

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09394

研究課題名（和文）脳ペリサイトの機能変化による細胞間クロストーク異常と脳血管障害の進展

研究課題名（英文）Aberrant crosstalk between BBB-composed cells and pericytes in the progression of cerebrovascular disease.

研究代表者

中川 慎介（Nakagawa, Shinsuke）

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10404211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ペリサイトは脳毛細血管の外側を覆うように存在し、血管の安定化や脳循環調節など多彩な機能を有している。ペリサイトの機能不全は脳血管機能を低下させると考えられるが、詳細な検討はなされていない。そこで、脳血管障害におけるペリサイトの役割を解明するために、脳血管障害モデルラットである、SHRSP/1zm由来のペリサイトを用いて、その機能解析を行った。SHRSP由来のペリサイトでは、BBB構成細胞とのクロストークに変化が生じていることが判明した。また、生理活性物質による収縮・弛緩反応や、炎症応答が変化していることが判明した。これらのペリサイトの機能的な変化は脳血管障害の進展と関係していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、脳微小血管におけるペリサイトの重要性が指摘され始めたが、多彩な機能を持つペリサイトの病態下での役割解明はいまだ発展途上である。本研究では、脳血管障害においてペリサイトがどのような役割を担っているのかを検討し、ペリサイトの機能変化が脳血管障害の発症や進展に関与する可能性を見出した。本研究結果は、脳血管障害の病態解明や、ペリサイトを標的とした新たな脳血管障害の治療法へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Brain pericytes cover the outside of cerebral capillaries and have various functions, such as stabilization of blood vessels and regulation of cerebral circulation. Pericyte dysfunction is thought to impair cerebrovascular function; however, this has not been investigated in detail. Therefore, to elucidate the role of pericytes in cerebrovascular disorders, we performed functional analysis using pericytes derived from stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP/1zm), a rat model of cerebrovascular disorders. It was found that SHRSP-derived pericytes have altered crosstalk with BBB-constituting cells. In addition, it was found that the contraction/relaxation and inflammatory responses induced by bioactive substances were altered. These functional changes in pericytes are associated with the progression of cerebrovascular diseases.

研究分野：血液脳関門

キーワード：血液脳関門 脳血管障害 ペリサイト SHRSP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緻密な神経細胞が生存し複雑な神経活動を行うには、脳内環境維持装置である血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) の働きが必要不可欠である。BBB の機能異常は脳内の恒常性を乱し、神経細胞の機能不全や細胞死を誘発する。そのため、BBB の機能異常は単に脳血管障害だけを意味するのではなく、様々な中枢性疾患と密接に関係していると考えられる。

BBB の特殊な機能の獲得と維持には、脳毛細血管内皮細胞と周囲の細胞 (ペリサイト、アストロサイト) との相互作用が不可欠である。一方で、相互作用の中で機能するが故に、その構成細胞の一つに起こった機能異常はその他の構成細胞にも影響を及ぼしてしまう。近年、BBB 機能制御におけるペリサイトの重要性が指摘され始めたが、ペリサイトの機能変化が病態の発症や進展とどのようにかわるかについては、不明点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP/Izm) は、脳循環器系の障害モデル動物として広く使用され、最近では、ヒトの脳小血管病と同じ病理所見を示すモデル動物としても評価されている。SHRSP のペリサイト機能を検討することで、脳血管障害におけるペリサイトの役割を明らかにすることを目的とした。具体的には以下の項目を検討した。

- (1) ペリサイトの BBB 機能への影響
- (2) ペリサイトの収縮弛緩機能
- (3) ペリサイトの炎症反応

### 3. 研究の方法

#### (1) In vitro BBB 機能評価

BBB を構成する細胞 (内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイト) を WKY/Izm、SHRSP/Izm、SHR/Izm から単離培養した。得られた細胞をカルチャーインサートで共培養し、in vitro BBB モデルとした。得られた BBB モデルのバリアー機能は以下の方法で評価した。

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

#### (2) 3系統ラット由来ペリサイトの遺伝子発現比較

単離培養した3系統由来ペリサイトから遺伝子を抽出し、RNA-seq にて変動している遺伝子群の解析を行った。

#### (3) ペリサイトの収縮弛緩機能評価

バイオセンサープレート (E-Plate) にペリサイトを播種し、xCELLigence RTCA S16 システム (Agilent Technologies 社) を使用して、収縮弛緩機能を評価した。

#### (4) ペリサイトの炎症関連遺伝子の発現

ペリサイトに Sphingosylphosphorylcholine (SPC) を負荷し、炎症関連遺伝子の発現を real-time PCR にて解析した。

### 4. 研究成果

(1) 各系統のペリサイトとアストロサイトを Wistar 由来の内皮細胞と共培養した3種細胞共培養モデルを作製した。ペリサイトやアストロサイトは内皮細胞のバリアー機能を増強させる (TEER の増強や透過性の低下) ことが知られている。SHRSP 由来の共培養モデルで有意なバリアー機能の低下が観察された。この時、バリアー機能の誘導作用への影響は2細胞系のモデルに比べ3細胞系モデルでより顕著であった (図1)。また、SHRSP 由来の共培養モデルのうちアストロサイトまたはペリサイトを WKY 由来の細胞に置き換えた混合共培養モデルでは、WKY モデルに近いバリアー機能を示すことも判明した (論文発表)。以上のことから、SHRSP の BBB では、BBB を構成する各細胞の機能が低下しており、かつその細胞間のクロストークにも異常が生じることで、BBB 機能が低下していると考えられる。

