

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16433

研究課題名（和文）エクソソームが駆動する慢性閉塞性肺疾患の血液脳関門病変と薬剤中枢性副作用

研究課題名（英文）Decreased expression of OATP2a1 in porcine pancreas elastase-induced COPD mouse model.

研究代表者

松本 純一（Matsumoto, Junichi）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10550064

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：COPD患者は、循環器疾患、不安や抑うつ、認知機能障害など様々な併存症を併発する。血液脳関門(BBB)は中枢神経系の恒常性を維持するための選択的物質透過を行う脳のバリア構造であり、BBB障害は不安や抑うつ、認知機能障害など様々な脳機能障害と密接に関わっている。PPE誘発COPDモデルマウスの脳におけるトランスポーターおよび密着結合関連タンパク質のmRNA発現量を定量した結果、OATP2a1発現量がCOPDモデルマウスで有意に減少していた。本研究では、COPD病態下で脳のOATP2a1発現低下が脳の機能にどのような影響を及ぼすかは不明であり、今後の検討課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPD患者では、不安・抑うつなど情動障害や認知機能低下が併発する。血液脳関門は循環血液と脳実質を隔てる「障壁」として機能するだけでなく、正常な脳機能維持に必要な物質輸送も担っている。本研究では、COPDモデルの脳トランスポーター発現量においてOATP2a1が減少していた。OATP2a1はプロスタグランジン（PG）の取込み輸送体であるため、COPD病態下において、脳内PGクリアランスが異常化する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) frequently coexists with comorbidities such as cardiovascular disease, anxiety and depression, and cognitive dysfunction. The Blood-brain barrier (BBB) is a highly selective semipermeable barrier structure that maintains the homeostasis in the central nervous system. BBB impairments are related to various dysfunction including anxiety, depression and cognitive dysfunction in the brain disorders. In this study, we quantified the mRNA expression of SLC transporters, ABC transporters and tight junction-related proteins in porcine pancreas elastase (PPE)-inhaled COPD model mouse. The mRNA expression of OATPs in PPE-inhaled mice is significantly decreased compared with PBS-inhaled mice. Although we directly indicated the decrease of OATPs in the brain contributes to brain dysfunctions in our model mouse, the alteration of transporters affects molecular trafficking across the BBB, leading to brain dysfunction in COPD pathogenesis.

研究分野：薬理学

キーワード：血液脳関門 COPD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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、肺の閉塞性換気障害が生じる難治性疾患である。COPD 患者では、有害微粒子の曝露が肺マクロファージ活性化を起点とした肺炎症を惹起し、持続的な肺炎症が慢性気道の狭窄や肺気腫の形成につながる。さらに、COPD の慢性期においては、炎症症状が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性症状も併発する。COPD が脳神経活動の変調要因となることは多くの疫学研究が示唆しているが、COPD における脳機能障害の発症機構は不明なままであった。

血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) は循環血液と脳実質を隔てる「障壁」であり、血液中物質の脳移行性を制御し、中枢神経系の恒常性維持に寄与する。BBB の実体は、脳血管内皮細胞であり、脳血管内皮細胞に発現する様々なトランスポーター (輸送担体) や密着結合 (tight junction : TJ) 関連タンパク質が末梢血液内から脳実質、あるいはその逆方向への物質移行の制御の要となっている。アルツハイマー病や脳卒中などの中枢性疾患だけでなく糖尿病や高血圧など末梢性疾患において、脳の輸送担体および TJ 関連タンパク質の発現量や活性の変動は報告されている。病態下における BBB 機能変容は血中生理活性物質の脳内輸送低下や血中有害物質の脳内移行性増大、脳内代謝物の血中排出低下など、異常な物質輸送およびクリアランスを引き起こし中枢神経機能変調につながる。Takata らは 2015 年に porcine pancreas elastase (PPE) 誘発 COPD モデルマウスの血液脳関門のバリア機能が低下していることを報告し、BBB 機能障害が COPD 患者における情動障害や認知機能障害などの要因となりうる可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究は、COPD 病態下における中枢神経機能の変調の機序について BBB の関連性を明らかにすべく、PPE 誘発肺気腫モデルマウスにおける脳のトランスポーターおよび TJ 関連蛋白質の遺伝子発現量の変動について検討を行った。

