

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08330

研究課題名（和文）ミクログリアによる血液脳関門バリア機能成熟機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms by which microglia enhance the functional maturation of blood brain barrier

研究代表者

佐藤 薫 (Sato, Kaoru)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：10311391

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）：ミクログリアによる正常時の BBB バリア機能調節機構、それに関わるサイトカイン・ケモカインを明らかとした。これらのサイトカイン・ケモカインを放出する細胞を同定し、ミクログリアが最終濃度を調節していることを明らかとした。炎症をともなう中枢神経疾患における BBB機能破綻に対するそれらサイトカイン・ケモカインの治療応用性について明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミクログリアによる正常時の BBB バリア機能調節機構、それに関わるサイトカイン・ケモカインを明らかとする
ことで、炎症をともなう中枢神経疾患における BBB機能破綻に対するそれらサイトカイン・ケモカインの治
療応用性について明らかとした。以上の知見は中枢神経系への薬物送達のための重要な情報となることも期待され
る。

研究成果の概要（英文）：We clarified that the roles of microglia in both of healthy BBB and pathological BBB. Of note, we identified two cytokines are essential to the effects of microglia. These findings will lead to the new therapeutic targets in the CNS diseases associated with BBB breakdown.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア 血液脳関門 サイトカイン ケモカイン 発達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) は、バクテリアや大きい水溶性分子の脳内移行を防ぐことにより脳を守っている。BBB では、血管内皮細胞が Tight junction protein (TJ) によって強固に結合し高い電気抵抗値を示し、循環血液と脳内とを隔てる高い選択性をもった透過バリアとなっている。脳虚血、multiple sclerosis などの炎症を伴う中枢神経系疾患では BBB の機能破綻が起こり、より深刻な神経障害、さらには認知機能障害につながる事が知られている。従って、炎症を伴う中枢神経系疾患において BBB 機能破綻を防ぐことは有力な薬剤治療ターゲットである。一方、25 年ほど前から、BBB 機能調節機構については neuro (glio) vascular unit (NVU) として血管周囲のグリア細胞や神経細胞も関与していることが指摘されている。しかし、ミクログリアについては、炎症時に活性化型ミクログリアとなり BBB 機能破綻への関与することが主に研究されてきた。我々はこれまでに、ミクログリアが正常の脳内において、サイトカイン・ケモカイン環境を調節することにより周囲の細胞の分化や機能を調節し、脳機能を支える例を明らかにしてきた (Sato, GLIA 63(8) 1394-495, 2015)。その一例として側脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) ミクログリアによる神経新生促進、オリゴデンドロサイト新生促進作用がある (Shigemoto-Mogami et al., J Neurosci 34(5) 2231-43, 2014)。本研究では、ミクログリアによる正常時の BBB バリア機能調節機構、それに関わるサイトカイン・ケモカインを明らかとすることで、炎症をともなう中枢神経疾患における BBB 機能破綻に対するそれらサイトカイン・ケモカインの治療応用性について明らかとする。

2. 研究の目的

BBB 機能について細胞レベルで検討するためには in vitro BBB モデルが必要であるが、BBB は脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞 (ペリサイト) 及び星状神経膠細胞 (アストロサイト) の 3 種類の細胞により構成されており、モデルの作成には内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種の細胞培養系を安定させる必要があるため、各細胞の viability に依存してばらつきが大きくなってしまふ。そこで、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種の細胞から構成される市販の in vitro BBB モデルを活用し、我々が調整した無刺激初代培養ミクログリアをモデルの脳側に添加することで microglia-supplemented in vitro BBB モデルを立ち上げた。このモデルにより BBB バリア機能にミクログリアがどの程度関わっているかを効率よく検討する。microglia-supplemented in vitro BBB モデル内のサイトカイン・ケモカイン濃度は MAGPIX xPONENT 4.2 (Luminex XMAP TECHNOLOGY) を用いて網羅的に解析する。以上の in vitro 実験結果を in vivo 実験により検証する。これにより、BBB バリア機能破綻を伴う病態におけるこれらのサイトカイン・ケモカインの治療応用性、治療タイミングについて明らかとする。

3. 研究の方法

< in vitro 実験 > in vitro BBB モデル ((株)ファーマコセル) を用いた。この in vitro BBB モデルは、トランスウェルの上面に血管内皮細胞 (血管側)、インサートの下面にペリサイト、トランスウェルを静置しているプラスチックプレートにアストロサイトが接着培養されており (脳側) これを 5 日間培養することで TJs 蛋白質、トランスポーターを発現した BBB へと成熟する。in vitro BBB モデル培養 1 日目に、脳側に活性状態の異なるミクログリア (無刺激のミクログリア; Non-MG、LPS で活性化を誘導したミクログリア; LPS-MG) を添加し 4 日間培養することで、BBB バリア機能に及ぼす影響を調べた。同時に脳側のサイトカイン・ケモカインの濃度を MAGPIX System (Millipore) を用いて測定した。候補因子である VEGF、フラクタルカインの作用を調べるため、rVEGF と、フラクタルカイン機能阻害抗体を用いた実験を行った。VEGF、フラクタルカインの産生細胞を確認するため、in vitro BBB モデルの構成細胞を変えて VEGF、フラクタルカインの濃度測定を行った。

