

令和 2 年 4 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10838

研究課題名(和文) リゾリン脂質制御に基づく新規脳血管保護法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to protect cerebrovascular based on the regulation of lysophospholipid

研究代表者

中川 慎介 (NAKAGAWA, Shinsuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：10404211

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)：生理活性を持つ脂質であるリゾリン脂質は、免疫や血管系において重要な働きをしている。本研究では、血液脳関門(BBB)におけるリゾリン脂質である、スフィンゴシン1-リン酸(S1P)やリゾホスファチジン酸(LPA)の役割を検討した。In vitro BBB modelやIn vivo モデルを用いた検討により、S1PやLPAはBBB機能を調節する作用を持つことが判明した。更に、脳血管障害時においてS1Pはその産生量が亢進しており、S1Pの作用を阻害する薬物(SKI-IIやProbucoI)により障害が改善することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理活性脂質であるリゾリン脂質(スフィンゴシン1-リン酸(S1P)やリゾホスファチジン酸(LPA)など)は、多くの病態との関連が指摘されていたが、脳血管障害においてどのような役割を担っているのかは、不明な点が残されていた。本研究により、S1PやLPAによる脳血管機能調節機構が明らかとなり、新たな脳血管保護方法の開発へとつながる基礎データを示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Lysophospholipids, which are physiologically active lipids, play important roles in immunity and the vascular system. In this study, we investigated the role of lysophospholipids, such as sphingosine 1-phosphate (S1P) and lysophosphatidic acid (LPA), at the blood-brain barrier (BBB). Examination using the in vitro BBB model and the in vivo model revealed that S1P and LPA have an effect on regulating BBB function. Furthermore, we have found that inhibition of S1P signaling by sphingosine kinase inhibitor (SKI-II) or ABCA1 transporter inhibitor (ProbucoI) prevents BBB dysfunction after ischemia both in vitro and in vivo.

研究分野：薬理学

キーワード：血液脳関門 S1P 虚血再灌流

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、単に脳内と血液の間で物質の移動を制限する関門ではなく、神経・グリア系と相互作用し脳機能を維持していることが指摘されている (Neurovascular Unit)。そのため、脳血管障害だけでなく中枢性疾患における BBB の役割が注目されており、BBB 機能の制御機構を解明することは、中枢性疾患の更なる理解に繋がると考えられている。BBB は脳毛細血管内皮細胞とペリサイト、アストロサイトにより構築されており、これらの細胞間相互作用や脳循環物質により維持されている。これまでに、BBB 機能を調節する様々な相互作用因子が報告されてきたが、生体膜を構成するリン脂質から合成され、細胞間の情報伝達物質として機能する脂質メディエーター (スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) やリゾホスファチジン酸 (LPA)) についての BBB における役割は不明であった。

S1P や LPA は、多彩な生理作用を持ち、多くの病態との関連が指摘されている。S1P と LPA は、発生段階の血管新生で重要な働きを担っていることが報告されているが、脳血管あるいは BBB における役割については不明な点が多く残されていた。我々のこれまでの検討により、S1P は BBB のバリアー機能を低下させることを見出しているが、その詳細な作用機序や病態での役割に関しては不明な点が残されていた。また、LPA の BBB での役割は、報告が少なく更なる検討が必要とされていた。

2. 研究の目的

以上の事から、S1P および LPA の役割を *in vitro* および *in vivo* モデルを用いて検討し、リゾリン脂質による新たな BBB 機能の制御機構を明らかにすることを試みた。具体的には以下の項目を検討した。

- (1) *In vitro* BBB モデルを用いた S1P と LPA の BBB 機能への影響。
- (2) *In vitro* BBB 障害モデルを用いた S1P の役割解明。
- (3) *In vivo* 脳虚血モデルを用いた S1P の役割解明

3. 研究の方法

- (1) 初代培養細胞、*in vitro* BBB モデル
Wistar ラットより、脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトを単離培養した。Millicell®を用いて共培養し、*in vitro* BBB モデルとした。
- (2) *In vitro* BBB 機能評価
EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた、経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) 測定
sodium fluorescein (小分子 (376Da) の paracellular transport
Immunoblot、immunostaining 法にてタイトジャンクションタンパク (claudin-5, occluding, ZO-1) の発現解析。
PCR による受容体や産生酵素の発現解析
- (3) *In vitro* 脳虚血再還流 BBB モデルの作製
Normoxia 群は、血清なしの DMEM/F12 (glucose 4.5g/L) に交換し、通常 (95% air-5% CO₂) の培養環境で培養した。Hypoxia 群は、血清なしの DMEM /F12 (glucose free) に交換し、酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を行った。CO₂ インキュベーターで 3 ~ 6 時間インキュベートし、再還流は通常の培養液に交換する事で作製した。
- (4) *In vivo* BBB 障害モデルの作製
In vivo 脳梗塞モデルとして、マウス中大脳動脈閉塞モデル (MCAO モデル) を用いて検討した。