3. 研究の方法

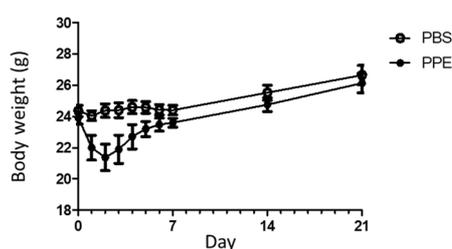
(1) Porcine pancreas elastase (PPE) 誘発 COPD モデルマウスの作製と評価：イソフルラン麻酔下で 8 週齢のマウスを体位が 45 ~ 65 度の仰臥位になるように固定台に保持した後、MicroSprayer を気管支に挿入して 2 Unit) の PPE 2units を気管支内に噴霧した。対照群には同量の PBS を気管支内に噴霧した。PPE 投与後に経時的に体重測定を行い、PPE3 週間後にモデルマウスから肺および全脳を採取した。採取した肺組織から凍結切片を作成し、HE 染色により染色した。肺組織の顕微鏡画像を撮影し、平均肺胞径 (Mean Liner Intercept: MLI) を算出した。

(2) RT-PCR 解析：回収した全脳からセパゾールを用いて RNA 抽出を行った。抽出した RNA を VILO cDNA Synthesis Kit を用いて逆転写し、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix を用いて RT-PCR を行った。脳の物質輸送およびバリア機能の保持に重要な役割と果たす有機アニオントランスポーター (Slco1b2, Slco2a1, Slco4c1, Slc22a6, Slc22a7, Slc22a8)、有機カチオントランスポーター (Slc22a1, Slc22a2, Slc22a3, Slc22a4, Slc22a5)、ペプチドトランスポーター (Slc15a1, Slc15a2, Slc15a4)、グルコーストランスポーター (Slc2a1)、アミノ酸トランスポーター (Slc7a5)、ABC トランスポーター (Abcb1a, Abcg2) および TJs 関連蛋白質 (Cldn-5, Tjp1, Oc1n) の遺伝子発現量を定量した。

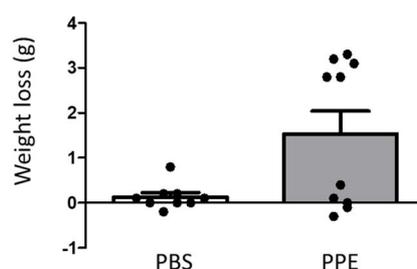
4. 研究成果

(1) PPE 誘発 COPD モデルマウスの作製と評価：PPE の投与初日から 3 週目までのマウスの体重推移を図 1A に示した。PBS 群と比べ、PPE 投与群では投与 1 日後に、平均して約 2g の体重減少が認められた。また、PPE 投与群は投与 1 日後において、体重が 2g 以上減少した個体と体重が変動しない個体の 2 群に分かれた (図 1B)。PPE 投与群における PPE 投与 1 日後の体重減少と平均肺胞径の相関関係を求めたところ、両者には強い正の相関が認められた ($R^2=0.7957$) (図 1C)。そこで今回、PPE 投与後に著しい体重減少が見られ肺胞径が拡大したマウス群の「responder 群」と体重変動がなく肺胞径も拡大しなかったマウス群の「non-responder 群」に PPE 投与群を再分類し、「responder 群」を PPE 誘発 COPD モデルマウスと定義して次の実験を行った。

