

平成30年6月8日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08424

研究課題名(和文) 血液脳関門機能の膜型メタロプロテアーゼによる制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of blood-brain barrier function by membrane-type metalloproteinases

研究代表者

池田 栄二 (IKEDA, EIJI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30232177

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)：血液脳関門機能などの神経系血管バリアー機能の破綻は、様々な難治性神経系疾患の病態の中核を担っており、その人為的修復は神経系疾患に対する有効な治療法となる。我々は、神経系血管バリアー破綻の責任因子としてADAM12、ADAM17を特定し解析を進めたが、両因子ともに、主として低酸素刺激による血管バリアー破綻に関与すること、従って複数の病的刺激が混在する神経系疾患に対する治療標的としては十分な有用性が示されなかった。しかし同時に、複数の刺激による血管バリアー破綻の共通責任因子としてbasiginを特定し、神経系疾患に対するbasiginの治療標的としての有用性を示し、新規治療法の礎となる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In various intractable neural diseases, the impairment of neural vascular barriers, including blood-brain barrier, occurs and accelerates their disease progression. As the candidates for target molecules to restore the neural vascular barrier, we have specified ADAM12, ADAM17 and basigin, all of which are expressed in endothelial cells. As for ADAM12 and ADAM17, they were shown to be involved predominantly in hypoxia-induced impairment of vascular barrier, and consequently to be unable to restore sufficiently the vascular barrier in neural diseases in which various stimuli, together with hypoxia, cause the vascular barrier disruption. On the other hand, it was demonstrated that basigin is involved in the impairment of vascular barrier as the common downstream molecule of various stimuli including hypoxia and multiple cytokines, and furthermore our study with animals indicated the potential of basigin as the target to establish the new effective treatment of intractable neural diseases.

研究分野：病理学

キーワード：血液脳関門 claudin-5 低酸素 炎症 糖尿病網膜症

## 1. 研究開始当初の背景

成体の神経組織(脳、網膜など)は、組織特異的に分化した血管系が形成するバリアー(血液脳関門、血液網膜関門など)により他組織から区画されている。神経系血管バリアーは個体発生過程において誘導されるが、いったん誘導された血管バリアーも静的な形質ではなく動的な制御下にあり、成体は血管バリアーを巧妙に調節することにより、神経細胞が正常に機能するための至適微小環境を維持している。そして、糖尿病網膜症、虚血性脳疾患、アルツハイマー病などの難治性神経系疾患においては、血管バリアーが破綻し組織微小環境の攪乱が生じることが、病態を悪化させる大きな要因として働いている。従って、血管バリアー機能の制御因子は、それら難治性神経系疾患の病態悪化を妨げる新規治療法開発の標的となり得る。

また、治療という側面からみると、神経機能の維持のために備わった血管バリアー機能の存在は、全身性に投与された薬剤の神経組織内への到達を制限することにもつながり、多くの神経系疾患に対する治療の妨げになるという一面も有している。さらに、近年の再生医療研究の目覚ましい進歩は、脊髄損傷をはじめとした‘不治の神経系疾患’を‘治癒可能な神経系疾患’にする可能性を秘めているが、正常に機能する神経組織の再生には、神経細胞・グリア細胞だけではなく、血管成分も適切に増生しバリアー形成血管へと分化することが必須である。

こうした臨床医療と深い関わりをもつ神経系血管バリアー機能の制御機構(誘導、維持、破綻)を明らかにすることにより、多くの難治性神経系疾患の病態解明のみならず、有効な薬剤投与方法の開発、再生医療など新たな治療戦略の確立が期待される。しかしながら、神経系血管バリアー機能の制御機構については、これまで多くの研究者が解明を試みてきたが、いまだ多くが不明のままである。

