

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16612

研究課題名（和文）細胞老化を切り口とする血液脳関門の加齢に伴う機能低下機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of age-related functional decline of BBB in terms of cellular senescence

研究代表者

松平 竜之（Matsudaira, Tatsuyuki）

大阪大学・微生物病研究所・特別研究員（CPD）

研究者番号：20812267

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）：加齢に伴う血液脳関門（BBB）の機能低下は脳血管疾患だけでなく神経変性疾患の要因にもなりうるが、BBBの機能低下の詳細なメカニズムは十分に明らかにされていない。本研究課題では、BBBの機能低下の原因として血管内皮細胞の細胞老化現象に着目し解析を進めた。脳血管内皮細胞の遺伝子発現等について若齢マウスと高齢マウスとを比較したが、細胞老化の観点では両者に大きな違いが見られなかった。一方で高齢マウスの脳血管内皮細胞では炎症性が亢進しており、本研究では培養細胞レベルで炎症を抑制しうる血管内皮細胞特異的な遺伝子の候補を同定することができた。今後はマウスの個体レベルでも炎症を制御しうるのか否かを調べていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液脳関門（BBB）は神経細胞への栄養素の選別、毒素の遮断、変性タンパク質蓄積の防止などを担うが、これらの機能が加齢に伴い低下することが報告されている。BBBの機能低下の要因の一つがBBB構成細胞の細胞老化であることが明らかになれば、他の組織で理解が進んでいる細胞老化の研究をこの研究領域に生かせるだけでなく、老化細胞選択的な除去薬の適応も選択肢となり、加齢に伴う脳機能低下や神経変性疾患防止の新たなアプローチを見出すことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Age-related blood-brain barrier (BBB) dysfunction can contribute to neurodegenerative diseases as well as cerebrovascular diseases, but the detailed mechanism of BBB dysfunction has not been fully elucidated. In this study, we focused on the cellular senescence of vascular endothelial cells as a cause of BBB functional decline. We compared the gene expression of cerebrovascular endothelial cells of young and old mice, but no significant difference was observed between them from the viewpoint of cellular senescence. However, we found that inflammatory properties are enhanced in cerebral vascular endothelial cells of aged mice and identified vascular endothelial cell-specific gene candidates that can suppress inflammation. We will investigate in more detail whether they can suppress inflammation of vascular endothelial cells at the mouse level.

研究分野：細胞老化

キーワード：細胞老化 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

脳出血や脳梗塞などの脳血管疾患は日本人の主要な死因であるだけでなく、運動麻痺や認知症の発症をもたらし、要介護者を生み出す大きな要因となっている。これらの疾患を防止することは、医療費や介護費用の削減に繋がるのみならず、高齢者が身体的・精神的に活力ある生活を送るうえで肝要である。脳の血管のうち、毛細血管および周囲の細動静脈はまとめて脳微小血管と呼ばれており、これらの領域では血液脳関門 (BBB) の働きによって神経細胞への栄養素の選別や毒素の遮断が厳密に行われている。近年では、脳実質における変性タンパク質の蓄積を防止する役割も明らかとなり、BBB は脳の恒常性維持において多彩な機能を持つことが示唆されている。これまでにヒトやマウスにおいて、加齢に伴い BBB の血管透過性が上昇すること (Montagne et al. *Neuron* 2015, Elahy et al. *Immun Ageing* 2015)、BBB における血管透過性の上昇や老廃物の除去能の低下によって、脳における炎症や神経変性疾患などが亢進することが報告されている (Sweeney et al. *Nat Rev Neurol* 2018)。以上より、脳血管疾患を防止するうえで BBB の正常な機能を維持することは非常に重要である。

またこれまでの研究から、加齢に伴って BBB を構成する細胞群 (血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイト、ミクログリアなど) に量的・質的な変化が現れることが報告されている。しかしながら、「脳血管疾患やそれに伴う認知症」と、「加齢に伴う BBB 構成細胞の変化」との関係は未だ相関関係しか示されておらず、因果関係がはっきりしていない。また、加齢による BBB 構成細胞の機能低下の過程において、どの細胞種が重要な役割を果たすのか、どのような細胞間のクロストークが存在するのかについてもほとんど解明されていない。

これまでに当研究室では、細胞が修復不可能な DNA 損傷を受けた際に増殖を不可逆的に停止する現象「細胞老化」に着目し、研究を進めてきた (Ohtani et al. *Nature* 2001, Takahashi et al. *Nat Cell Biol* 2006)。加齢に伴い老化細胞が蓄積すること (Yamakoshi et al. *JCB* 2009)、老化細胞が分泌する IL-6 や IL-1 β などの炎症性サイトカインが発がんを促すことを明らかにしている (Yoshimoto et al. *Nature* 2013)。これらのことから、加齢に伴う老化細胞の蓄積が、各種臓器の機能低下の一因となっていることが示唆される。