A



B



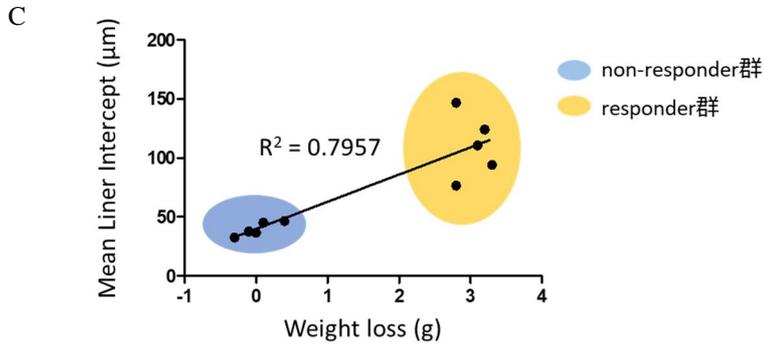
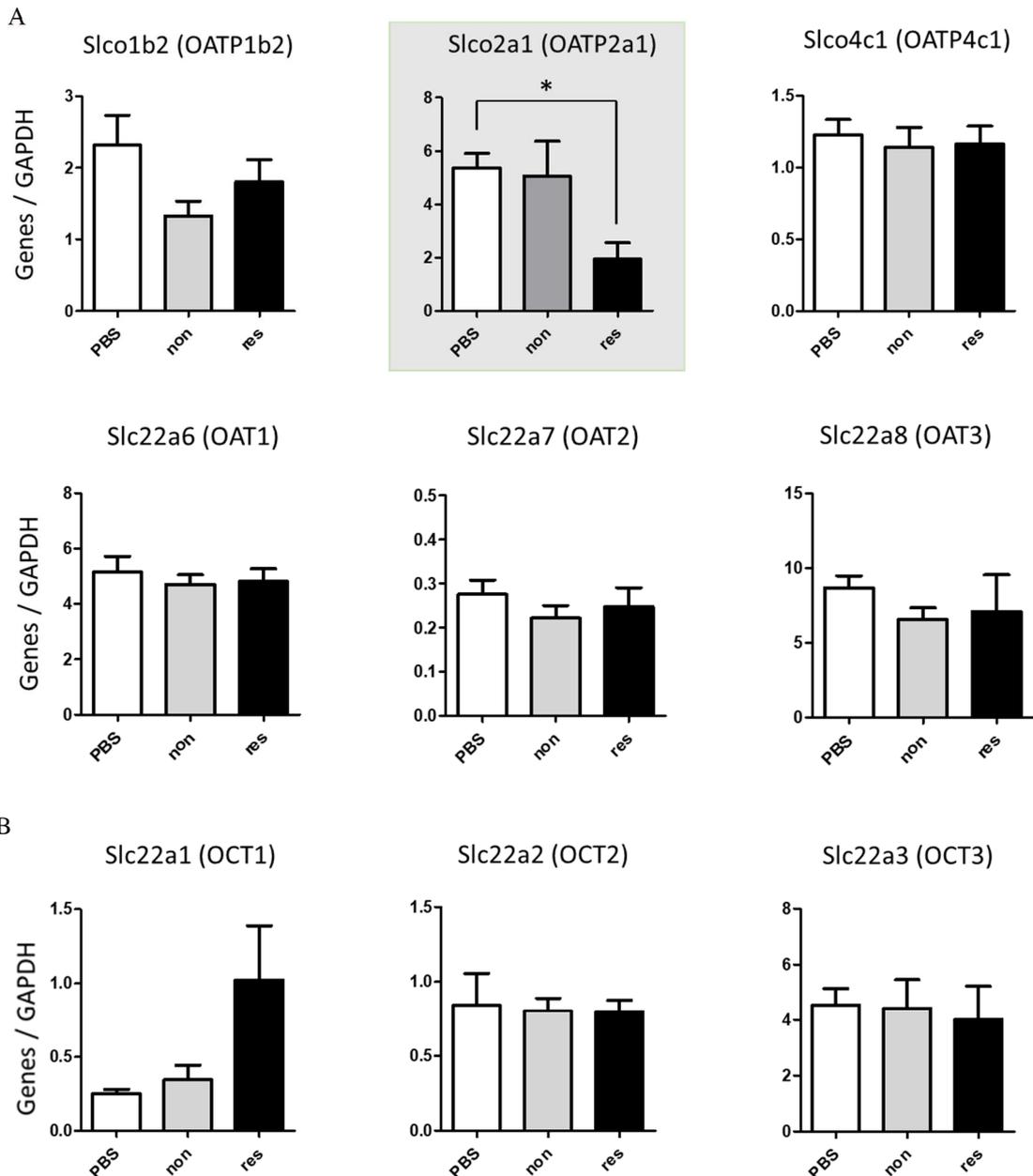
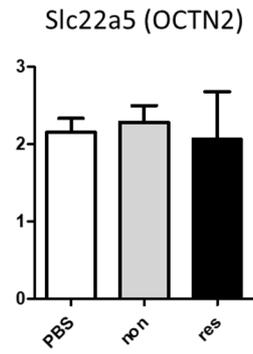
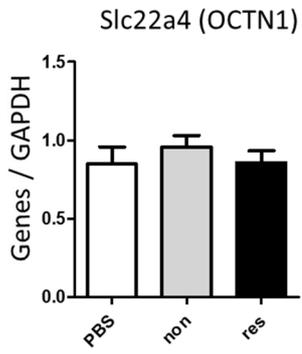