これまで我々は、細胞間タイト結合の構成分子の一つである claudin-5 が、血管内皮細胞の細胞膜へ局在することによるタイト結合網形成が、血管バリアーの本態であることを見出した。そして、神経系疾患の病態を悪化させる重要な誘因の一つである組織低酸素状態に焦点を当て、低酸素状態が、血管内皮細胞における claudin-5 の細胞膜への局在消失を介して血管バリアーを破綻させることを明らかにした。その後、血管内皮細胞における claudin-5 の発現と細胞膜への局在機構に焦点を絞った解析を進め、claudin-5 の発現・局在が、正常酸素状態では ubiquitin-proteasome 系の制御下、低酸素状態では ubiquitin-proteasome 系に加えて膜型プロテアーゼである a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family member の制御下にあるという興味深い知見を得た。そして、低酸素状態が血管バリアーを破綻させる過程の責任因子として、血管内皮細胞に発現する ADAM12 と ADAM17 を特定し、それらを標的とした siRNA および中和抗体の *in vivo* 投与が、低酸素状態下での血管バリアー破綻

に対する治療戦略として有用であることを示した。

## 2. 研究の目的

これまで我々は、多くの難治性神経系疾患の病態を規定する組織低酸素状態を誘因とした血管バリアー破綻の責任因子として、血管内皮細胞に発現する ADAM12 と ADAM17 を特定し、治療標的としての有用性を示した。本研究計画では、ADAM12、ADAM17 を切り口に、それらの標的分子特定など、低酸素誘発性血管バリアー破綻機構の詳細を解析する。また、神経系疾患における血管バリアー破綻には、低酸素刺激以外にも多くの誘因が混在して働くことから、低酸素刺激、炎症刺激を含む様々な誘因による血管バリアー破綻に関与する共通責任因子の特定も行う。ADAM12、ADAM17 とともに、新規に特定される因子の治療標的としての有用性と汎用性について、神経系疾患モデル動物を用い解析を進め、難治性神経系疾患に対する新規治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験

7週齢の C57BL/6N マウス(オス)を用いた。ADAM12/Meltrin 遺伝子欠損マウスは京都大学瀬原淳子博士、ADAM17 遺伝子欠損マウスは慶應義塾大学堀内圭輔博士より供与頂いた。すべての動物実験は、山口大学動物使用委員会の承認を得て行った。

### (2) マウス網膜血管の透過性の評価

血管透過性評価のトレーサーとして、tetramethylrhodamine-conjugated lysine-fixable dextran (10 kDa) (Molecular Probes) および Hoechst stain H33258 (534 Da) (Sigma-Aldrich) を用いた。マウスの左心室内に上記トレーサーを投与後、網膜の進展標本作製し、焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM5 Pascal laser confocal microscope) で観察した。

### (3) 細胞培養

マウス脳血管内皮細胞 bEND.3 細胞 (ATCC より購入) を正常酸素濃度下 (20%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) あるいは低酸素濃度下 (1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 30 min)、VEGF 刺激下 (50 ng/ml, 6 hours; Wako)、tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 刺激下 (50 ng/ml, 6 hours; R&D Systems)、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 刺激下 (10 ng/ml, 6 hours; R&D Systems) に培養した。培養液は DMEM/10%FBS を用いた。低酸素濃度下での培養には oxygen-regulated incubator (ASTEC) を用いた。

### (4) 遺伝子導入

ADAM12 特異的 small interfering RNA (siRNA)、ADAM17 特異的 siRNA、Basigin 特異的 siRNA の導入には、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いた。マウス網膜細胞への siRNA 導入には、マウスを麻酔後、5  $\mu$ M siRNA を含む混合液 1  $\mu$ l を硝子

体に投与した。培養 bEND.3 細胞への siRNA 導入では、confluent 状態の bEND.3 細胞の培養液に、siRNA の最終濃度が 10 nM となるように、混合液を添加した。

#### (5) 蛍光免疫染色

##### ① 培養 bEND.3 の染色

bEND.3 細胞を PBS で洗浄後、100% methanol で 5 分間、室温にて固定した。続いて、10% normal goat serum で 30 分間、室温にて前処理を行った。

Claudin-5 単染色には、1 次抗体 rabbit polyclonal antibody against claudin-5 (1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific) と一晩、4°C にて反応させた。その後、2 次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific) と遮光下で 1 時間、室温にて反応させた。

