

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10120

研究課題名(和文) ヒト脳血管内皮細胞を用いたタイト結合動的評価によるウイルス関連脳症病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of virus-associated encephalopathies by dynamics evaluation of tight-junction using human cerebral vascular endothelial cells

研究代表者

細矢 光亮 (Hosoya, Mitsuaki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス関連急性脳症(VAE)は、ウイルス感染に伴う急性脳障害である。VAEの病態は、高サイトカイン血症により血液脳関門(BBB)が障害される非炎症性の脳浮腫である。臓器によりタイト結合を構成する蛋白の発現が異なるため、VAEの病態を再現するには、脳血管内皮細胞による検討が必要となる。今回、我々はヒト脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いたin vitro BBBモデルにより、TNF- $\alpha$ による脳血管内皮細胞障害の動的変化を評価した。本評価系においてTNF- $\alpha$ 濃度依存的に血管透過性が亢進することを経内皮細胞電気抵抗測定、溶質透過試験で示され、VAEモデルが確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いたBBBモデルを用い、TNF- $\alpha$ を添加することによりin vitroのVAEモデルを作製した。TER測定と溶質透過試験はTNF- $\alpha$ による血管内皮細胞障害による透過性亢進を評価するのに有用である。この評価方法は、VAEの病態解明だけでなく、血管透過性に焦点をあてた特異的治療法開発に有用である。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of virus-associated acute encephalopathy (VAE) involves non-inflammatory brain edema caused by disruption of the blood brain barrier (BBB). We aimed to establish an in vitro VAE model using an in vitro BBB model and to evaluate the dynamics of vascular dysfunction caused by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . A co-culture model, consisting of human brain microvascular endothelial cells and pericytes, was treated with serially diluted TNF- $\alpha$ . The VAE model was established by demonstrating that vascular permeability was enhanced in a TNF- $\alpha$  concentration-dependent manner in this evaluation system by transendothelial electrical resistance measurement and solute permeation test.

研究分野：小児科学

キーワード：急性脳症 血液脳関門 血管内皮障害 タイトジャンクション サイトカイン ウイルス 血管透過性 血管内皮細胞

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ脳症の中心病態は、高サイトカイン血症により脳内深部の血管の透過性が亢進し、血管周囲へ血液成分が漏出することで、血管周囲の脳組織が浮腫に陥り、二次的に神経細胞やグリア細胞が壊死やアポトーシスに陥ると考えられている。本病態はインフルエンザ脳症のみならず HHV-6、エンテロウイルス、ロタウイルスなどのその他のウイルス性脳症の病態としても考えられている。

我々はこれまで、インフルエンザに伴う急性脳症(インフルエンザ脳症)の病態解明を目的として、急性脳症患者保護者の同意を得て、脳症発症時と回復期に血液及び髄液検体を採取し、各種サイトカイン(炎症マーカー)、接着分子(血管内皮活性化マーカー)、チトクローム C(アポトーシスマーカー)濃度を測定してきた。その結果、インフルエンザウイルス感染にともない惹起された高サイトカイン血症が血管内皮細胞を活性化し、血管障害をきたしてインフルエンザ脳症を発症することを明らかにした(Morita et al. Brain & Development, 2005)。また、血清中チトクローム C が死亡例と高度後遺症例の急性期で高値であり、髄液中チトクローム C が大脳に萎縮をきたした後遺症例の回復期において高値であったことから、最重症例の病態形成においては血管内皮細胞のアポトーシスが関与し、回復期の脳萎縮には神経細胞のアポトーシスが関与すると推定した(Hosoya et al. Pediatric Infections Disease Journal, 2005)。

血管内皮細胞のバリア機能の破壊による血管透過性亢進は様々な疾患で認められてきており、血管透過性制御に深く関わっているのが上皮細胞や内皮細胞間に存在し細胞間を密着させるタイト結合と言われている(Chiba et al. Biochemica et Biophysica Acta, 2008)。また、そのタイト結合は TNF- $\alpha$  をはじめとした炎症性サイトカインの影響を受ける(Capaldo et al. Biochemica et Biophysica Acta, 2009)とされている。我々は単離した臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  が濃度依存的に血管透過性を亢進させることを、経内皮細胞電気抵抗(Transendothelial Electrical Resistance, TER)測定により電気生理学的に示し、またデキストランを用いて実際に透過性が亢進していることを機能的に示した。さらに内皮細胞間のタイト結合が変化していることを明らかにした(Miyazaki et al. Ped Res. in press 2016)。しかし、臓器により血管内皮細胞のタイトジャンクションを構成する蛋白の発現が異なるため(Daneman R, Prat A, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015)、脳血管内皮細胞による検討が必要である。さらにインフルエンザ脳症の予後増悪因子や治療の有効性を疫学的に調査した研究はあるが、急性脳症の病態解明においてタイト結合に焦点を当てた研究はなされていない。