図1 体重変動と平均肺胞径による PPE 誘発肺気腫モデルマウスの評価
(A) PPE 誘発 COPD モデルマウスの体重推移
(B) PBS および PPE 投与 1 日後のマウスの体重減少量
(C) PPE 投与 1 日後の体重減少と投与 21 日後の平均肺胞径の相関性

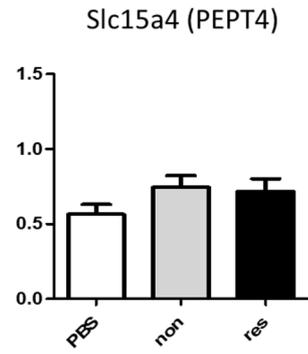
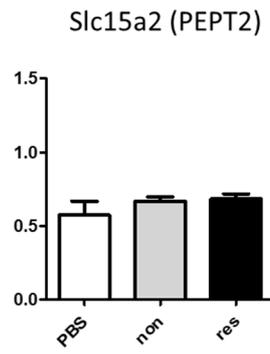
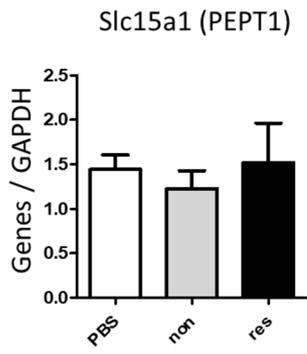
(2) 脳トランスポーターおよび密着結合関連蛋白質の遺伝子発現量の変動

脳トランスポーターおよび密着結合関連蛋白質の遺伝子発現量の変動を図 2 に示した。脳に発現する有機アニオントランスポーターのうち、プロスタグランジン (PG) 類の取り込みトランスポーターである Slco2a1 (OATP2a1) の遺伝子発現量のみ PBS 群と比較して responder 群 (PPE 誘発 COPD モデルマウス) で有意に減少した (図 2A)。

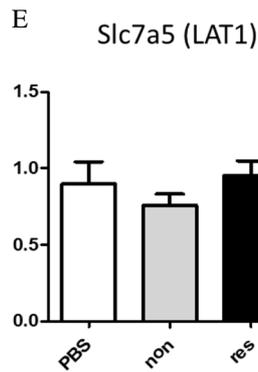
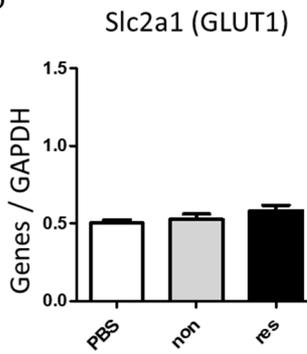




