

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08321

研究課題名(和文) 遺伝的脳卒中モデルラットの血液脳関門は脆弱か—インビトロ再構築技術を用いた検討

研究課題名(英文) Is the Blood-Brain Barrier Weakened in Genetic Stroke Model Rats? A Study Utilizing in vitro Models System

研究代表者

山形 一雄 (YAMAGATA, Kazuo)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10299323

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)：脳卒中ラット(SHRSP)の血液脳関門(BBB)の機能不全の解明のため、WKY、SHRとSHRSPからastrocytes (AS)、pericytes (PR)、endothelial cells (EC)を分離しBBBモデルを作成した。SHRとSHRSPのECではWKYに比べclaudin-5が低下しoccludin、P-糖タンパク質が亢進していた。SHRSPのASはWKYに比べ、バリアー機能の強化作用が弱く、SHRSPのPRはWKYに比べバリアー機能の強化作用が強い可能性が観察され、ビタミンEなどがBBB機能に影響を及ぼした。SHRSPでBBBのバリアー機能が低下する可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：We prepared BBB models by isolating astrocytes, pericytes, and endothelial cells from normotensive control rats WKY, SHR, and SHRSP to determine whether a genetic mutation in SHRSP causes blood-brain barrier (BBB) dysfunction. No large differences among the 3 strains were found in transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) values for the endothelial cells, but in the SHR and SHRSP rats, expression of claudin-5 was lower, and expression of occludin and P-glycoprotein was higher than in the WKY rats. Barrier function reinforcement was weaker, and expression of occludin and claudin was lower in astrocytes of SHRSP rats than in WKY rats. Conversely, we found that barrier function reinforcement tended to be stronger in pericytes of SHRSP rats than in WKY rats. Factors such as vitamin E also affected BBB function. Our findings indicate that in SHRSP, disorder among BBB constituent cells that diminishes barrier function may occur.

研究分野：分子栄養学

キーワード：BBB 内皮細胞 SHRSP タイトジャンクション アストロサイト ペリサイト

## 1. 研究開始当時の背景

日本では脳卒中による死亡は減少しているものの、要介護となる原因の1位を占めている。特に高齢化の急激な進行に伴い、脳卒中後遺症は増えており、脳卒中を予防することの意義は重要である。脳卒中ラットSHRSPは重症高血圧を背景に脳卒中を高率に起こす遺伝的モデルであり、一方SHRは、高血圧は有するが脳血管障害は起こしにくいモデルとして知られている。並河らは、SHRSPとSHR間で得たF2ラットの遺伝解析から、第1、18染色体が「脳卒中感受性遺伝子」を含むことを見いだした。さらに、SHRSPのこの領域(全ゲノムの4%に相当)のみをSHRに移したコンジェニックラットを作成したところ、血圧はSHRと変わらないにもかかわらず脳卒中発症のリスクが10倍になることを見いだした(Hypertension 2013;62:55)。このことは、血圧と独立して脳卒中発症に関与する「感受性遺伝子」の存在を強く示唆している。また、申請者は、脳血液関門(BBB)の低酸素再酸素化に対する脆弱性がその重要な候補であることを指摘し、酸化ストレスがBBB機能破綻に重要な役割を担うことを明らかにするとともに(Neurobiol Dis 2004;17:491、CEPP 1997;24:686)、食品由来成分が脳endothelial cellsを介して直接BBBの機能発現に影響を与えることを示した(Neuroscience 2003;116:649)。

## 2. 研究の目的

申請者は脳卒中のモデルラットであるSHRSPのグリア細胞が低酸素再酸素化で脆弱であることを報告してきた。また、分担

研究者(並河)は遺伝解析により、SHRSPの第1、18染色体上に血圧と独立した「脳卒中感受性遺伝子」があることを見いだした。この成果をふまえて本研究では「SHRSPの持つ『脳卒中感受性遺伝子』はBBB機能不全を引き起こし、それが脳卒中高感受性につながる」との仮説をたて、これを検証するとともに、SHRSPのBBB機能を抗酸化機能性食品で保全できないか検討することを目的とした。すなわち、SHRSPの遺伝子異常がBBB機能不全を起こすとの仮説を立て、まずSHRSPとSHRからBBBを構成するastrocytes, pericytes, endothelial cellsを分離・培養して、in vitroでBBB(ハイブリッドBBB)モデルを作成し、その機能の評価することでSHRSPのBBB機能不全の原因となる細胞を示す。またSHRSPの第1、18染色体上の遺伝子がBBB機能に影響するかを示す。さらに、機能性食品に含まれる抗酸化物質でBBB機能を保護できるかどうか検討することとした。

