

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591228

研究課題名 (和文) ウイルス感染に伴う脳症発症時に起こる血液脳関門破綻のメカニズムの解明

研究課題名 (英文) Mechanism of breakdown of blood-brain barrier accompanied with viral encephalopathy

研究代表者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70212462

研究成果の概要 (和文)：

申請者らは、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトを安定して供給するために、これら細胞の初代培養細胞に遺伝子導入し、長期培養可能な細胞株を得ることを試みた。マウスの脳から脳毛細血管内皮細胞を初代培養し、SV40T 抗原 cDNA を含むベクターを遺伝子導入し、3 個のクローンを得た。一方、ラット胎児 (E18) の大脳皮質から初代培養し、同じ手法にて 10 個のクローンを得た。これらの 13 個のクローンは、全てテトラサイクリンにて遺伝子発現がコントロール出来る Tet-on システムのベクターを用いたが、テトラサイクリンを除去した場合に SV40T 抗原の発現低下が観察されなかったため、これらのクローンに、再度、Tet repressor を発現するベクターを遺伝子導入した。再び細胞株を選択し、ウエスタンブロットで確認したところ、テトラサイクリンを除去した場合に SV40T 抗原の発現が消失するクローンを得ることが出来た。SV40T 抗原の ON/OFF により、細胞株の性質 (脳毛細血管内皮細胞やアストロサイト特異的タンパクの発現など) が、どのように変化するか、RT-PCR およびウエスタンブロットにて確認を行なった。アストロサイトにおいて、GFAP の発現量を比較したところ、T 抗原の消失に伴い、発現上昇傾向が観察された。現在、これらの細胞株を用い、共培養系を用いた細胞の形質の変化の検討を行っており、血管内皮細胞株におけるタイトジャンクション構成蛋白の発現の変化を観察している。

研究成果の概要 (英文)：

We have tried to establish immortalized mouse brain endothelial cell lines and rat astrocytes cell line for the co-culture system of both cells. Primary cultured mouse brain endothelial cells were transfected with SV40 T-antigen expressing vector and selected by zeocin and blasticidin. Primary cultured rat astrocytes were transfected with same vectors and selected by some procedures. Three colonies from endothelial cells and 10 colonies from astrocytes were obtained, but in all of the immortalized cell lines, expression of SV40 T was not controlled by tetracycline. Thus Tet-repressor expressing vector was re-transfected to the cell lines and finally 3 astrocyte cell lines were obtained in which expression of SV40 T was controlled by tetracycline. Now we are investigating whether the expression of GFAP changes or not by on/off of SV40 T, and trying to establish co-culture system of endothelial cell lines and astrocyte cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：急性脳症、血液脳関門、アストロサイト、血管内皮細胞、サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスを始めとするウイルス感染症において急性脳症・脳炎を発症する機序として、直接のウイルスの中枢神経への侵入による発症のみならず、血中サイトカインの異常増加、いわゆる「サイトカインストーム」による発症が考えられている。これらサイトカインは血液脳関門の破綻を惹起し、引き続き脳実質内及び髄液中のサイトカイン濃度が上昇すると、ニューロンの興奮性を高めるとともに、その興奮性を制御するアストロサイトの機能にも異常を来し、異常行動、けいれん、重症化すると脳症を引き起こすことが推測される。この病態を考えると、病態の初期に起こる血液脳関門の破綻を食い止めることは脳症の発症予防に極めて重要と考える。これまでに、血液脳関門の厳密な物質透過性の制御は血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトとのクロストークによって形成されていると考えられているが、研究は主に血管内皮細胞のみの機能に注目したものが多く、血液脳関門を形成する細胞群を1つのユニットとしてとらえ、これら細胞間のクロストークという視点からの研究はほとんど行われてこなかった。

### 2. 研究の目的

血液脳関門において、アストロサイトからは足突起を介した細胞間連絡や液性因子による局所環境形成による刺激が血管内皮細胞に伝わり、一方、血管内皮細胞からもアストロサイトへ刺激が伝わって、血液脳関門の機能が維持されていると考えられている。そこで、申請者らは以前に確立した *in vitro* 血液脳関門モデルを用い、血管内皮細胞とアストロサイトの共培養状態にサイトカインの刺激を加え、その状態での細胞間クロストークの変化を捉えることで、血液脳関門の破綻のメカニズムを解明し、脳症発症の病態把握の解明につなげたいと考えた。