Claudin-5 と caveolin-1 の二重染色には、細胞の固定・前処理後、1 次抗体 rabbit polyclonal antibody against claudin-5 (1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific) および mouse monoclonal antibody against caveolin-1 (1/200; Novus Biologicals) と一晩、4°C にて反応させた。2 次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific) および Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific) と遮光下で 1 時間、室温にて反応させた。

染色は、焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて評価した。

##### ② マウス網膜組織の染色

摘出した眼球を 4%PFA で 2 時間、4°C にて固定した。1% Triton X-100 を含む 10% normal goat serum で 1 時間、室温にて前処理を行った後、1 次抗体 rabbit polyclonal antibody against claudin-5 (1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific) と一晩、4°C にて反応させた。その後、2 次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific) と遮光下で 3 時間、室温にて反応させた。染色は、焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて評価した。

#### (6) bEND.3 単層培養層の電気抵抗 (TEER) 測定

bEND.3 細胞を 0.4 mm 孔を有する cell insert 上に培養し、細胞層の TEER を Millicell ERS Voltohmmeter (Millipore) を用いて測定した。

#### (7) 免疫沈降解析およびウェスタンブロット解析

##### ① 免疫沈降解析

細胞のタンパク質抽出液 (タンパク質量 100 ~ 200  $\mu$ g) を goat polyclonal antibody against basigin (5  $\mu$ g; Santa Cruz Biotechnology) と一晩、4°C にて反応させた。続いて、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (30  $\mu$ l; GE Healthcare) と 3 時間、4°C にて反応させ、免疫沈降物を得た。

##### ② ウェスタンブロット解析

タンパク質 sample を Laemmli sample buffer (2-mercaptoethanol を含む) にて処理後、SDS-PAGE (12.5%) にて展開し、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。Membrane を、1 次抗体 rabbit polyclonal antibody against basigin (1  $\mu$ g/ml; Scrum)、mouse monoclonal antibody against caveolin-1 (1/1000 dilution; Novus Biologicals) あるいは rabbit polyclonal antibody against claudin-5 (1/300 dilution; Thermo Fisher Scientific) と反応させた。2 次抗体は、horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG (1/1000 dilution; Dako) を用いた。そして、Amersham ECL start or ECL prime (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) と反応させ、chemiluminescence signal を LAS-1000 (Fujifilm) にて検出した。

#### (8) タンパク質抽出 (可溶性画分、不溶性画分)

培養 bEND.3 細胞を、1% Triton X-100 を含む ice-cold PBS と 30 分間、4°C にて反応させ、可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を、残る不溶性画分とともに、ウェスタンブロットにて解析した。

#### (9) 糖尿病網膜症モデルマウス

Streptozotocin (STZ) の 1 回腹腔内投与 (150 mg/kg) にて、糖尿病モデルマウスを作製した。STZ 投与 4 日後に、体重、空腹時血糖値を測定し、血糖値 300 mg/dl 以上を糖尿病状態と定義した。網膜組織に透過性の高い新生血管が発生する前、STZ 投与 7 日後を、血管バリアー破綻を伴う糖尿病網膜症疾患モデルとして用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 神経系血管バリアーの病的破綻における ADAM12、ADAM17 の関与について

#### ① 遺伝子欠損マウスによる解析

低酸素刺激による神経系血管バリアー破綻への ADAM12、ADAM17 の関与について、遺伝子欠損マウスを用いた解析を行った。

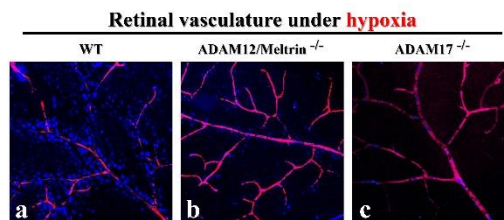


図1. ADAM12遺伝子欠損マウス、ADAM17遺伝子欠損マウスの低酸素下網膜組織における血管透過性。野生型マウス (WT) (a) では、低酸素下網膜組織では、網膜血管バリアーが破綻し血管透過性が亢進しており、瞳孔内投与した色素 (青色) の血管外への漏れが認められる。一方、ADAM12遺伝子欠損マウス (ADAM12/Meltrin<sup>-/-</sup>) (b) および ADAM17遺伝子欠損マウス (ADAM17<sup>-/-</sup>) (c) では、低酸素下網膜組織においても網膜血管バリアー機能が破綻せず、血管透過性亢進が認められない。〔ADAM12遺伝子欠損マウスは京都大学 瀬原淳子博士、ADAM17遺伝子欠損マウスは慶應義塾大学 堀内士輔博士より提供〕