< in vivo 実験 > 生誕 1、4、10、14、30 日後のラットの腹腔内に 2% Evans Blue を投与した。24 時間後、ラットを深麻酔下にて開胸し、PBS、4% PFA を心灌流して固定後、脳を摘出した。生誕 1、4、7、10、14、30 日後のラットを深麻酔下にて開胸し、01mg/ml Ez-Link Sulfo-NHS-Biotin PBS 溶液を心灌流した後、4% PFA を心灌流して固定し、脳を摘出した。脳切片を作成し、A564 ストレプとアビジン (x500) によりビオチンラベルし、脳血管のビオチン漏出を数値化した。PFA 固定した生誕 1、4、7、10、14、30 日後のラットの脳より凍結切片を作成し、Lectin、抗 CD31 抗体、抗 Iba1 抗体を用いて、免疫染色を行った。染色後の切片は NIKON A1R A1 共焦点顕微鏡をもちいて解析した。

4. 研究成果

BBB 形成過程の in vitro BBB モデルの脳側に Non-MG が共存していると、内皮抵抗値 (TEER) が増大し、TJ 蛋白質 ZO-1、Claudin5 の発現が有意に増加し、BBB バリア機能が亢進することを明らかにした。一方、LPS-MG が共存していると、TEER の低下、TJ 蛋白質 ZO-1、Claudin5、Occludin の発現量の減少、細胞間隙透過性の増大が示され BBB バリア機能が崩壊することが明らかになった。ミクログリアの作用本体であるサイトカインおよびケモカインを同定するため、脳側のサイトカイン・ケモカイン濃度を MAGPIX xPONE4.2 システム (Merck Millipore 社) を用いて網羅的に解析したところ、ミクログリア添加時に BBB バリア機能と相関して濃度変化するサイトカイン・ケモカインが 2 種類同定された。バリア機能更新すると濃度が上昇す

る VEGF と、低下するフラクタルカインである。これらの因子の BBB 機能への作用を調べるため、rVEGF と、フラクタルカイン機能阻害抗体を用いた実験を行った結果、VEGF は TEER を増大していること、さらに VEGF 存在化におけるフラクタルカインの濃度低下は ZO-1、Claudin5 蛋白発現増大を誘導していることが明らかになった。VEGF、フラクタルカインの産生細胞を検討した結果、VEGF はアストロサイトから産生されており、血管側の細胞(血管内皮細胞、ペリサイト)と共培養することで、脳側の VEGF 濃度が低下するが、ミクログリアを添加するとその作用が抑制され、VEGF 濃度が上昇することが明らかになった。一方、フラクタルカインは血管側の細胞(血管内皮細胞、ペリサイト)から産生されており、ミクログリアと共培養すると、フラクタルカイン濃度が低下することが明らかになった。さらに、in vivo 実験により、生誕 1、4、10、14、30 日後の Evans Blue 投与ラットの前脳を観察した結果、生後 4 日目までは PBS 投与群と比較して青色に呈色しているが、生後 10 日目になると PBS 投与群とほとんど変化がないことが明らかになった。さらに、ビオチンラベル色素 Ez-Link Sulfo-NHS-Biotin を心灌流し、脳血管周辺のビオチン色素の漏出を染色にて調べた結果、生後 7~10 日目には BBB 形成が完了している可能性が示された。我々は、同時期のラット脳の免疫染色の結果から、脳毛細血管を多くのミクログリアが取り巻いている様子を確認している。現在、クロドロネートリポソーム投与等による、ミクログリア除去実験を進めており、BBB 成熟期の血管周辺ミクログリアの役割およびサイトカイン・ケモカインの関与について in vivo での検証の見通しがたった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato K	4. 巻 152
2. 論文標題 2.Consideration for future in vitro BBB models - technical development to investigate the drug delivery to the CNS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 287-294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.152.287.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sato K	4. 巻 12
2. 論文標題 2.Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci	6. 最初と最後の頁 494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2018.00494.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shigemoto-Mogami Y, Sato K.	4. 巻 150(6)
2. 論文標題 Microglia and cellular differentiation - possibility of microglia as drug discovery target	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 268-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.150.268.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 最上（重本）由香里、干川和枝、諫田泰成、佐藤 薫
2. 発表標題 病態を考慮した血液脳関門・生体模倣システムの開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Kanda Y, Sato K
2. 発表標題 Microglia enhance the functional maturation of blood-brain barrier by regulating the cytokine/chemokine dynamics
3. 学会等名 第 61 回日本神経化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Kanda Y, Sato K
2. 発表標題 The interaction of activated microglia with astrocytes induces changes in cytokine/chemokine concentrations in inflammatory neurovascular unit
3. 学会等名 FENS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Kanda Y, Sato K
2. 発表標題 Microglia is not the resource but the modulator of the cytokines/chemokines in inflammatory neurovascular unit
3. 学会等名 SfN2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Sato K
2. 発表標題 Microglia Promote the Functional Maturation of Blood-Brain Barrier by Regulating Cytokine/Chemokine Concentrations
3. 学会等名 GLIA2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----