### 2. 研究の目的

インフルエンザ脳症に対し、免疫抑制療法(ステロイドパルス療法、大量ガンマグロブリン療法)、抗サイトカイン療法(血漿交換療法)、抗アポトーシス療法(シクロスポリン療法、低体温療法)などがガイドラインで示されているが、これらの治療によっても死亡および後遺症残存率が 20-30%にみられる。そこで、本研究においては、高サイトカイン血症によるウイルス性脳症の病態を *in vitro* において再現した評価法を用い、サイトカインや薬剤による血管透過性を動的測定により評価し、また、血管透過性に関与するタイト結合を定量的に解析して、ウイルス性脳症の生理生化学的な病態解明を目指し、有効な治療戦略開発の基礎としたいと考えた。

### 3. 研究の方法

我々はウイルス性脳症の病態解明にヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用い検討してきたが、臓器により血管内皮細胞のタイトジャンクションを構成する蛋白の発現が異なるため

(Daneman R, Prat A, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015)、脳血管内皮細胞による検討が必要である。脳血管内皮細胞と周皮細胞を用いた共培養モデルを作製し、以下の検討を行った。

トランスウェル膜の上部と下部に型コラーゲンとリジンをコーティングし、ヒト脳血管内皮細胞と周皮細胞を上部と下部にそれぞれ培養し、*in vitro* BBB モデルを作製した。cellZscope®を用いて TER を経時的に測定し、TER がプラトーになりタイト結合の形成を確認後、段階希釈した TNF- $\alpha$  を添加して *in vitro* VAE モデルを作製し、TER を継続して測定した。同様のトランスウェルシステムを用いて分子量の異なるフルオレセインナトリウム(分子量 376 Da)または FITC 標識デキストラン(分子量 3-5 kDa、70 kDa、250 kDa)を添加し物質の細胞透過を蛍光マイクロプレートリーダーにより評価した。TNF- $\alpha$  添加後の血管透過性変化に伴う claudin-5 と ZO-1 の局在変化を蛍光免疫染色により、また claudin-5 の蛋白発現変化をウェスタンブロット法によって観察した。

### 4. 研究成果

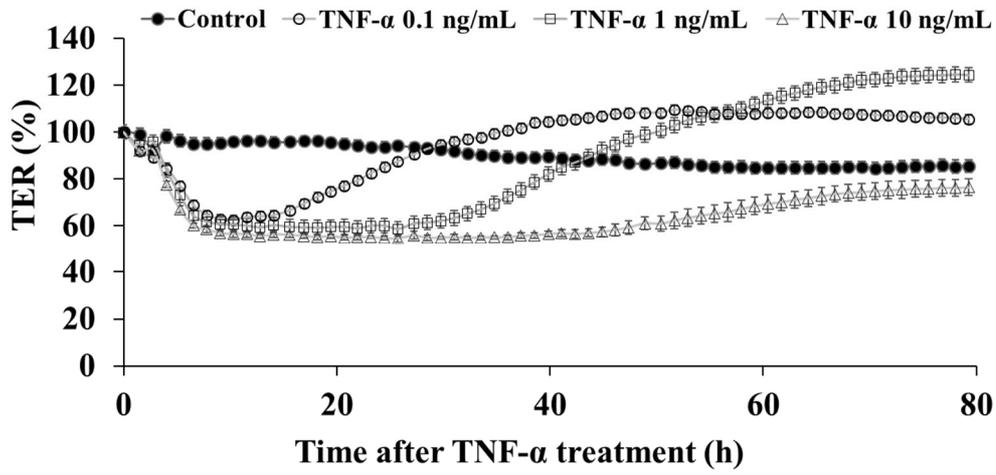
TER 値は、TNF- $\alpha$  添加後に減少し、最小値に達した後、徐々に回復したが、回復までの時間は、TNF- $\alpha$  濃度に依存し遅延した(図 1)。溶質透過試験では、TNF- $\alpha$  添加後にすべての分子量の物質の透過性が亢進したが、その程度は分子量と TNF- $\alpha$  濃度に依存し、経時的に回復の傾向を認めた(図 2)。claudin-5 の局在は、TNF- $\alpha$  添加後に変化し、局在の回復時間は TNF- $\alpha$  濃度に依存し遅延した(図 3)。一方、ZO-1 の局在には変化がみられ