その結果、ADAM12/Meltrin 遺伝子欠損マウスおよび ADAM17 遺伝子欠損マウスでは、低酸素状態の網膜組織においても網膜血管



バリアーの破綻が起こらないことが示された(図1)。したがって、ADAM12、ADAM17ともに、低酸素刺激により神経系血管バリアーが破綻する際の必須因子であるとの確証が得られた。

## ② 病的血管バリアー破綻を伴う神経系疾患に対するADAM12、ADAM17の治療標的としての有用性

血管バリアー破綻を伴う神経系疾患として糖尿病網膜症を解析対象とした。STZ 投与による糖尿病モデルマウスでは、網膜血管バリアーが破綻し血管透過性の亢進がみられた(図2a)。このマウスの硝子体内にADAM12 特異的 siRNA、ADAM17 特異的 siRNA を投与し、血管透過性の変化を観察した。その結果、ADAM12 特異的 siRNA の硝子体内投与により、血管透過性亢進はわずかに軽減されたが、完全な血管バリアー修復には至らなかった。一方、ADAM17 特異的 siRNA の硝子体内投与では、血管透過性亢進状態に変化は観察されなかった。神経系疾患における血管バリアー破綻に対するADAM12、ADAM17の治療標的としての有用性に疑問を持つ結果といえる。神経系疾患の病変部では、低酸素刺激以外にも炎症刺激など様々な病的刺激が混在して血管バリアー破綻をきたしていると考えられることから、ADAM12 およびADAM17 は、低酸素刺激による血管バリアー破綻過程に特異的に関与する因子である可能性が示唆された。

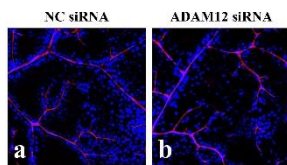


図2. 糖尿病モデルマウスの網膜血管バリアー破綻に対するADAM12発現阻害の効果。陰性コントロールsiRNA (NC siRNA) を硝子体内投与したマウス網膜では、網膜血管バリアーが破綻し血管透過性が亢進しており、静脈内投与した色素(青色)の血管外への漏れが認められる(a)。特異的siRNAの硝子体内投与によりADAM12発現を阻害すると、色素の血管外への漏れはやや軽減はするが完全には抑制されず、血管バリアー破綻の修復には至らない(b)。

## ③ 神経系血管バリアー破綻過程におけるADAM12、ADAM17の関与機構

ADAM12、ADAM17 が、低酸素刺激以外の刺激による血管バリアー破綻過程に関与するかについて、解析を行った。ADAM12 特異的 siRNA、ADAM17 特異的 siRNA の非導入下および導入下において、bEND.3 細胞に、低酸素刺激、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激を加え、細胞膜に局在する claudin-5 量の変化を免疫染色にて検索した。ADAM12 特異的 siRNA および ADAM17 特異的 siRNA の非導入下では、低酸素刺激、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激はともに、bEND.3 細胞の細胞膜からの claudin-5 消失(血管バリアー破綻の指標)をきたした(図3の control, NC siRNA)。一方、特異的 siRNA 投与により ADAM12 あるいは ADAM17 の発現を阻害したところ、低酸素刺激による細胞膜からの claudin-5 消失は完全に抑制されたのに対し、VEGF 刺激および

TNF- $\alpha$  刺激による細胞膜からの claudin-5 消失は抑制されなかった。すなわち、ADAM12 および ADAM17 は、低酸素刺激による血管バリアー破綻過程に特異的に関与する因子であると考えられた。

