

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：16K08429

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患による脳ペリサイトを起点とした血液脳関門病変と薬剤中枢性副作用

研究課題名(英文)The brain pericytes-induced blood-brain barrier dysfunction and the central adverse effects in the chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

片岡 泰文(Kataoka, Yasufumi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：70136513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の増悪期に増加するserum amyloid A(SAA)が血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を障害する可能性を追求した。(1) apo-SAAは脳血管内皮細胞のBBB透過性を亢進させた。(2) apo-SAAは、Toll様受容体4(TLR4)を介して脳ペリサイトの炎症性サイトカインのmRNA発現を誘導した。本実験結果は、SAAが脳血管内皮細胞の物質透過性および脳ペリサイトの炎症反応をそれぞれ亢進させ、これら直接および間接的経路を介してBBB機能を障害する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、BBB構成細胞である脳血管内皮細胞および脳ペリサイトに対するSAAの作用を検討した。その結果、SAAが直接および間接的経路を介して血液脳関門のバリア機能を低下させることが判った。今後は、COPD病態におけるSAA変動、BBB障害および脳ペリサイト病変の関連性について追究し、脳ペリサイトの病変を機軸にした「COPD病態進行とBBB障害」の連関機構を明らかにする必要がある。以上、本研究はCOPD病態におけるBBB機能障害発現の標的分子としてSAAを提示した点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：Serum levels of the serum amyloid A (SAA) were elevated in patients with acutely exacerbated COPD. The aim of this study is to determine the effect of SAA on brain microvascular endothelial cells and brain pericytes. We found that (1) brain endothelial barrier was impaired by apo-SAA, (2) apo-SAA increased mRNA expression levels of the pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- (TNF- ), interleukin (IL)-1 and IL-6. Toll like receptor 4 (TLR4) is involved in the mechanisms by which apo-SAA induces mRNA expression of the IL-1 and IL-6 in brain pericytes. Based on these findings, SAA induces the hyperpermeability of brain endothelial cells and the increased inflammatory reactivity of brain pericytes; these direct and indirect actions of SAA contribute to COPD-induced BBB dysfunction.

研究分野：医療系薬学

キーワード：血液脳関門 serum amyloid A 慢性閉塞性肺疾患 脳血管内皮細胞 脳ペリサイト

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

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease : COPD) は、進行性の気流制限を主徴とする疾患である。COPD 患者では、有害微粒子により活性化された肺マクロファージが炎症性サイトカイン/ケモカインを放出し、咳や痰および呼吸困難などの肺症状を起こす。慢性期では炎症症状は肺から全身に広がり、末梢臓器に留まらず、抑うつ・錯乱などの情動障害や認知機能障害などの中枢合併症を高頻度に併存する。脳は、脳内環境の恒常性を厳密に保つために脳の特異的バリアである血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) により保護されている。さらに、BBB は循環血液と脳実質を隔てる「関門」であると同時に、神経細胞と共に脳神経血管機構を構築し中枢神経機能を制御する「機関」でもある。実際、BBB 障害は、神経活動異常に伴う認知機能低下などの中枢神経障害を誘発する。我々は COPD モデル動物において BBB 機能が低下することを報告し、COPD 病態に依存した BBB 障害が、脳神経活動の変調をきたす可能性を提起した。しかし、この COPD 病態に依存した BBB 障害機構の詳しい機序は不明である。

Serum amyloid A (SAA) は、急性炎症時に血液中で急増する急性期タンパク質の一つである。BBB 障害のある患者では、血清中 SAA 濃度の上昇が認められており、COPD 患者においても、急性増悪期に血清中 SAA 濃度が上昇する。急性増悪期の発現頻度は、COPD 患者の中枢性合併症の悪化と相関する。これらの報告は、COPD 病態における BBB 機能の低下や脳機能の異常化に SAA が寄与する可能性を示唆する。しかし、SAA が脳保護機構である BBB に対してどのような作用を有するかは未だに明らかではない。本研究では BBB を構成する細胞 (脳血管内皮細胞および脳ペリサイト) に対する SAA の作用を検討し、COPD 病態進行に連動した BBB 障害機構の解明に繋げる。