2. 研究の目的

上記のことから申請者は、脳においても何らかの細胞で細胞老化が生じており、それが BBB の機能低下に影響を与えているのではないかと考えた。本研究課題では、BBB の機能低下のメカニズムを、特に脳血管内皮細胞の細胞老化現象の観点から明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1-a) 若齢マウスと高齢マウスの脳の血管内皮細胞の初代培養

若齢マウスの脳を摘出しコラゲナーゼ処理などを行った後、CD45⁻、CD31⁺の脳血管内皮細胞をソーティングし、初代培養および継代培養を行った。継代は約 10 日おきに行った。また細胞のライセートを回収し、細胞周期抑制遺伝子 p16 の定量 PCR を行った。

(1-b) 血管内皮細胞特異的に p16 を過剰発現するマウスの作製およびその解析

Tamoxifen 依存的に human p16 を過剰発現する LSL-FLAG-hp16-IRES-DTR-EGFP マウス (p16-Tg マウス、当研究室で作製) と血管内皮細胞特異的に Cre-recombinase を発現する VECD-CreERT2 マウス (慶應義塾大学、久保田義頭教授より譲渡) をかけ合わせて繁殖し、血管内皮細胞の形状や表現型を解析した。

(1-c) 若齢マウスと高齢マウスの脳の血管内皮細胞の RNA-seq 解析

若齢マウス (2 ヶ月齢) および高齢マウス (30 ヶ月齢) それぞれ 4 匹ずつより脳血管内皮細胞をソーティングし、RNA-seq 解析を行った。

(1-d) bEnd.3 細胞におけるノックダウン実験

高齢マウスの脳血管内皮細胞において若齢マウスのもものと比べて発現低下した遺伝子群に着目し、マウス脳血管内皮細胞培養株である bEnd.3 細胞を用いて siRNA によるノックダウンを行い、炎症性サイトカイン等の発現を定量 PCR で解析した。

4. 研究成果

(1-a) 若齢マウスと高齢マウスの脳の血管内皮細胞の初代培養

若齢マウスの脳を摘出しコラゲナーゼ処理などを行った後、CD45⁻、CD31⁺の脳血管内皮細胞をソーティングし、初代培養および継代培養を行った。その結果、数回の継代によって、細胞老化の指標の一つである細胞周期抑制遺伝子 p16 の発現上昇が認められた【図 1】。

(1-b) 血管内皮細胞特異的に p16 を過剰発現するマウスの作製およびその解析

血管内皮細胞特異的に p16 を発現するマウスを作製し解析を行った。その結果、血管内皮細胞において p16 や DTR-EGFP の発現は確認できたものの、血管内皮細胞の形状や表現型 (寿命など)

には顕著な変化が認められなかった。

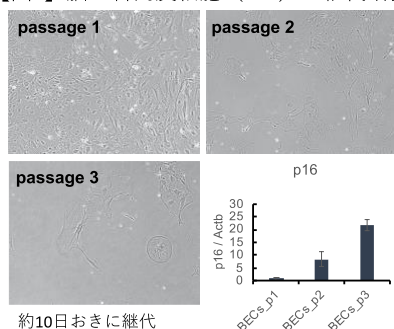
(1-c) 若齢マウス (2ヶ月齢) および高齢マウス (30ヶ月齢) の脳血管内皮細胞をソーティングし、RNA-seq解析を行った。その結果、高齢マウスの脳血管内皮細胞においてp16やp21のような細胞周期抑制遺伝子の発現上昇は認められなかった【図2】。1-bの結果と合わせて考えると、脳の血管内皮細胞はin vitroにおいては継代時の酸化ストレス等によって細胞老化が生じるものの、in vivoにおいては細胞周期抑制遺伝子の発現上昇を指標とするような細胞老化は生じていないことが示唆された。次に、若齢マウスと比べて高齢マウスの脳血管内皮細胞で有意に発現上昇した遺伝子群を解析したところ、KEGG pathwayにおいてTNF signaling pathway (p=0.0013)

【図3】、Biological processにおいてType I interferon signaling pathway (p=0.0089) が変化していることが明らかになった。具体的には炎症性のサイトカイン (Cxcl10, Ccl15, TNF) や、免疫細胞との接着に関与する分子 (SELE, ICAM1, VCAM1) の発現上昇が認められた。以上のことから、脳の血管内皮細胞では加齢に伴い炎症性が亢進することが示唆された。