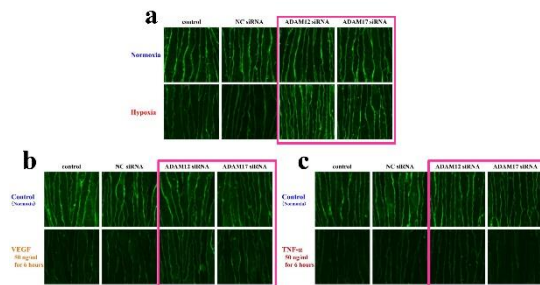


図3. 低酸素刺激、VEGF刺激、TNF- $\alpha$ 刺激による血管バリアー破綻に対するADAM12発現阻害、ADAM17発現阻害の効果。特異的siRNA投与によりADAM12あるいはADAM17の発現を阻害すると、低酸素刺激による血管内皮細胞の細胞膜からの claudin-5 消失(血管バリアー破綻の指標)はほぼ完全に抑制されるが、VEGF刺激、TNF- $\alpha$ 刺激による claudin-5 の細胞膜からの消失は抑制されない。したがって、ADAM12 および ADAM17 は、主として低酸素刺激によって惹起される血管バリアー破綻に関与することが示された。

## (2) 神経系血管バリアーの病的破綻における basigin の関与について

微小循環系では、血管バリアー機能を有する神経系血管内皮細胞に特異的に発現する細胞膜分子である basigin に注目し、その血管バリアー破綻との関連について解析を行った。

### ① 神経系血管バリアー破綻過程における basigin の関与機構

Basigin 特異的 siRNA の非導入下および導入下に、bEND.3 細胞に VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激、IL-1 $\beta$  刺激、低酸素刺激を加え、細胞膜に局在する claudin-5 量の変化を免疫染色にて検索した。Basigin 特異的 siRNA の非導入下では、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激、IL-1 $\beta$  刺激、低酸素刺激により、細胞膜から claudin-5 が消失するが、特異的 siRNA 導入により basigin の発現を阻害すると、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激、IL-1 $\beta$  刺激、低酸素刺激のいずれの刺激下においても、細胞膜からの claudin-5 消失が抑制された(図4)。

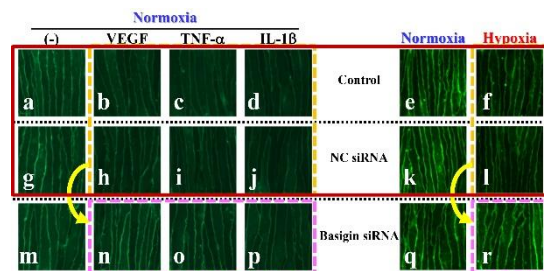


図4. VEGF刺激、TNF- $\alpha$ 刺激、IL-1 $\beta$ 刺激、低酸素刺激による血管内皮細胞の細胞膜からの claudin-5 消失現象への basigin の関与。特異的siRNA投与により basigin の発現を阻害すると、VEGF刺激(h, h, n)、TNF- $\alpha$ 刺激(i, i, o)、IL-1 $\beta$ 刺激(d, h, p)、低酸素刺激(f, l, r)による血管内皮細胞の細胞膜からの claudin-5 消失(血管バリアー破綻の指標)(h, h, e, i, d, h, f, l)は、全ての刺激条件下で抑制される(m, o, p, r)。IL-1 $\beta$ 刺激下での抑制効果はやや不完全であるが、VEGF刺激下、TNF- $\alpha$ 刺激下、低酸素刺激下では、完全に抑制される。したがって、basigin は、様々な刺激によって惹起される血管バリアー破綻に共通して関与する責任因子候補と考えられる。

様々な病的刺激による血管バリアー破綻過程に、basigin が共通責任因子として関与する可能性を示す興味深い知見が得られた。様々な病的刺激が混在して血管バリアー破綻をきたす神経系疾患に対する治療標的としての有用性が期待される結果と考えられた。

bEND.3 細胞層の TEER を指標とし、機能

的側面からも解析を行った。Basigin 特異的 siRNA の非導入下および導入下に、bEND.3 細胞層に VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激、IL-1 $\beta$  刺激を加え、経時的に TEER を測定した。その結果、特異的 siRNA 導入による basigin 発現阻害は、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激、IL-1 $\beta$  刺激による TEER の低下を全て抑制した(図5)。すなわち、機能的側面からも、basigin が、様々な病的刺激による血管バリアー破綻の共通責任因子として働くことが示された。