## 3. 研究方法

### 初代培養

SHR、SHRSP、コンジェニックラット(SHRpch1\_18)の新生児および3週令から脳を摘出しastrocytes、pericytes、endothelial cellsを、それぞれ分離・培養した。すなわち、endothelial cellsは、3~4週齢ラットより前脳を摘出後、酵素・遠心処理し、毛細血管片を分離した。Pericytesは、endothelial cellsと同様の手法でペリサイトが増殖する条件で培養した。Astrocytesは、生後2日齢ラット脳よりshaking methodを用いて分離・培養した。

## In vitro BBBモデル系

それぞれの系統から分離・培養したそれぞれ細胞は、細胞の組み合わせを変えてチャンバー付きの培養プレート (Millipore、#PISP 12R 48) にて培養し、*in vitro* 再構築 BBB を作成し経内皮電気抵抗 (TEER) や NaF を用いて透過性を測定する (図 1 A)。すなわち、図 1 B に示した細胞の組み合わせで、(1) 3種類の細胞のうち1種類のみをSHRSP由来としたハイブリッド BBB とすべてSHR由来細胞よりなるSHR BBB におけるBBB機能の比較、(2) 第1, 18染色体のみがSHRSP由来のコンジェニック BBB を用いた機能評価、(3) SHRSP由来細胞で構成したBBBを用いた抗酸化物質のBBB機能保全効果の評価を実施した。さらに実験は低酸素状態、あるいは低酸素再酸素化などの条件を組み合わせ実施した。

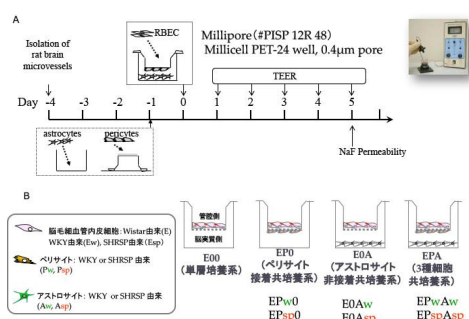


図 1 *In vitro* BBBモデル系と細胞の組み合わせBBBの評価

バリアー機能の評価は、TEERで行い、細胞間隙輸送の評価は低分子トレーサーの Sodium fluorescein (Na-F) を用い評価した。また、併せて透過性および細胞内への取り込み量の評価の為、P-gp基質(R123)を用いたP-機能評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) WKY と SHRSP 由来の脳毛細血管内皮細胞の単層培養の比較

WKYとSHRSPから内皮細胞を採取し単層培養モデルを作製した。TEERはWKY由来内皮細胞で高値を示したが、Day 4まではほぼ同程度であった。NaFの透過性はDay5での測定で、WKY由来内皮細胞で透過性が低い結果であった。バリアー機能の低下がタイトジャンクション (TJ) タンパク質の発現と関連するかをWestern Blotで検討したところ、SHRSP由来内皮細胞ではclaudin-5の発現が低下していることが判明した。しかし、もう一つのTJタンパク質である、occludinの発現はSHRSP由来内皮細胞で高発現していた。これら結果は、WKY由来内皮細胞の方がバリアー機能が高いことを示し、WKYとSHRSP由来内皮細胞では、TJの質が異なることが判明した。

BBBは、強固なバリアー機能以外にも様々なトランスポーターが発現し、BBB機能の特徴づけている。そこで、WKYとSHRSPから内皮細胞を採取し、real-time PCRでいくつかの遺伝子発現を検討した。WKY由来内皮細胞に比べ、SHRSP由来内皮細胞ではグルコーストランスポーター (Glut1) は発現低下、アミノ酸トランスポーター-LAT1は不変、排出系トランスポーターのP-gpは発現上昇していた。その他に線溶系に関係する遺伝子として、tPAとPAI-1の2種類のタンパク質発現を検討したところ、SHRSP由来の内皮細胞は、WKYに比較してどちらの遺伝子発現も有意に減少していた。これら結果は、WKYとSHRSP由来内皮細胞では線溶系に違いが存在する可能性を示す。

