血液-組織関門の機能と構造を維持する分子機構を解明し、病態時の個別薬

剤療法に応用する」ことである。そのため、組織特異的に働く機能的な血液-組織関門の解明、血液-組織の構造的関門となる基底膜の維持機構の解明、病態時への薬物動態変動解析と治療への応用研究、を推進している。

体循環と組織を隔てる無窓性連続毛細血管は、血管周皮細胞(Pericyte: PCT)により裏打ちされている。周皮細胞の数は組織によって異なり、関

門構造の脆弱な腫瘍血管における周皮細胞の割合に比べ、血液-脳関門を構成する脳毛細血管では、周皮細胞の割合が高い。さらに血液-脳関門において、周皮細胞は、内皮細胞 (Endothelial cell: EC) と共に基底膜に包まれ、この周りを星状細胞 (Astrocyte: AST) が囲んでいる (Scheme 1)。



Scheme 1 脳血管の構造

周皮細胞の機能解析はウシ脳の初代培養細胞等を用いて行われていたが、優れた単離法が無いため、結果の信頼性や再現性に問題があり、ほとんど停滞していた。また、細胞系で得られた実験結果を動物で確認するための小動物を用いた実験系が切望されていた。我々は、近年樹立された脳血管キャピラリの単離法に着目し、周皮細胞の付着した十分量のキャピラリを単離してから脳血管周皮細胞株 TR-PCT を樹立することに成功した。TR-PCT はマトリックス塊へのカルシウムの沈着や Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) 応答性を有し、いくつかの高血圧の原因候補遺伝子、動脈硬化関連遺伝子を発現していた。また、血圧上昇活性をもつ Angiotensin II (ANG II) 刺激により、細胞遊走が活性化された。更に、ANG II 受容体拮抗薬であるロサルタンによってその作用が抑制された。このことは、脳血管の関門および基底膜維持における司令塔としての周皮細胞の重要性を示唆している。

一方、血液-組織関門を構成する血管が、末梢血中の血管内皮前駆細胞による血管分化と

成熟化により形成される可能性が報告されている。しかし、血管内皮前駆細胞による血管形成への分化を制御する因子は不明である。

以上により(1)「内皮細胞と周辺細胞である周皮細胞、および、星状細胞の基底膜維持における各々の基底膜関連分子の発現活性を比較することにより、臓器特異的な基底膜維持機構が解明でき」、(2)「血管内皮前駆細胞による組織特異的な分化制御因子を同定して、血液-組織関門の臓器特異的な維持機構が解明できる」という作業仮説に達した。

本研究課題では、血液-組織関門の形成と維持機構を担う臓器特異的な分子を同定し、さらに、その制御機構を解明することを目的とする。血管内皮細胞に加えて血管内皮前駆細胞の役割を解明する。

2. 研究の目的

上記の作業仮説(1),(2)と対応して記載する。

(1)血液-組織関門を構造的に維持する実体として基底膜に着目し、基底膜の機能と構造に影響し得る因子の発現とその変動因子による影響は不明な点が多い。血液-脳関門は内皮細胞に加え、周皮細胞、星状細胞から構成されるが、本研究ではそれらの各細胞の基底膜の形成および維持における役割の解明を目的とした。条件的不死化細胞株を用いて、血液-脳関門基底膜の変性と修復に関与する基底膜構成成分、分解因子、分解阻害成分の遺伝子発現について、血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞における発現を比較検討した。また、これらの分子発現について、基底膜変性に関わることが示唆されている内因性因子 (TGF- β) や外因性因子 (ステロイド剤) に対する反応性を血管内皮細胞、周皮細胞、星状細胞間で比較した。刺激物質の添加後、基底膜関連物質の時期特異的な発現解析を行って、血管透過性の変動を導く遺伝子を明らかにするとともに、変動要因を解析した。

(2)血管内皮細胞および収縮型、合成型血管壁細胞は血管を構成する細胞群であり、血液-組織関門の構築および維持に重要な因子である。しかし、それらの細胞群へ成熟する過程には未解明な点が多く、本研究では血管内皮前駆細胞が血管壁細胞へ成熟する分化機構を解明すること目的としている。本研究期間においては条件的不死化ラット骨髄由来血管内皮前駆細胞株(TR-BME)を用いて壁細胞への分化を調節する因子について検討を行った。

TR-BME の血管構築機構では、予備的検討において、basic fibroblast growth factor (bFGF) に応答して、血管内皮細胞や壁細胞へと多分化する能力を持つことが示唆された。このことから、bFGF による、血管内皮前駆細胞の Akt、ERK のリン酸化や、細胞増殖誘導の過程を解析することを目的とした。そのため、bFGF の血管内皮前駆細胞におけるAkt、ERK活性化に対する効果を解析し、臓器での分化制御においてキーとなる分子を検討した。

3. 研究の方法

(1)TR-PCT、TR-BBB、TR-AST のそれぞれの細胞株について次に示す基底膜関連物質の発現を半定量的 RT-PCR を行った。刺激因子である TGF- β 1 存在下で、基底膜関連物質の発現変動を半定量的 RT-PCR で解析した。

基底膜関連物質として以下の因子を解析した。

①基底膜の構成成分：IV 型コラーゲンとフィブロネクチン

②基底膜の分解因子：MMP-2、MMP-9、tissue-type plasminogen activator (t-PA)、urokinase-like PA(u-PA)

③基底膜分解酵素の阻害因子：PAI-1、TIMP-1、TIMP-2

(2) TR-BMEに対する分化制御因子の解析:

TR-BMEの血管壁細胞分化に関与する因子を検討した。

未分化血管内皮前駆細胞マーカーCD133 の発現比較とサイトカインによる未分化マーカー発現抑制: bFGF、あるいは VEGF 添加時における CD133 の発現変化を RT-PCR 法により解析した。

・血管壁細胞マーカーである α -smooth muscle actin、SM22 の発現変化を定量的 RT-PCR により解析した。

・血管構造形成能に対する bFGF の効果: 分化誘導を行った TR-BME を用いて血管内皮前駆細胞特異的現象である血管構造形成能をマトリゲルを用いて解析した。

TR-BME の分化制御シグナルの解析: TR-BME の分化制御のシグナル経路を検討した。

・bFGF による ERK1/2、Akt 活性化、サイトカインによるシグナル分子のリン酸化の解析: 分化制御にかかわるサイトカインによる Akt、ERK リン酸化シグナル伝達を Western blotting 法により解析した。

・リン酸化阻害による分化制御メカニズムの解明: 分化制御に関与するシグナルの阻害剤を用いて分化誘導を行い、SMA、SM22、CD133 の発現変動に対する効果を解析し、分化制御においてキーとなる分子を検討した。

4. 研究成果

(1)我々が樹立した脳毛細血管周皮細胞株 (TR-PCT)、内皮細胞株 (TR-BBB)、星状細胞株 (TR-AST)を用い、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンおよびフィブロネクチン、また基底膜を分解する因子である MMP-2、MMP-9、t-PA、u-PA、さらに基底膜分解阻害成分である PAI-1、TIMP-1、TIMP-2 の発現変動を RT-PCR にて解析した。これらの細胞のうち内皮

細胞はフィブロネクチンおよび MMP-9、t-PA、PAI-1、TIMP-1 など多くの成分の発現量が高く、基底膜の維持に深く関与していると考えられた。星状細胞は主に IV 型コラーゲンは産生に深く関与することが示された。また基底膜異常に関与することが提唱されている TGF- β によるそれら基底膜維持関連因子の発現への影響を検証した。上記因子の中でも PAI-1 の発現が顕著に誘導されており、基底膜肥厚に関与している可能性が考えられた。

(2)TR-BME の血管壁細胞への分化を制御している因子を同定するため成長因子である bFGF、VEGF、EGF または IGF を添加した培養液で培養した TR-BME の壁細胞マーカー SMA 発現量を比較した。bFGF は、ES 細胞や神経幹細胞の自己増殖を誘導することで多分化能を維持することが報告されている。VEGF、EGF、IGF を添加して培養した TR-BME は、SMA の発現上昇が見られたが、bFGF を添加して培養した TR-BME は、SMA 発現上昇がなく、血管壁細胞様に分化しなかった。また、bFGF は、TR-BME の増殖を濃度依存的に増加させ、20 ng/mL の bFGF で培養した TR-BME は、CD133 の発現、matrigel 上での管腔構造への分化能を維持し、SMA、SM22 の発現増加を示さなかった。一方、bFGF を添加していない TR-BME と 25 ng/mL VEGF を添加した TR-BME では、CD133 の発現と管腔構造への分化能が減少し、SMA、SM22 の発現が増加した。

したがって CD133、CD34、Flk-1 陽性骨髄由来血管内皮前駆細胞が、bFGF の刺激により自己増殖を誘導することで血管内皮前駆細胞の機能を維持し、少なくとも VEGF の刺激により血管構造を形成する可能性が示唆された。

血液-脳関門の機能は国内で多くのグループが研究しているが、周皮細胞による基底膜維持

機構に着目しているのは我々のグループのみである。我々は周皮細胞が内皮細胞の Tight Junction 構造を増強する作用を持つばかりか、基底膜成分の高い産生能を有することを明らかにした。これらの成果から、病態時の変動要因として、周皮細胞の役割が大きいことが強く示唆された。また血管内皮前駆細胞の自己増殖能の維持と血管形成への分化にそれぞれ bFGF および VEGF が関与することが示唆された。

これらの成果をもとに、さらなる病態時の細胞動態の変動解析を行って、血液-組織関門に由来する病態や、個体間変動を予測し、薬物治療に応用する。癌細胞の転移浸潤時においては組織基底膜の破壊が起こっており、関門の機能と構造を維持する機構を解明することは治療薬の開発に有効である。また、本成果の発表以後、世界中より共同研究の申し込みが集まっており、本研究の注目度の高さが評価される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

①Kose N, Asashima T, Muta M, Iizasa H, Sai Y, Terasaki T, Nakashima E. Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial, and astrocyte cell lines after transforming growth factor- β 1 treatment. *Drug Metab Pharmacokinet*. 22(4): 255-266 (2007). (査読有)

②Liu Y, Wilkinson FL, Kirton JP, Jeziorska M, Iizasa H, Sai Y, Nakashima E, Heagerty AM, Canfield AE, Alexander MY. Hepatocyte growth factor and c-Met expression in pericytes: implications for atherosclerotic plaque development. *J Pathol*. 212(1): 12-19.(2007). (査読有)

[学会発表](計 1 件)

①牟田真理子、崔 吉道、佐治重衡、有賀智之、
黒井克昌、西村友宏、戸井雅和、中島恵美.
Docetaxel, Paclitaxel の血管内皮前駆細胞への
作用と血管新生阻害効果の検討. 第 21 回がん
分子標的治療研究会総会(2008.6.26、東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 恵美(NAKASHIMA EMI)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号:90115254

(2)研究分担者

巨勢 典子(KOSE NORIKO)

慶應義塾大学・薬学部・研究員

研究者番号:60348612

西村 友宏(NISHIMURA TOMOHIRO)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号:40453518

(3)連携研究者

なし