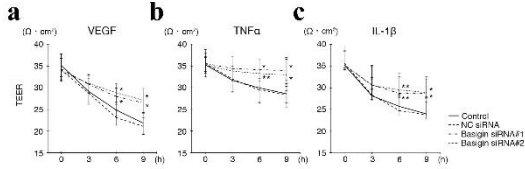


図5. VEGF刺激、TNF- $\alpha$ 刺激、IL-1 $\beta$ 刺激による血管内皮細胞層の電気抵抗値低下への basigin の関与。特異的 siRNA 投与により basigin の発現を阻害すると、VEGF 刺激(a)、TNF- $\alpha$  刺激(b)、IL-1 $\beta$  刺激(c)による血管内皮細胞層の電気抵抗値低下(血管バリアー破綻の機能的指標)は、全ての刺激条件下で抑制される。図4に示したデータとともに、機能的側面からも、様々な刺激によって惹起される血管バリアー破綻に、basigin が共通責任因子として関与することが示された。

詳細な解析を進めたところ、basigin が、claudin-5、caveolin-1 とともに3分子複合体を形成すること(図6a)、basigin 特異的 siRNA を用いた検索から、basigin が caveolin-1 の細胞内局在を可溶性画分から不溶性画分へと変化させることが示された(図6b)。

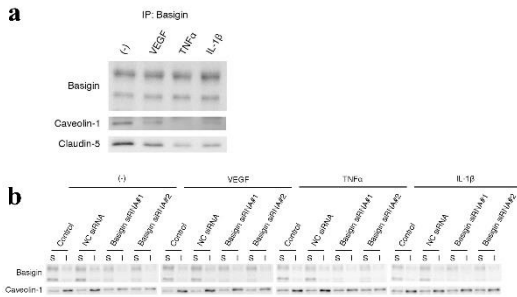


図6. Basigin は caveolin-1、claudin-5 と複合体を形成し、caveolin-1 の不溶性画分への移動に関与。(a) 非刺激下、VEGF 刺激下、TNF- $\alpha$  刺激下、IL-1 $\beta$  刺激下、いずれにおいても、basigin、caveolin-1、claudin-5 は複合体を形成することが、免疫沈降実験によって示された。(b) 特異的 siRNA により basigin の発現を阻害すると、不溶性画分に存在する caveolin-1 レベルが抑制されることが示された。S, 可溶性画分; I, 不溶性画分

免疫染色にて claudin-5、caveolin-1 の細胞内局在を可視化し解析した結果、VEGF 刺激、TNF- $\alpha$  刺激により、caveolin-1 分子が細胞質から細胞膜に移動し、細胞膜上で claudin-5 分子と共局在(複合体形成)すること、その細胞膜上での共局在が、特異的 siRNA による basigin 発現阻害により抑制されることが示された(図7)。

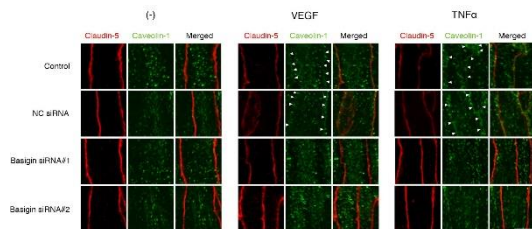


図7. VEGF 刺激下および TNF- $\alpha$  刺激下の bEND.3 細胞における caveolin-1 の細胞内局在変化・claudin-5 との共局在への basigin の関与。VEGF 刺激および TNF- $\alpha$  刺激により、caveolin-1 は細胞膜へと局在が変化し、claudin-5 と共局在する(矢頭)。その細胞内局在変化は、特異的 siRNA により basigin の発現を阻害することにより抑制される。免疫染色(赤、claudin-5; 緑、caveolin-1)

上記解析からは、様々な病的刺激下において、claudin-5 と caveolin-1 が basigin 依存性に細胞膜上で複合体を形成する結果として、claudin-5 の細胞膜からの消失、血管バリアー破綻が惹起される機構が示唆された。