## 2. 研究の目的

本研究では、BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞および脳ペリサイトの培養細胞を用いて、serum amyloid A とその受容体を介した BBB 構成細胞の応答に着眼し、COPD 病態進行に連動した BBB 障害機構を明らかにする。これを基盤として、COPD の中枢性合併症・薬剤中枢性副作用の発現機序とその防御法を追究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳血管内皮細胞の血管透過性に対する apo-SAA の作用:

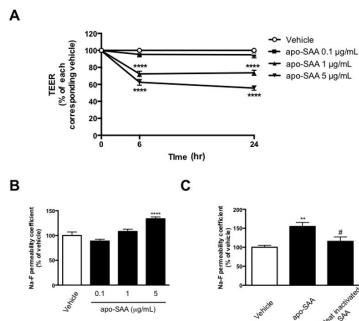
初代培養のラット脳血管内皮細胞 (RBEC) を単離・培養した後、transwell insert に播種して in vitro BBB モデルとした。作製した in vitro BBB モデル (RBEC monolayer) の insert side および bottom side に apo-SAA を処理し、経内皮電気抵抗 (TEER) 値、Na-F (sodium fluorescein) 透過係数および Evans blue albumin (EBA) 透過係数を指標として血管透過性 (BBB 機能) を評価した。また、3.5cm<sup>2</sup> dish に播種した RBEC に(1)と同様の薬物処理を行った後、lysis buffer を用いて、細胞を溶解しタンパク質を回収した。Western blot 法を用いて、密着結合関連タンパク質 (ZO-1, cludin-5, occludin) の発現量を定量した。

(2) SAA による脳ペリサイトの炎症性サイトカイン発現機構の解明: 初代培養によりラット脳ペリサイトを単離培養した。脳ペリサイトの炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) mRNA 発現量に対する SAA の影響を検討するため、apo-SAA を 24 時間処理して、セパゾールを用いて RNA を抽出した。その後、RT-PCR 法によって TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 量を測定し

た。さらに、脳ペリサイトの apo-SAA 刺激応答に関する TLR4 の関与を検討するため、TLR4 阻害剤である TAK-242 を脳ペリサイトに前処置し、その後 apo-SAA を処理した。Apo-SAA 処理 24 時間後における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。

#### 4. 研究成果

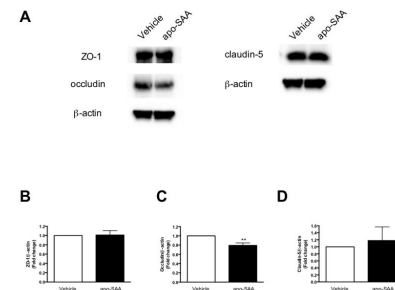
##### (1) RBEC monolayer における BBB 透過性に対する SAA の作用



**Figure 1. Effect of apo-SAA on BBB permeability in RBEC monolayer**  
 (A) Time-course of the changes in TEER of RBECs after addition of apo-SAA during a 24-hour period  
 (B) Effect of apo-SAA on Na-F permeability in RBEC monolayers.  
 (C) Na-F permeability in RBEC monolayers. RBEC monolayers were exposed to apo-SAA (5 µg/mL) or heat-inactivated apo-SAA in both the luminal and abutinal chamber of RBEC monolayers for 24 hours.