(2) WKY と SHRSP 由来の3種細胞共培養モデルの比較

WKYとSHRSPから内皮細胞、pericyte, astrocytesを分離・培養し同じ系統で3種細胞が異なる共培養モデルを作製した。結果は、TEER値はWKY由来細胞による共培養系で高値を示し、endothelial Cellsの単層培養系に比べ、その差は顕著であった(図2)。TEERと同様に、NaF(低分子トレーサー)の透過性は、WKY由来細胞による共培養系で透過性が低い可能性が示唆された。TJタンパク質の発現は単層培養系と同様に、SHRSP由来細胞による共培養系では、claudin-5の発現が低下しoccludinの発現は上昇していた。

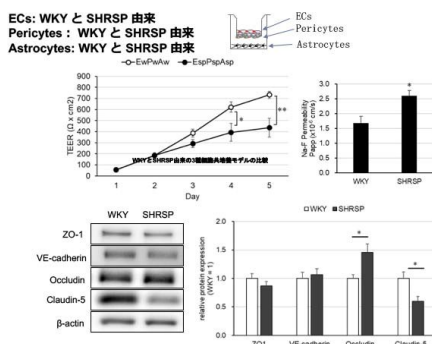


図2 WKY と SHRSP 由来の3種細胞共培養モデルのTEER、NaF 透過性およびTJタンパク質発現の比較

(3) WKY と SHRSP 由来のAstrocytesとWKY由来内皮細胞との共培養系による比較

WKYとSHRSP由来のAstrocytesをWistar由来の内皮細胞と共培養し、BBB機能を比較した。TEERはWKY由来のastrocytesとの共培養により高値を示した。TEERと同様に、低分子トレーサーNaFの透過性は、WKY由来のastrocytesとの共培養で透過性が低い結果

であった。TJタンパク質の発現はSHRSP由来のastrocytesの共培養系では、claudin-5とoccludinの発現は低下していた。

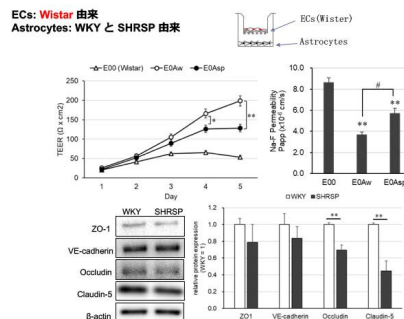


図3 WKY と SHRSP 由来のAstrocytesとWKY由来内皮細胞との共培養系によるTEER、NaF 透過性およびTJタンパク質発現の比較

(4) WKY と SHRSP 由来のpericytesとWKY由来内皮細胞との共培養系による比較

WKYとSHRSP由来のpericytesをWistar由来の内皮細胞と共培養し、BBB機能を比較した。TEERはSHRSP由来のペリサイトとの共培養により高値を示した(Day3,4)。低分子トレーサーNaFの透過性は、内皮細胞の単層培養系に比べると有意に低値を示したが、WKYとSHRSP由来のペリサイト共培養系では変化がなかった。TJタンパク質の発現は大きな変化はなかった。SHRSP由来のペリサイトではPAI-1の発現が上昇した。これまで、PAI-1はBBB機能を上昇させる可能性が示されている(Microvasc Res 2011 81:103-7)。SHRSP由来のペリサイトとの共培養系でTEERが上昇した理由として、PAI-1が関与する可能性が示唆された。

(5) 脳卒中発症刺激によるSHRSP 由来のAstrocytesのTJタンパク質発現

アルギニンバゾプレッシン(AVP)は、脳

卒中性浮腫を誘発する分子であることが報告されている。本研究においてAVP刺激によるSHRSP、SHRpch1\_18、(SHR)由来のアストロサイトのBBB機能を、Astrocytesから分泌されBBBを誘導・調節する分子の遺伝子発現レベルをWKYと比較することで解析した。