## ② 病的血管バリアー破綻を伴う神経系疾患に対する basigin の治療標的としての有用性

STZ 投与糖尿病モデルマウスの網膜血管バリアー破綻に対する修復効果を検討した。糖尿病モデルマウスの網膜微小血管系では、内皮細胞の細胞膜に局在する claudin-5 量の減少が認められた(図8下段の左2個の写真)。特異的 siRNA の硝子体内投与により basigin の発現を阻害すると、糖尿病モデルマウスの網膜微小血管内皮細胞の細胞膜 claudin-5 量が、対照(非糖尿病)マウスと同程度まで回復した(図8下段の右2個の写真)。

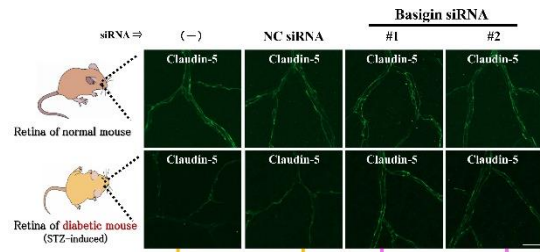


図8. 糖尿病網膜症モデルマウスの網膜血管内皮細胞における claudin-5 の細胞膜局在低下への basigin の関与。糖尿病網膜症モデルマウスの網膜微小血管系の内皮細胞では、claudin-5 の発現・細胞膜への局在が低下しているが、特異的 siRNA の硝子体内投与により basigin の発現を阻害すると、claudin-5 の発現・細胞膜への局在が回復する(矢印)。

糖尿病モデルマウスに認められた網膜血管バリアー破綻による血管透過性亢進(図9下段の左2個の写真)は、basigin 特異的 siRNA の硝子体内投与により抑制された(図9下段の右2個の写真)。

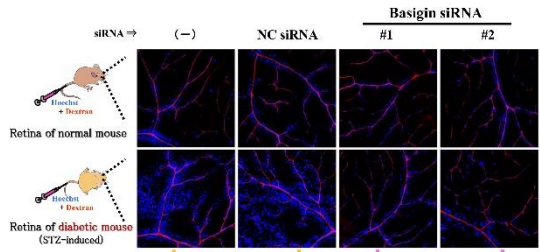


図9. 糖尿病網膜症モデルマウスの網膜血管バリアー破綻への basigin の関与および治療標的としての有用性。糖尿病網膜症モデルマウスでは網膜血管バリアーが破綻し血管透過性が亢進しており、硝子体内投与した色素(青色)の血管外への漏れが認められるが、特異的 siRNA の硝子体内投与により basigin の発現を阻害すると、色素の血管外への漏れは完全に抑制され、血管バリアーが修復される(矢印)。

以上、(2)-①②の解析結果から、様々な病的刺激による神経系血管バリアー破綻の共通責任因子であることが示された細胞膜分子 basigin は、血管バリアー破綻が病態中枢にある多くの難治性神経系疾患に対し、広く応用可能な治療標的分子候補と考えられる。臨床応用へ向け、さらに解析を進めている。

## 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 1 件)

(1) Arima M, Cui D, Kimura T, Sonoda KH, Ishibashi T, Matsuda S, Ikeda E: Basigin can be a therapeutic target to restore the retinal vascular barrier function in the mouse model of diabetic retinopathy. *Sci Rep* 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445, 2016 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 池田栄二: 成体における神経系血管バリアー機能の病的破綻に対する治療戦略. 第21回日本神経麻酔集中治療学会(海峡メッセ下関、山口、2018年7月1日)

(2) Ikeda E, Cui D, Arima M: ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. Gordon Research Conference 'Barriers of the CNS' (Colby-Sawyer College, New London, NH, USA, June 19-24, 2016)

(3) Ikeda E: Therapeutic targets for hypoxia-induced vasculopathy in retina. The 27<sup>th</sup> International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (Seoul, Korea, September 21-23, 2015)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 神経系疾患治療剤  
発明者: 池田栄二、有馬 充  
権利者: 山口大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-212817  
出願年月日: 2015年10月29日  
国内外の別: 国内

○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

池田 栄二 (IKEDA, EIJI)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30232177

(2) 研究分担者

崔 丹 (CUI, DAN)  
山口大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 40346549