の apo-SAA による Na-F 透過係数の増加を有意に抑制した (Figure 1C)。また、Apo-SAA は、RBEC の occludin タンパク質発現量を有意に減少させた。ZO-1 および claudin-5 タンパク発現量に対する apo-SAA の影響は認められなかった (Figure 2A-D)。

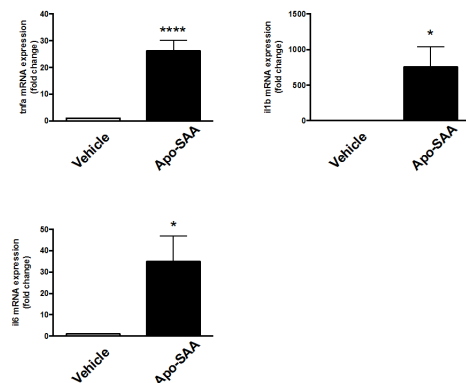
本研究結果は、apo-SAA が脳血管内皮細胞の血管透過性亢進 (TEER 値の低下および Na-F 透過係数の増加) と密着結合関連タンパク質である occludin のタンパク質発現量を減少させることを提示し、SAA が BBB 障害作用を有する可能性を示唆するものである。



**Figure 2. Effect of apo-SAA on tight junction-associated proteins in RBECs**  
 (A) Representative images of Western blots showing ZO-1, occludin and claudin-5 in RBECs treated with 5 µg/mL of apo-SAA for 24 hours.  $\beta$ -actin was used as a loading control.  
 Quantitative analysis of the protein expression levels of ZO-1 (B), occludin (C) and claudin-5 (D) in RBECs.

##### (2) SAA による脳ペリサイトの炎症性サイトカイン発現機構の解明

Apo-SAA (5 µg/mL) を処理した脳ペリサイトの TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 発現量を RT-PCR 法にて定量した。SAA 処理群における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 発現量は、vehicle 群と比較して有意に増加した (Figure 3)。さらに、脳ペリサイトにおける SAA に対する炎症応答機構の詳細を解明するため、apo-SAA と TLR4 阻害剤である TAK-242 を併用し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 発現量を qRT-PCR 法にて定量した。TAK-242 は、apo-SAA 刺激脳ペリサイトの IL-1 $\beta$ 、IL-6mRNA 発現量の増加を濃度依存的に抑制した (Figure 4)。



**Figure 3. Effect of apo-SAA on inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) mRNA expression in brain pericytes.**

SAA は生体防御の“危険信号”の 1 つであり、脳内免疫においてミクログリアおよびアストロサイトが apo-SAA に応答して TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  を産生するとの報告がなされた。本研究においても、脳ペリサイトがグリア細胞と同様に apo-SAA に対する免疫応答性を有し、脳内炎症の形

成過程に重要な役割を担う可能性を示した。

さらに、脳ペリサイトの SAA に対する炎症応答機構において TLR4 が重要な調節分子であることが示された。しかし、TAK-242 は apo-SAA 刺激による脳ペリサイトの TNF- $\alpha$  mRNA 発現誘導に関しては影響を与えなかった。この結果は、脳ペリサイトの SAA に対する炎症応答機構に TLR4 以外の受容体が関与する可能性を示唆する。これまでに SAA 受容体は、TLR4 の他に TLR2、FPR2、P2X7R および CD36 が報告されており、これらの受容体を含めた複数の受容体が脳ペリサイトの SAA に対する炎症応答機構を制御する可能性が十分に推察される。

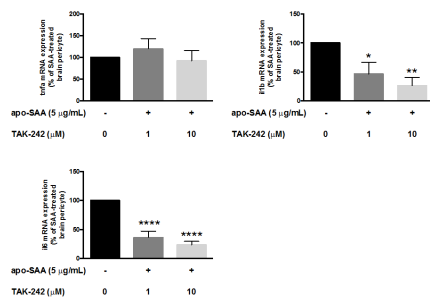


Figure 4. TAK-242 decreased mRNA level of IL-1 $\beta$  and IL-6 in apo-SAA-stimulated brain pericytes.