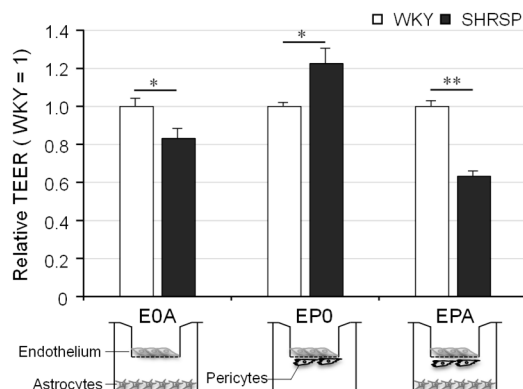


図 1. SHRSP 由来のペリサイトとアストロサイトの TEER への影響

(2) 単離培養した 3 系統のペリサイトの遺伝子発現を RNA-seq にて網羅的に解析した。WKY および SHR 由来ペリサイトと比較し、SHRSP 由来ペリサイトで変動している遺伝子群の抽出を行い、複数の遺伝子変動を同定した。変動のあった toxic substance や hypoxia への反応性にかかわる遺伝子、細胞骨格に関する遺伝子群は脳血管障害発現に関与する可能性があり、更なる検証が必要である。

(3) ペリサイトの収縮・弛緩機能を検討するために、Real-time cell analyzer (xCELLigence RTCA) を用いてセロトニン (5-HT) およびトロンボキサン A2 (TXA<sub>2</sub>) による収縮能を評価した。SHRSP 由来ペリサイトでは、5-HT および TXA<sub>2</sub> による収縮が WKY や SHR 由来のペリサイトよりも強く、さらに収縮からの回復が WKY 由来ペリサイトに比べ遅延していることが判明した (図 2)。一方、SHR 由来のペリサイトでは、5-HT による収縮反応が WKY や SHRSP に比べて低下していることが判明した。SHRSP では、生理活性物質による刺激応答が WKY や SHR とは異なっていることが考えられ、毛細血管レベルでの微小循環不全が引き起こされている可能性がある。

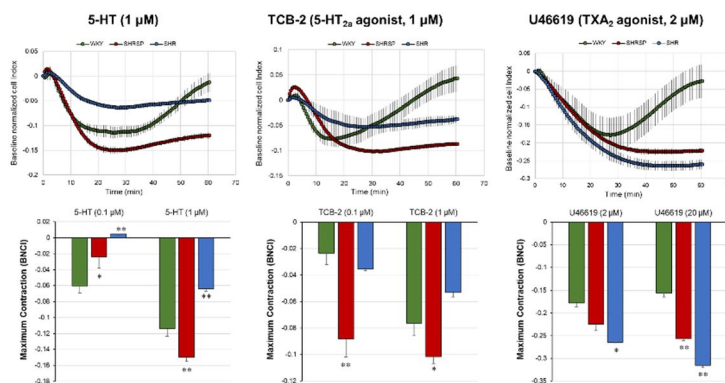


図 2. 5-HT および TXA<sub>2</sub> による収縮・弛緩反応

(4) ペリサイトは、BBB 機能調節機能や収縮弛緩による微小循環調節機能以外にも、組織炎症時の炎症終焉・組織修復促進作用などに関与していることが報告されている。遺伝子発現解析の結果、SHRSP ペリサイトでは WKY ペリサイトに比べ、S1P 受容体の発現が上昇していることが判明した。そこで、S1P 受容体のアゴニストの中で、脳ペリサイトへの作用が判明していない sphingosylphosphorylcholine (SPC) を用いて、炎症関連因子の発現解析を行った。複数の炎症関連遺伝子を検討した結果、SPC は Pai-1、Mcp-1、Il-6、Icam-1、Cox-2 の遺伝子発現を濃度依存的に増加させた。この遺伝子発現上昇には、S1P 受容体のサブタイプの中でも、S1PR2 と S1PR3 が関与していると考えられた。また、SPC 刺激後のペリサイト培養上清をラット脳毛細血管内皮細胞に負荷したところ、バリアー機能の指標である経内皮電気抵抗 (TEER) が低下した。SPC は脳出血後の脳血管攣縮との関連も指摘されており、脳出血を呈する SHRSP では、SPC の刺激により過剰な炎症反応が起こっている可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takata Fuyuko, Nakagawa Shinsuke, Matsumoto Junichi, Dohgu Shinya	4. 巻 15
2. 論文標題 Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2021.661838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morofuji Yoichi, Nakagawa Shinsuke, Ujifuku Kenta, Fujimoto Takashi, Otsuka Kaishi, Niwa Masami, Tsutsumi Keisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Beyond Lipid-Lowering: Effects of Statins on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases and Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 151 ~ 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph15020151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Shinsuke, Ohara Hiroki, Niwa Masami, Yamagata Kazuo, Nabika Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Defective Function of the Blood?Brain Barrier in a Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat: Evaluation in an In Vitro Cell Culture Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-020-00917-z	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川慎介、松本純一、山内淳史
2. 発表標題 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）由来脳ペリサイトの解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中川 慎介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エル・アイ・シー	5. 総ページ数 414
3. 書名 モデル動物の作製と利用 - 循環器疾患2021 < 下巻 >	

〔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
---------	---------