4. 研究成果

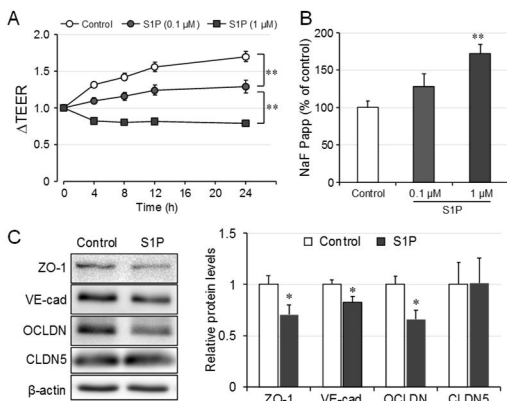
- (1) *In vitro* BBB モデルを用いた S1P と LPA の BBB 機能への影響

S1P の作用

S1P の内皮細胞のバリアー機能への影響を調べるために、内皮細胞の単層培養系モデルを *in vitro* で作成し、バリアー機能の指標である経内皮電気抵抗 (TEER) を測定した。S1P は TEER を減少させ、バリアー機能を低下させることが判明した。また、S1P のバリアー機能の低下には、細胞接着タンパク質である ZO-1、VE-cadherin、occludin の発現低下が関与していた (図 1)。BBB の機能維持には内皮細胞だけでなくペリサイトやアストロサイトとの相互作用が重要である。S1P の受容体は内皮細胞だけでなく、アストロサイトやペリサイトにも発

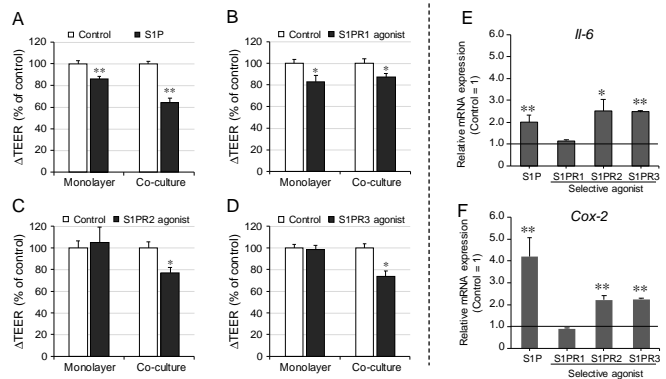
現しており、BBBの機能調節に影響すると考えられる。そこで、内皮細胞とペリサイトまたはアストロサイトとの共培養モデルを作製し、S1Pのバリアー機能への影響を検討した。S1Pのバリアー機能低下作用は内皮細胞単独よりもペリサイトとの共培養系で増強した。ペリサイトにはS1PR2とS1PR3受容体が発現しており、S1P刺激による炎症性物質(COX2、IL-6)の発現亢進が、BBB機能低下を増悪させることが判明した(図2)。S1PのBBBでの作用は、内皮細胞への直接作用とペリサイトを介した間接作用があるものと推察される。

図1. S1PのBBB機能への作用



A, B. S1PのTEERおよび低分子化合物の透過性への影響。
C. S1PのTJタンパク質への影響

図2. S1Pのペリサイトへの影響



A~D. S1PおよびS1P受容体選択的アゴニストのTEERへの影響。Monolayer: 内皮細胞単層モデル。Co-culture: 内皮細胞とペリサイトの共培養モデル。E, F. S1PアゴニストのIL-6とCox-2 mRNA発現への影響

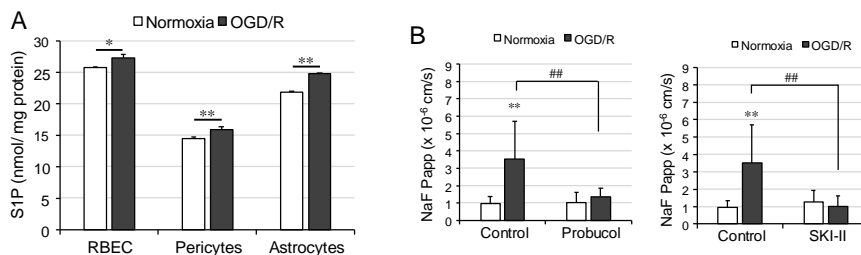
LPAの作用

内皮細胞にLPAを負荷するとバリアー機能の指標である経内皮電気抵抗が減少し、TJタンパクであるclaudin-5の発現の乱れが観察された。また、バリアー機能の低下はROCK阻害薬であるY27632により阻害された。また、内皮細胞にはLPA6受容体が発現しており、LPA6に対するsiRNAを用いた検討により、LPAのバリアー機能にはLPA6受容体が関与していることが判明した。以上の事からLPAはBBB機能を負に調節することが示唆された。

(2) In vitro BBB障害モデルを用いたS1Pの役割解明

In vitro BBBモデルを用いた検討により、虚血再灌流障害はS1Pの合成酵素(スフィンゴシンキナーゼ)や細胞外の輸送に関係するトランスポーター(ABCA1)の発現を上昇させ、内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトからの細胞外へのS1P放出量を増加させた。S1P合成酵素阻害薬(SKI-II)やABCA1トランスポーターを阻害する薬物(ProbucoI)により、BBBでの虚血再灌流障害が軽減することを明らかにした(図3)。