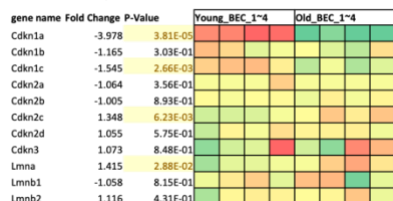
(1-d) bEnd.3細胞におけるノックダウン実験

さらに高齢マウスの脳血管内皮細胞において若齢マウスのものと比べて発現低下した遺伝子群【図4】に着目し、特に血管内皮特異的な遺伝子のいくつかについてマウス脳血管内皮細胞培養株であるbEnd.3細胞を用いてsiRNAによるノックダウン実験を行った。その結果、遺伝子Xのノックダウン時に、Cxcl10などの炎症性サイトカインの発現上昇が認められた【図5】。これらの炎症性サイトカイン等は、高齢マウスの血管内皮細胞でも発現上昇することが認められている。今後はこの遺伝子Xが炎症を抑制する分子メカニズムを明らかにするとともに、加齢に伴いどのように発現低下するのかを調べる。さらに、遺伝子Xを血管内皮細胞特異的に過剰発現するマウス、あるいは若齢時にノックアウトできるマウスを作製し、脳血管における炎症が抑制あるいは亢進されるか否か、血液脳関門の破綻が抑制あるいは促進されるか否かを解析していく。

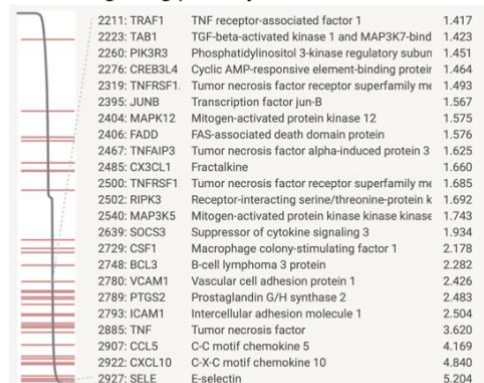
【図1】 脳血管内皮細胞 (BEC) の継代培養



【図2】 RNA-seq in BEC, 細胞周期抑制遺伝子およびLamin



【図3】 高齢マウスのBECで発現上昇していた分子群 (例: TNF signaling pathway)

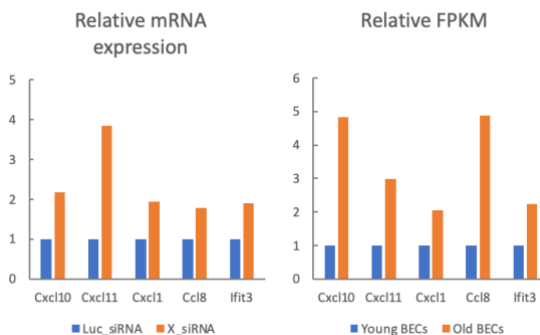


STRINGによる解析

【図4】 高齢マウスのBECで発現低下した遺伝子群

gene name	Fold Change	P-Value	Young FPKM	Old FPKM
A330076C08Rik	-11.267	1.35E-04	1.524	0.132
Igfb1	-9.933	1.97E-03	2.949	0.371
Fam124b	-8.427	1.44E-03	1.564	0.183
Ttpa	-8.023	2.41E-04	1.804	0.212
Igfb2	-7.779	2.72E-04	1.285	0.172
G6pc	-7.516	7.63E-04	1.341	0.193
Dio2	-7.289	1.14E-04	3.623	0.516
Olf287	-7.210	1.02E-03	1.913	0.297
Cyp4f14	-6.802	8.95E-06	3.264	0.478
Pdzph1	-6.774	8.12E-05	0.982	0.148
Omg	-6.761	2.20E-03	5.491	0.961
Pantr1	-6.712	7.26E-05	32.093	4.988
Itgb8	-6.708	7.21E-05	0.813	0.123
Ppp1r3g	-6.702	1.07E-04	3.245	0.494
Gm17750	-6.526	6.77E-04	8.371	1.244
Ccnjl	-6.502	1.57E-03	1.492	0.259
Rfx4	-6.492	3.56E-04	1.916	0.307
A330048O09Rik	-6.416	7.04E-03	1.923	0.311
Scg5	-6.408	1.04E-04	3.899	0.597
Rgs20	-6.271	1.62E-06	4.310	0.682
Plp1	-6.177	1.12E-03	11.094	1.636
Fndc5	-6.032	1.04E-03	3.167	0.563
Gabra4	-6.013	2.59E-03	1.060	0.181
Ntsr2	-5.944	1.97E-08	105.827	17.790
Aqp4	-5.911	5.42E-05	9.269	1.612

【図5】 遺伝子XのノックダウンでbEnd.3細胞の炎症性が亢進する



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 0件）

1. 発表者名 松平竜之, 原英二
2. 発表標題 脳血管内皮細胞の老化の研究
3. 学会等名 第5回 血管生物若手研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------