### 3. 研究の方法

血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞は、Tight junction の形成、p-glycoprotein の発現、アルカリフォスファターゼの活性高値など、他の臓器の血管内皮細胞と異なる性質を有している。そのため、血液脳関門の研究には、脳毛細血管内皮細胞が必要である。申請者らは以前ウシより初代培養で得た脳毛細血管内皮細胞に SV40T 抗原を遺伝子導入し、

不死化した細胞株を樹立した(Sobue, et al. Neurosci. Res. 35, 155-164, 1999)。しかし、この細胞株はウシ由来であるためマイクロアレイを始めとする遺伝子解析に不都合が生じた。そこで、本研究計画では、マウスの脳から脳毛細血管内皮細胞を培養し、実験に用いることとした。原則、無修飾の初代培養が望ましいが、安定した細胞供給の観点から SV40T を用いて不死化細胞の樹立を試みた。同時に、ラット胎児より培養したアストロサイトにも SV40T を導入し、不死化細胞の樹立を試みた。

### 4. 研究成果

マウスの脳から脳毛細血管内皮細胞を初代培養し、SV40T 抗原 cDNA を含むベクターを遺伝子導入し、抗生剤 (Zeocin, Blasticidin) にてセレクションを行い、3 個のクローンを得た。一方、ラット胎児 (E18) の大脳皮質からアストロサイトを初代培養し、脳毛細血管内皮細胞と同様に、SV40T 抗原 cDNA を含むベクターを遺伝子導入し、抗生剤にてセレクションを行い、10 個のクローンを得た。これらの 13 個のクローン作成において、テトラサイクリンにて遺伝子発現がコントロール出来る Tet-on システムのベクターを用いたが、テトラサイクリンを除去した時に、SV40T 抗原の発現低下が観察されなかったため、これらのクローンに、再度、Tet repressor を発現するベクターを遺伝子導入した。再び細胞株をセレクションし、ウエスタンブロットで確認したところ、テトラサイクリンを除去した場合に SV40T 抗原の発現が消失するクローンを得ることが出来た。

SV40T 抗原の ON/OFF により、細胞株の性質 (脳毛細血管内皮細胞やアストロサイト特異的タンパクの発現など) が、どのように変化するか、RT-PCR およびウエスタンブロットにて確認を行なった。アストロサイトにおいては、マーカータンパクである GFAP の発現量を RT-PCR 及びウエスタンブロットで比較したところ、T 抗原の消失に伴い、発現上昇傾向を観察したが、初代培養アストロサイトに比して GFAP の発現量は少なかった。現在、これらの細胞株を用い、共培養系を用いた細胞の形質の変化の検討を行っており、血管内皮細胞株におけるタイトジャンクション構成蛋白の発現の変化を観察している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Yamagami, T., Waguri-Nagaya, Y., Ikuta, K., Aoyama, M., Asai, K., Otsuka, T., FK506 inhibition of gliostatin/thymidine phosphorylase production induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatol Int* (2010) in press (査読有)
2. Nagahara, M., Waguri-Nagaya, Y., Yamagami, T., Aoyama, M., Tada, T., Inoue, K., Asai, K., Otsuka, T., TNF- $\alpha$ -induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA and RA. *Rheumatology* 49:5(2010)898-906 (査読有)
3. Aoyama, M., Kataoka, H., Kubota, E., Tada, T., Asai, K. Resistance to chemotherapeutic agents and promotion of transforming activity mediated by embryonic stem cell-expressed Ras (ERas) signal in neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 37:4(2010)1011-1016 (査読有)
4. Kubota, E., Kataoka, H., Aoyama, M., Mizoshita, T., Mori, Y., Shimura, T., Tanaka, M., Sasaki, M., Takahashi, S., Asai, K., Joh, T. Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer. *Am J Pathol* 177:2(2010)955-963 (査読有)
5. Sato, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asai, K., Shirai, T. Tranilast suppresses prostate cancer growth and osteoclast differentiation in vivo and in vitro. *Prostate* 70:3(2010) 229-238 (査読有)
6. Ohara, K., Aoyama, M., Fujita, M., Sobue, K., Asai, K. Prolonged exposure to ammonia increases extracellular glutamate in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 462:2(2009)109-112 (査読有)
7. Nakao, K., Aoyama, M., Fukuoka, H., Fujita, M., Miyazawa, K.,