本研究成績は、BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞および脳ペリサイトに対する SAA の作用を明らかにした。SAA が、直接および間接的に血液脳関門のバリア機能を低下させる可能性を示唆した。今後は COPD 病態における SAA 変動、BBB 障害および脳ペリサイト病変化の関連性について追究し、脳ペリサイトの病変化を機軸にした COPD 病態進行と BBB 障害の連動機構を明らかにする必要がある。以上、本研究は COPD 病態における BBB 機能障害発現の標的分子として SAA を提示した点で意義深い。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者ならびに連帯研究者には下線 )

[雑誌論文] ( 計 10 件、主要なもののみ記載、他 6 報 )

S. Dohgu, F. Takata, J. Matsumoto, I. Kimura, A. Yamauchi, Y. Kataoka, Monomeric alpha-synuclein induces blood-brain barrier dysfunction through activated brain pericytes releasing inflammatory mediators in vitro, *Microvasc Res* 124 (2019) 61-66.

F. Takata, S. Dohgu, J. Matsumoto, T. Machida, S. Sakaguchi, I. Kimura, A. Yamauchi, Y. Kataoka, Oncostatin M-induced blood-brain barrier impairment is due to prolonged activation of STAT3 signaling in vitro, *J Cell Biochem* 119 (2018) 9055-9063.

M. Koga, Y. Kanaoka, T. Tashiro, N. Hashidume, Y. Kataoka, A. Yamauchi, Varenicline is a smoking cessation drug that blocks alveolar expansion in mice intratracheally administrated porcine pancreatic elastase, *J Pharmacol Sci* 137 (2018) 224-229.

T. Machida, F. Takata, J. Matsumoto, T. Miyamura, R. Hirata, I. Kimura, Y. Kataoka, S. Dohgu, A. Yamauchi, Contribution of thrombin-reactive brain pericytes to blood-brain barrier dysfunction in an in vivo mouse model of obesity-associated diabetes and an in vitro rat model, *PLoS One* 12 (2017) e0177447.

[学会発表] ( 計 26 件、主要なもののみ記載、他 19 件 )

バレニクリンは、 $\alpha 7$  nAChR を介して肺胞マクロファージにおける osteopontin の発現を減

少させる. 古賀允久, 稲田紘舜, 田村茉由, 萩原理子, 森園好江, 片岡泰文, 山内淳史. 第92回日本薬理学会年会 2019年3月 大阪

Smoking cessation drug, varenicline, inhibited alveolar expansion in mice intratracheally administrated porcine pancreatic elastase. Mitsuhsa Koga, Yuki Kanaoka, Nozomi Kobayashi, Kosyun Inada, Mai Eto, Aya Takagi, Yasufumi Kataoka, Atsushi Yamauchi. 18th World Congress of basic and clinical pharmacology July, 2018. Kyoto

Effect of the heat-not-burn tobacco-extracted substances on the brain endothelial barrier function in vitro. Ikuya Kimura, Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Mai Rikitake, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka. 18th World congress of basic and clinical pharmacology July, 2018. Kyoto

An interaction between thrombin and pericytes mediates the blood-brain barrier dysfunction in obesity-associated diabetes. Fuyuko Takata, Shinya Dohgu, Takashi Machida, Junichi Matsumoto, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka, 12<sup>th</sup> international conference on cerebral vascular biology, 28 November to 1 December Melbourne Australia

The role of pericytes in the TNF- $\alpha$ -mediated brain inflammation. Fuyuko Takata-Tsuji, Shinya Dohgu, Junichi Matsumoto, Ikuya Kimura, Atsushi Yamauchi, Yasufumi Kataoka, Joint Franco-Italian-Swiss multinational meeting on blood-brain interfaces. Oct 24-26, 2016 Lyon FRANCE

[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)研究分担者

研究分担者氏名: 道具 伸也

ローマ字氏名: DOHGU Shinya

所属研究機関名: 福岡大学

部局名: 薬学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60399186

研究分担者氏名：高田 芙友子

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

(2)研究協力者

なし

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。