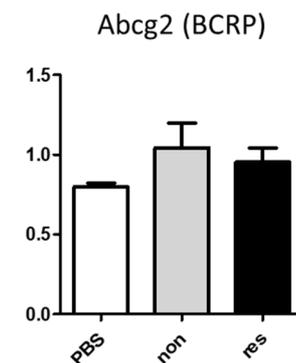
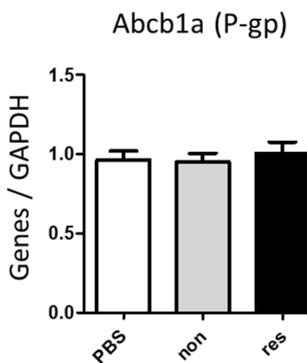
C



D



F



G

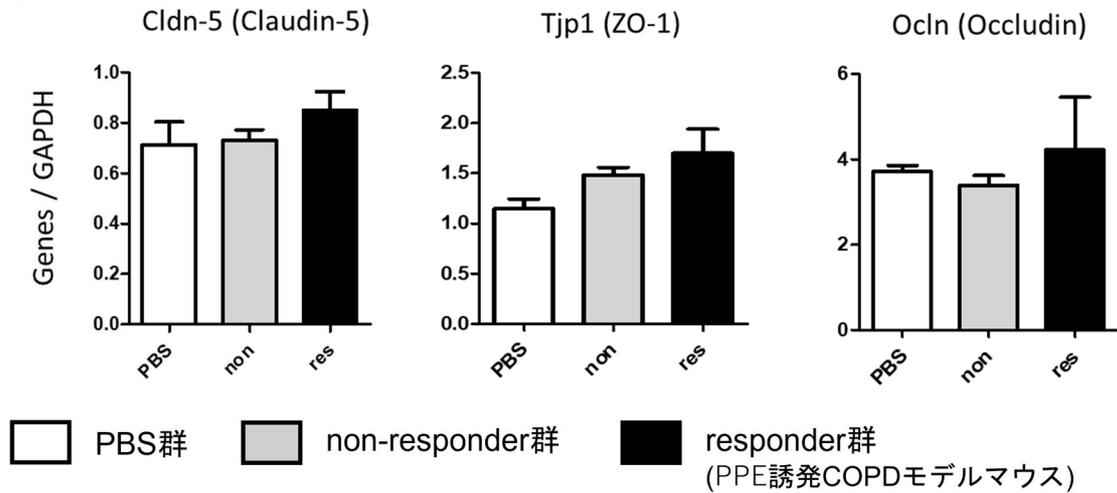


図2 脳トランスポーターおよび密着結合関連蛋白質の遺伝子発現量の変動 有機アニオントランスポーター(A)、有機カチオントランスポーター(B)、ペプチドトランスポーター(C)、グルコーストランスポーター(D)、アミノ酸トランスポーター(E)、ABCトランスポーター(F)、密着結合関連蛋白質(G)の遺伝子発現量の変動

本研究では、PPE 誘発 COPD モデルマウスにおいてプロスタグランジン(PG)類の取り込みトランスポーターである Slco2a1 (OATP2a1) の遺伝子発現量が減少することを明らかにした。脳内において、OATP2a1 は脳微小血管だけでなく、皮質、小脳、海馬、脳幹においても発現が認められている。また、PG は、疼痛知覚、体温調節、炎症反応、睡眠/覚醒サイクル、抑うつなど多くの脳活動を調節する脂質メディエーターであり、アルツハイマー病や脳卒中、脳炎症、神経変性疾患の発症の重要な因子となることが報告されている。PPE 誘発 COPD モデルマウスにおける脳における PG の産生量については明らかでないが、COPD 病態下では OATP2a1 の発現量減少に伴う PG 類のクリアランス異常が惹起され、中枢神経機能の変調につながる可能性が推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Aono K, Matsumoto J, Nakagawa S, Matsumoto T, Koga M, Migita K, Tominaga K, Sakai Y, Yamauchi A. | 4. 巻 558 |
| 2. 論文標題 Testosterone deficiency promotes the development of pulmonary emphysema in orchietomized mice exposed to elastase | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 94-101 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.051. | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|