Asai, K., Goto, S. IGF2 modulates the microenvironment for osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 378(2009)462-466 (査読有)

8. Sugiyama, Y., Mizuno, H., Hayashi, Y., Imamine, H., Ito, T., Kato, I., Yamamoto-Tomita, M., Aoyama, M., Asai, K. and Togari, H. Severity of virilization of external genitalia in Japanese patients with salt-wasting 21-hydroxylase deficiency. *Tohoku J Exp Med* 215:4(2008)341-348 (査読有)
9. Morishima, T., Aoyama, M., Iida, Y., Yamamoto, N., Hirate, H., Arima, H., Fujita, Y., Sasano, H., Tsuda, T., Katsuya, H., Asai, K. and Sobue, K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res* 61(2008)18-26 (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

1. Nan GAO, Tae-sum Kim, Mitsuko Suzuki, Makoto Kawaguchi, Cha-Gyum Jung, Kiyofumi Asai, Yutaka Miura. The ZHFX3/ATBF1 transcription factor transduces ATM signaling to regulate PDGF receptor beta and protect cerebellar neurons from oxidative stress. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会) 12. 7-10, 2010 神戸
2. 永谷祐子、山上貴也、生田憲史、青山峰芳、浅井清文、大塚隆信. 抗 TNF 阻害剤にて治療した関節リウマチ患者の血清グリオスタチン濃度の推移. 第 83 回日本整形外科学会学術総会 5. 27-30, 2010 東京
3. 生田憲史、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、浅井清文、大塚隆信. 抗 TNF 阻害剤を使用した関節リウマチ患者の血清グリオスタチン濃度の 12 カ月間の推移. 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会/第 18 回国際リウマチシンポジウム 4. 22-25, 2010 神戸
4. 高柳猛彦、箕輪堯久、秋吉瑠美子、

- 太田晴子、徐民恵、水落雄一郎、幸村英文、藤田義人、笹野寛、浅井清文、祖父江和哉. 敗血症における astrocyte での HIF (hypoxia inducible factor)-1 $\alpha$  の役割. 第 37 回日本集中治療医学会 3. 4-6, 2010 広島
5. 金泰善、川口誠、浅井清文、三浦裕. ATM の活性化シグナルは ZFH3 (ATBF1) の転写活性化を介して小脳ニューロンの生存に寄与する PDGFRB 発現誘導を誘導する (A signal link ATM with ZFH3 (ATBF1) induces PDGF Receptor beta for protein of cerebellar neurons.) . 第 32 回日本分子生物学会年会 12. 9-12, 2009 横浜
6. 青山峰芳、垣田博樹、加藤晋、戸苺創、浅井清文. ジクロフェナックナトリウムがアストロサイトの NO 産生に及ぼす影響 -インフルエンザ感染に伴う脳症悪化のメカニズム-. 第 14 回グリア研究会 11. 14, 2009 大阪
7. 長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、多田豊曠、浅井清文、大塚隆信. TNF- $\alpha$  は線維芽細胞様滑膜細胞においてアクアポリン 9 の発現を誘導する. 第 24 回日本整形科学会基礎学術集会 11. 5-6, 2009 横浜
8. 青山峰芳、垣田博樹、フセインモハメド、加藤晋、鈴木悟、伊藤哲也、戸苺創、浅井清文. ジクロフェナックがサイトカイン刺激によってアストロサイトから誘導される NO 産生を増強する -インフルエンザ脳症増悪メカニズムの解析-. 第 52 回日本神経化学会 (伊香保) 大会 6. 21-24, 2009 伊香保)
9. 垣田博樹、青山峰芳、加藤晋、鈴木悟、戸苺創、浅井清文. 炎症性サイトカインと COX 阻害剤がアストロサイトの NO<sub>x</sub> 産生に及ぼす影響. 第 112 回日本小児科学会学術集会 4. 17-19, 2009 奈良
10. 當銘一文、小林信彦、石井泉、田中悟、青山峰芳、浅井清文. 黒霊芝の神経成長因子産生及び神経突起伸展促進作用. 日本薬学会第 129 年会 3. 26-28, 2009 京都
11. McPherson C. A., Aoyama M., Grissom S. F., Gohlke J., Harry G. J. Differential inflammatory gene expression in young and middle aged mice during injury-induced hippocampal neurogenesis. The American Society for Neurochemistry 40th Annual Meeting, 3. 7-11, 2009, Charleston, SC, USA
12. 三浦裕、金泰善、鈴木光子、川口誠、鄭且均、浅井清文. P19 細胞の神経分化誘における転写調節因子 ATBF1 による細胞外マトリックス接着関連因子の発現調節. 第 31 回日本分子生物学会年会 (BMB2008) 12. 9-12, 2008 神戸
13. 長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、多田豊曠、浅井清文、大塚隆信. 関節リウマチ、変形性関節症の滑膜組織におけるアクアポリンの発現. 第 59 回名古屋市立大学医学会総会 12. 7, 2008 名古屋
14. Fujita, M., Ogasawara, O., Tanaka, M., Aoyama, M., Iwasato, T., Asai, K., Yamada, K., Itoharu, S. Analysis of a BAC transgenic mouse line in adulthood: distribution of genomic recombination by gfap-promotor-derived cre in the brain. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience' s 38th annual meeting, 11. 15-19, 2008 Washington, DC, U. S. A.
15. Aoyama, M., Kakita, H., Kato, S., Fujita, M., Sobue, K., Asai, K. Region-specific expression of a water nervous system. Neuroscience 2008, the Society for Neuroscience' s 38th annual meeting, 11. 15-19, 2008 Washington, DC, U. S. A.
16. 青山峰芳、垣田博樹、加藤晋、藤田政隆、祖父江和哉、浅井清文. アストロサイトの脳内部位特異性の解析. 第 13 回グリア研究会 11. 8, 2008 東京