AVPの添加によりBBBの形成に関わる複数の遺伝子発現がそれぞれの系統由来

astrocytesで変化した。例えば、コンジェニックラット(SHRpch1\_18)において、AVPで低下するアンジオポエチン2、FGF2、TGF- $\beta$ が抗酸化作用を有する脳卒中に薬物エプセレンやビタミンの添加で逆転して増加した。これら結果は、抗酸化成分が脳卒中状態で変化するBBB形成に関与する分子の発現を調節する可能性を示す。

本研究から、endothelial cellsのTEERやclaudin-5などのBBB機能に働くタンパク質や遺伝子発現変化および系統間での違いが存在することが判明した。これら結果は、遺伝的脳卒中モデルラットSHRSPでBBBの構成に変異を生じバリアー機能が低下する可能性を示す。

#### 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)

##### [掲載論文](計6件)

Yamagata K, Do coffee polyphenols have a preventive action on metabolic syndrome associated endothelial dysfunctions? an assessment of the current evidence. *Antioxidants* 2018 Feb 4;7(2). 査読有

Yamagata K, Takahashi N, Akita N, Nabika T. Arginine vasopressin altered the expression of monocarboxylate transporters in cultured astrocytes

isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic SHRpch1\_18 rats. *J Neuroinflammation* 2017 14:176 doi: 10.1186/s12974-017-0949-8. 査読有

Yamagata K. Docosahexaenoic acid regulates vascular endothelial cell function and prevents cardiovascular disease. *Lipids in Health and Disease*. 2017 16:118 査読有

Yamagata K, Sone N, Suguyama S, Nabika T. Different effects of arginine vasopressin on high-mobility group box 1 expression in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and congenic SHRpch1\_18 rats. *IJEP*, 97(2) 97-106 (2016) 査読有

Yamagata K, Suzuki S, Tagami M. Docosahexaenoic acid prevented tumor necrosis factor alpha-induced endothelial dysfunction and senescence. *PLEFA* (2016) 104 (6) 11-18. 査読有

Fukuda S, Nakagawa S, Tatsumi R, Morofuji Y, Takeshita T, Hayashi K, Tanaka K, Matsuo T, Niwa M. Glucagon-Like Peptide-1 Strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells under basal and hyperglycemia conditions. *J Mol Neurosci*. 2016 59(2)211-219. 査読有

##### [学会発表](計3件)

中川慎介、大原浩貴、有賀純、山形一雄、並河徹：WKY/IzmとSHRSP/Izmの血液脳関門機能比較：In vitro BBBモデルを用いた検討 第53回高血圧関連疾患モデル学会 福岡(九州大学医学部百年講堂)2017年11月24日-25日

中川慎介：血液脳関門の成り立ちとその病態 第122回解剖学会総会 長崎大坂本キャンパス(長崎県・長崎市)2017年3月30日

中川慎介、有賀純：血液脳関門の虚血再流障害におけるスフィンゴシン1-リンの役割 第90回薬理学会年会 長崎

ックホール（長崎県・長崎市）2017年  
3月16日

[図書] (計3件)

Yamagata K. Endothelial protective effects of dietary phytochemicals: focus on polyphenols and carotenoids. (Book title) Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier ISBN: 978-0-444-50588-0. Studies in Natural Products Chemistry 55, Chapter 10 2017 p323-350.

Yamagata K. Cerebral ischemia induces neuronal vulnerability and astrocytic dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Book title; Ischemic stroke - updates. Intech. ISBN 978-953-51-2713-0. Chapter 3 (2016) p43-58

Yamagata K. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats: insights on neuronal vulnerability and astrocytic abnormalities on stroke. Book title; Advances in Medicine and Biology. Volume 96, Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-6348-506-9 (2016) Chapter 8 p115-132.

[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  
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eisei/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山形 一雄 (YAMAGATA, Kazuo)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 10299323

### (2) 研究分担者

並河 徹 (NABIKAWA, Tōru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50180534

中川 慎介 (NAKAGAWA, Shinsuke)

長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・講師

研究者番号: 10404211

### (3) 連携研究者

大原 浩貴 (OOHARA, Hirotaka)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10609225

### (4) 研究協力者 なし