

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16275

研究課題名(和文) Neurovascular Unitに着目した血管内皮細胞障害動的評価系の構築

研究課題名(英文) Construction of vascular endothelial cell injury dynamic evaluation system focusing on Neurovascular Unit.

研究代表者

宮崎 恭平 (Miyazaki, Kyohei)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70769497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス性急性脳症はウイルス感染後に急激な意識障害やけいれんを伴って発症する神経予後の不良な疾患である。その主病態は炎症性サイトカインの上昇に伴い、血液脳関門が破壊され、血管透過性亢進が亢進することによる非炎症性の脳浮腫であると考えられている。本研究では、脳血管内皮細胞とペリサイトを用いた3次元細胞培養系を用い、細胞リアルタイムモニタリングシステムによる血管透過性の動的評価系を確立した。本研究により急性脳症における血管内皮細胞障害を細胞レベルで再現し、動的に評価することが可能となった。依然として不明な点が多い急性脳症の病態解明や新たな治療戦略の検討及び治療標的の探索につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス性急性脳症は主に乳幼児のウイルス感染後に急激な意識障害やけいれんを伴って発症する神経予後の不良な疾患である。その主病態は炎症性サイトカインの上昇に伴い、血液脳関門が破壊され、血管透過性亢進が亢進することによる非炎症性の脳浮腫であると考えられているが、病態の詳細な機序は不明な点が多い。本研究により、急性脳症の病態解明や新たな治療戦略の検討、及び治療標的の探索が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Virus-associated acute encephalopathy is a disease with a poor neurological prognosis that develops with a sudden disturbance of consciousness and convulsions after viral infection. It has been described that its main pathological condition is non-inflammatory cerebral edema due to destruction of the blood-brain barrier and the increased vascular permeability with the increase of inflammatory cytokines. In this study, we established a dynamic evaluation system of vascular permeability by a real-time cell monitoring system using a three-dimensional cell culture system consisting of cerebral vascular endothelial cells and pericytes. It has become possible to reproduce vascular endothelial cell damage in acute encephalopathy at the cellular level and evaluate it dynamically. This evaluation system is useful for elucidating the pathophysiology of acute encephalopathy, examining new therapeutic strategies, and searching for therapeutic targets.

研究分野：小児科学

キーワード：血管内皮細胞 急性ウイルス性脳症 血管透過性 タイトジャンクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス性急性脳症は、主に乳幼児でヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスなどのウイルス感染後に急激な意識障害やけいれんを伴って発症する。その主病態は炎症性サイトカイン上昇による脳血管内皮細胞における血管透過性亢進状態からくる脳浮腫と考えられている。本症の細胞モデルや動物モデルはまだ確立されておらず、急性脳症の病態として不明な点が多い。本研究により急性脳症の病態解明、新たな治療戦略の検討および治療標的の探索をすることが可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究ではグリリア細胞と脳血管内皮細胞を用いた 3 次元細胞培養系を用い、細胞リアルタイムモニタリングシステムを用いた血管内皮細胞障害モデルの動的評価系を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【3次元細胞培養系】

トランスウェルインサートの上面と下面の両側に 1 型コラーゲンをコーティングする。

トランスウェルインサートを反転し、メンブレンの下側に周皮細胞を単層に培養する。

トランスウェルの上側に初代培養ヒト由来脳血管内皮細胞を単層に培養する。

### 【血管透過性評価系】

#### 経内皮細胞電気抵抗測定

3 次元培養系を細胞リアルタイムモニタリングシステム (cellZscope®) を用いて、経内皮細胞電気抵抗を連続的に測定することにより経時的な血管透過性変化を電気生理学的に評価する。

#### 溶質透過性試験

蛍光色素である FITC を標識した分子量 70kDa のデキストランをインサートの上側 (血管内腔側を想定) に、FITC 非標識のデキストランをインサートの下側 (血管の基底膜側を想定) に同濃度になるように添加し一定時間静置する。下側の培地中に漏出した FITC の蛍光強度を測定する。これにより、血管透過性を機能的に評価する。

#### タイトジャンクション評価

タイトジャンクションタンパクである claudin-5 とタイトジャンクション裏打ち蛋白の ZO-1、血管内皮細胞接着因子である VE カドヘリンについて蛍光免疫染色法で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察することにより、血管透過性を制御するタイトジャンクションとその関連蛋白を評価することで血管透過性と関連する分子について組織学的に評価する。又、ウェスタンブロット法と PCR 法を用いて、タイトジャンクションタンパクとその mRNA の発現について分子生物学的に評価する。

### 【血管内皮細胞障害モデル】

・上記細胞培養系に炎症性サイトカインである TNF を添加し、血管透過性変化を観察する。

## 4. 研究成果

TNF 濃度依存性に、経内皮細胞電気抵抗は低下した。溶質透過性試験においても同様にデキストランの透過性亢進が認められた。さらに免疫染色ではタイトジャンクションタンパクであるクローディン 5 の発現低下を認めた。加えて血管透過性亢進状態から回復するまでの時間も TNF 濃度依存性であった。以上より、血管内皮細胞障害状態における血管透過性状態を電気生理学的に機能的に組織学的に評価できる系を確立することができた。

本研究により、血管透過性に関わるタンパクの評価も可能となり、急性脳症の病態解明や新たな治療法開発、及び治療標的の探索につながるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Maeda Hajime
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 Society (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
--	---------------------------	-----------------------	----