図3. 虚血再灌流障害におけるS1Pの役割

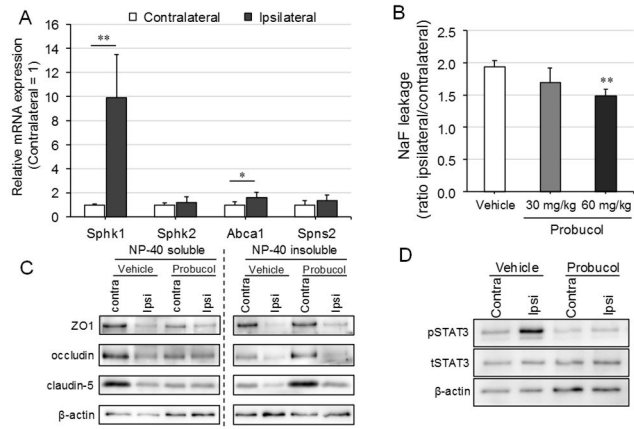


A. 虚血再灌流刺激によるBBB構成細胞からのS1P産生。B. 虚血再灌流障害による透過性亢進に対するS1Pシグナル抑制作用を持つProbucoIとSKI-IIの作用

(3) In vivo 脳虚血モデルを用いたS1Pの役割解明

次に、BBB保護効果のあったProbucoIの作用を、マウス中大脳動脈閉塞モデル(MCAOモデル)を用いて検討した。MCAOモデルではBBBの透過性が上昇したが、ProbucoIの投与によりBBBの透過性亢進が改善し、脳梗塞領域の減少が観察された。更に、BBBの透過性を調節する分子であるタイトジャンクション(TJ)タンパク質の発現を検討したところ、ProbucoIは障害により低下するTJタンパク質の発現を改善させた。ProbucoIはin vitroだけでなくin vivoでも虚血再灌流によるBBB機能障害を改善する働きがあることを確認した。また、ProbucoIの作用の一部に、STAT3シグナルが関与することを見出した(図4)。

図4. MCAOモデルにおけるProbuco1の作用



A. MCAOモデルにおけるS1P関連 mRNAの変化。 B. MCAOモデルにおける透過性亢進に対するProbuco1の作用。 C. Probuco1のTJタンパク質への効果。 D. Probuco1のSTAT3シグナルへの影響。 Contra: 非梗塞側、Ipsi: 梗塞側

以上の事から、虚血再灌流病態下において、BBB 構成細胞は S1P の産生を亢進させ BBB 機能を低下させること、また、SKI-II や Probuco1 は脳血管障害における BBB の機能障害を改善させる働きがあることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakagawa S, Aruga J. | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in impaired blood-brain barrier function in ischemia-reperfusion injury | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Neurobiology | 6. 最初と最後の頁 1594 ~ 1606 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-019-01844-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Masago Kayo, Kihara Yasuyuki, Yanagida Keisuke, Hamano Fumie, Nakagawa Shinsuke, Niwa Masami, Shimizu Takao | 4. 巻 501 |
| 2. 論文標題 Lysophosphatidic acid receptor, LPA6, regulates endothelial blood-brain barrier function: Implication for hepatic encephalopathy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1048 ~ 1054 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.106 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔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 中川 慎介、有賀 純 |
| 2. 発表標題 脳虚血再灌流障害に対するプロブコールの保護作用とSphingosine-1-phosphateの関与 |
| 3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinsuke Nakagawa, Aruga Jun |
| 2. 発表標題 Roles of sphingosine 1-phosphate in blood-brain barrier using in vitro and in vivo ischemia-reperfusion injury model. |
| 3. 学会等名 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中川 慎介, 有賀 純 |
| 2. 発表標題 血液脳関門機能を調節するペリサイトへのスフィンゴシ-1-リン酸の作用 |
| 3. 学会等名 第92回薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoichi Morofuji, Takashi Fujimoto, Shinsuke Nakagawa, Kenta Ujifuku, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Takeo Anda, Takayuki Matsuo |
| 2. 発表標題 In vitro analysis to evaluate brain metastatic potential of cancer cells from human surgical specimens -Preliminary report-. |
| 3. 学会等名 The 20th international symposium on "Signaling in the Blood-Brain Barriers" (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takashi Fujimoto, Shuji Fukuda, Shinsuke Nakagawa, Rie Tatsumi, Yoichi Morofuji, Tomonori Takeshita, Kentaro Hayashi, Kunihiko Tanaka, Takayuki Matsuo, Masami Niwa |
| 2. 発表標題 In vitro analysis of drugs that improve hyperglycemia-induced blood-brain barrier dysfunction- Analysis of BBB protective drugs against hyperglycemia induced damage |
| 3. 学会等名 The 20th international symposium on "Signaling in the Blood-Brain Barriers" (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医科薬理学分野
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/index.html>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|