なかった(図3)。claudin-5の発現は、TNF- $\alpha$ 添加24時間後に減少し、48時間後に完全に回復した(図4)。

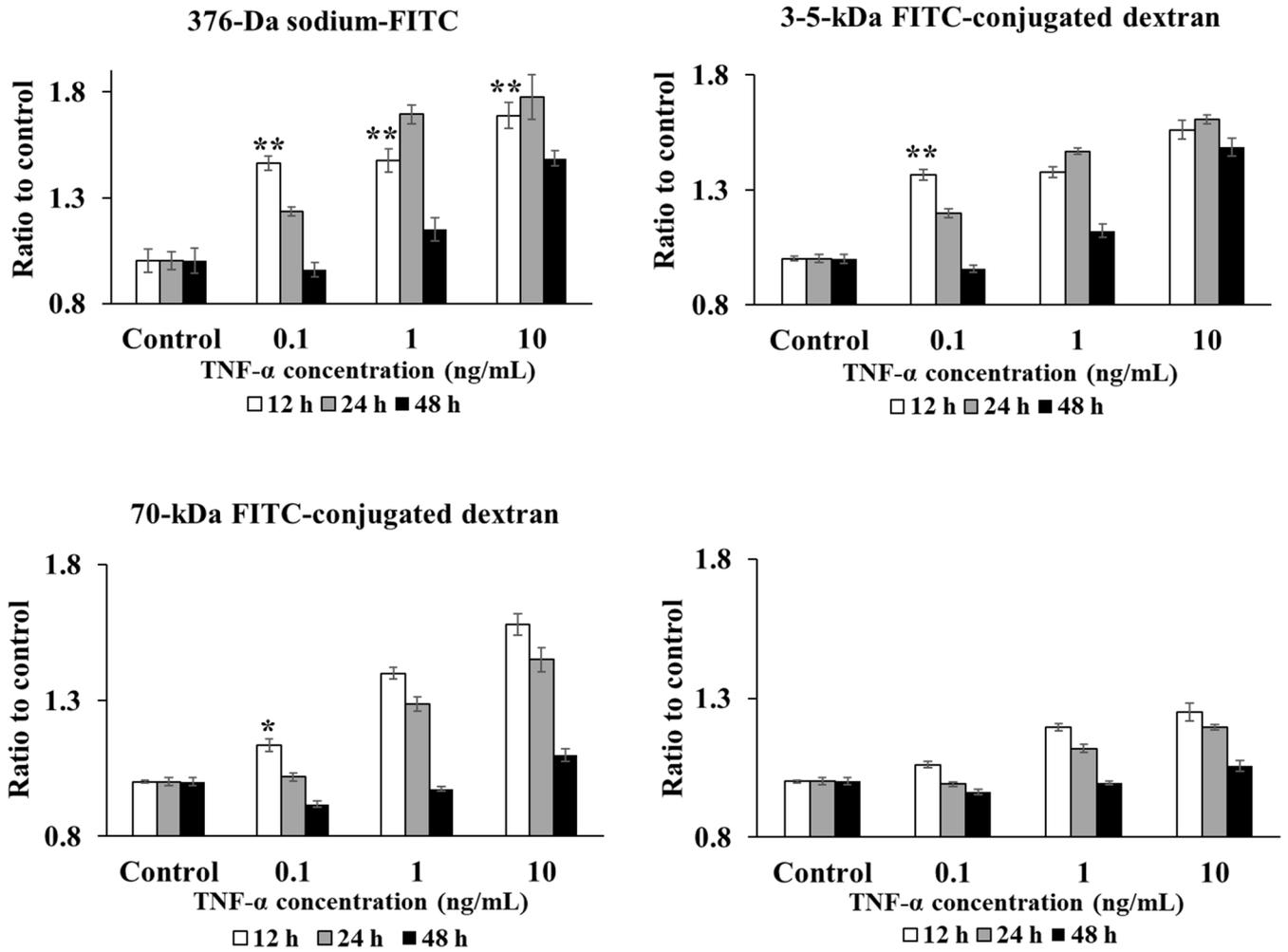
<引用文献>

- 1, [Morita H](#), [Hosoya M](#), [Kato A](#), Kawasaki Y, Suzuki H (2005) Laboratory characteristics of acute encephalopathy with multiple organ dysfunctions. *Brain Dev* 27:477-482.
- 2, Hosoya M, Nuno H, Aoyama M, Kawasaki Y, Suzuki H (2005) Cytochrome c and tumor necrosis factor-alpha values in serum and cerebrospinal fluid of patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J* 24:467-470.
- 3, Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008) Transmembrane Proteins of Tight Junctions. *Biochim Biophys Acta*. 1778: 588-600.
- 4, Capaldo CT, Nusrat A. (2009) Cytokine regulation of tight junctions. *Biochem Biophys Acta* 1788:864-871.
- 5, Daneman R, Prat A. (2015) The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7: a020412.
- 6, Miyazaki K, Hashimoto K, Sato M, Watanabe M, Tomikawa N, Kanno S, Kawasaki Y, Momoi N, Hosoya M (2017) Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- $\alpha$  in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatr Res* 81:942-947.