17. 久保田英嗣、片岡洋望、佐々木誠人、小笠原尚高、志村貴也、溝下勤、平田慶和、浅井清文、城卓志. 新規 Ras 遺伝子、Eras の胃癌転移における役割 (Novel Eras plays crucial role for epithelial to mesenchymal transition and liver metastases in human gastric cancer). 第 67 回日本癌学会学術総会 10. 28-30, 2008 名古屋
18. 長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、浅井清文、多田豊曠、大塚隆信. 関節水症におけるアクアポリン発現の検討. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 10. 22-24, 2008 京都
19. 山上貴也、永谷祐子、長原正静、青山峰芳、浅井清文、大塚隆信. FK 506 はリウマチ由来線維芽細胞様滑膜細胞において gliostatin 産生を抑制する. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 10. 22-24, 2008 京都
20. 藤田政隆、間瀬光人、磯村健一、青山峰芳、浅井清文、山田和雄. カオリン水頭症モデルラットにおけるアクアポリン発現に関する検討. 日本脳神経外科学会第 67 回学術総会 10. 1-3, 2008 盛岡
21. 青山峰芳、垣田博樹、加藤晋、藤田政隆、祖父江和哉、浅井清文. アストロサイトの部位特異性に関わる分子の同定 (Identification of the molecules, which are responsible for astrological heterogeneity in the central nervous system). 第 51 回日本神経化学会大会 9. 11-13, 2008 富山
22. 祖父江和哉、森島徹朗、青山峰芳、高柳猛彦、浅井清文. 乳酸アシドーシスは水チャネル<アクアポリン>のアストロサイト細胞膜への集積を促進する (Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes) . 第31回日本神経科学大会 7. 9-11, 2008 東京
23. 藤田政隆、小笠原治、田中三佳、矢口邦雄、岩里琢治、浅井清文、山田和雄. GFAP 及び AQP4 プロモーターを用いた Cre トランスジェニ

ックマウスの解析 (Analysis of transgenic mice of Cre recombinase derived from GFAP or AQP4 promoter). 第 31 回日本神経科学大会 7. 9-11, 2008 東京

24. 長原正静、永谷祐子、山上貴也、青山峰芳、浅井清文、大塚隆信. 変形性関節症および関節リウマチの滑膜組織におけるアクアポリンの発現 (Expression of aquaporin in synovial tissue of osteoarthritis and rheumatoid arthritis). リウマチ学会 2008 (第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会) 4. 20-23, 2008 札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70212462

### (2) 研究分担者

青山 峰芳 (AOYAMA MINEYOSHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70363918