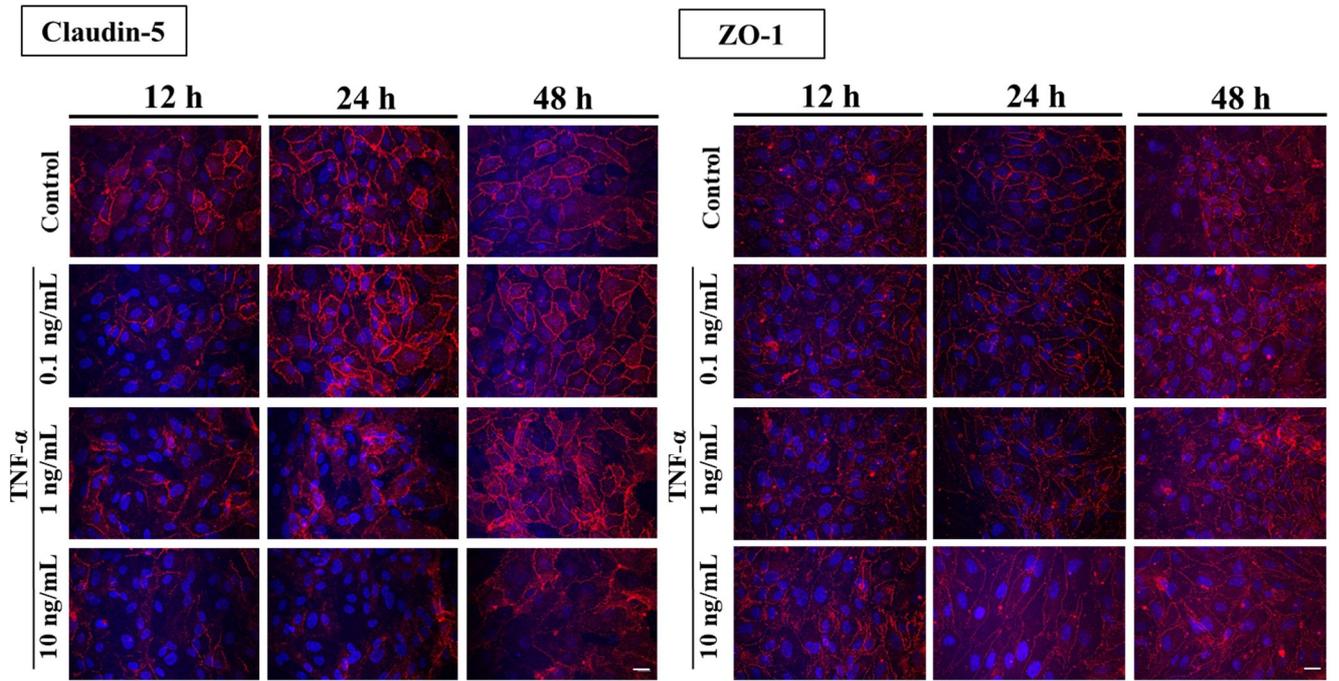
☒ 1



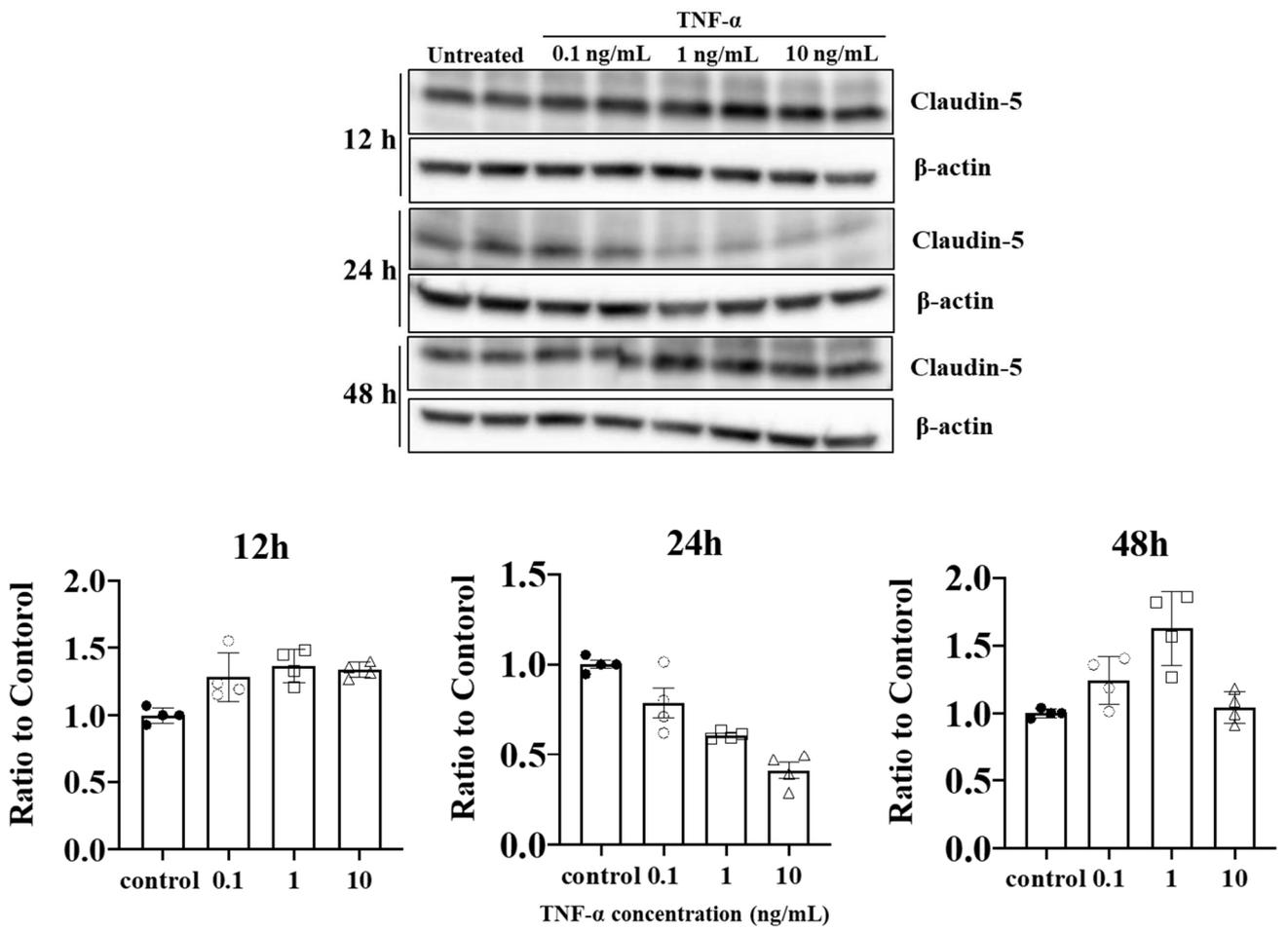
☒ 2



3



4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田創、橋本浩一、川崎幸彦、細矢光亮
2. 発表標題 ウイルス関連急性脳症の病態解明を目的としたヒト脳血管内皮細胞不死化細胞株によるタイト結合の動的、機能的評価
3. 学会等名 第50回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田創、橋本浩一、宮崎恭平、佐藤晶論、細矢光亮
2. 発表標題 血液脳関門モデルを用いたin vitroウイルス関連急性脳症病態の作製と血管内皮細胞障害の動的評価
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hajime Maeda, Koichi Hashimoto, Kyohei Miyazaki, Hayato Go, Ryo Maeda, Masatoki Sato, Yukihiko Kawasaki, Nobuo Momoi, and Mitsuaki Hosoya
2. 発表標題 Modeling virus-associated acute encephalopathy pathophysiology using an in vitro blood-brain barrier model and dynamic evaluation of endothelial cell injury
3. 学会等名 Pediatric Academic Societies 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	川崎 幸彦  (Kawasaki Yukihiko)  (00305369)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	橋本 浩一  (Hashimoto Koichi)  (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授    (21601)	