

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16065

研究課題名（和文）老化脳ペリサイト病変化を基盤とする高齢発症てんかん病態の機構解明とその防御法開発

研究課題名（英文）Pathological mechanisms and therapeutic strategies for elderly-onset epilepsy by targeting senescent brain pericytes

研究代表者

岩尾 卓朗（Iwao, Takuro）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：30846374

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）：本研究では、高齢発症てんかんの潜在的な病態形成機構及びDHA摂取の介入効果について研究を行った。脳のバリア機能を担う血液脳関門の構成細胞である脳ペリサイトが加齢に伴い脳血管から消失及び老化することで、DHA脳移行の低下、血液脳関門のバリア機能の破綻、脳内炎症の拡大が惹き起こされる可能性を明らかにした。更に、加齢に伴うBBBバリア機能の破綻及び脳内炎症に連動しててんかん感受性が増大すること、DHAの長期的な摂取が加齢に伴うBBBバリア機能の破綻、脳内炎症及びてんかん感受性の増大を抑制する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、未だ明確な病態形成機構が明らかになっていない高齢発症てんかんにおいて、老化ペリサイトを基軸とした潜在的な病態形成機構を明らかにした点に学術的意義がある。また、DHA摂取による血液脳関門の保護が加齢に伴う脳内炎症の拡大及びてんかん感受性の増大を抑制することを明らかにし、DHAの補充が高齢者において発症率の高いてんかんの発症予防や治療に応用できる可能性を提示した点に社会的意義がある。これは「血管を治療し神経を護る」という新たな治療戦略の構築に資するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the pathological mechanisms of elderly-onset epilepsy and examined therapeutic effect of docosahexaenoic acid (DHA). We revealed that pericytes, which are the component of Blood-Brain barrier (BBB) and play a key role in maintaining BBB integrity, are reduced and underwent cellular senescence during aging. The changes in pericytes are probably involved in decreased DHA transport across the BBB, the BBB disruption, and the formation of neuroinflammation with aging. Furthermore, we showed that the seizure sensitivity was increased with the age-related BBB disruption and neuroinflammation. These age-related pathological processes were improved by a long-term dietary DHA supplementation.

研究分野：医療薬学

キーワード：血液脳関門 高齢発症てんかん ペリサイト ドコサヘキサエン酸

1. 研究開始当初の背景

てんかんは神経疾患において最も罹患率が高い疾患の一つである。年代別で見ると高齢者の発症率が最も高く、高齢者人口の増加に伴っててんかん患者数は加速度的に増加しているが、その発症機構や病態は不明である。高齢者が発症するてんかん(高齢発症てんかん)は、若年者が発症するてんかんとは特徴が異なり、加齢に伴う脳の器質性病変を原因とした症候性てんかんが多い。また、高齢者は転倒・転落による外傷性脳損傷(Traumatic Brain Injury: TBI)のリスクが高く、高齢者における TBI は脳血管障害の主因となっている。高齢発症てんかんは若年者と比べ初回発作後の再発率が高く(60~99%)、特に脳血管障害の既往がある場合は再発のリスクが 16.4 倍になる(Lancet Neurol 2005; 4: 627-634)。以上、加齢と脳血管障害という要因は高齢発症てんかんを顕在化させ、その後の易再発性に寄与すると予想される。高齢者における既存の抗てんかん薬の使用は転倒・転落、認知機能の悪化、多剤併用による他疾患の悪化等更なる転機を悪化を招く。高齢者特有の病態に適した治療法はなく、既存治療は症状管理を目的としており、根治を可能にする治療法の確立はなし得ていない。超高齢化が進む本邦において高齢発症てんかんの発症機構・病態を解明し、この疾患を克服することは極めて重要な医療課題である。

脳血管の実体は脳血管内皮細胞であり、この細胞は周囲に存在する脳ペリサイトやアストロサイト等と共に脳特異的なバリア機能を有する血液脳関門(blood brain barrier: BBB)を構成するが、加齢によりこの BBB 機能は劣化する(Front Aging Neurosci. 2019 Jul 30;11:196.)。また BBB は循環血中物質の脳移行を制御するとともに、中枢神経系の恒常性を維持する役割も担っており、BBB 機能不良がてんかんを引き起こすことも示唆されている(J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Jul;79(7):774-7.)。そのため、加齢による BBB 機能劣化は高齢者におけるてんかん易発症性に繋がる可能性がある。

脳の炎症はてんかんを含む多くの神経疾患に関与しており、炎症性サイトカイン IL-6 は神経毒性およびてんかん誘発作用がある(Seizure. 2011 Apr;20(3):249-56.)。実際、高齢の慢性てんかん患者では炎症性マーカーが上昇している(Epilepsia. 2017 Nov;58(11):152-156.)。脳内に豊富に存在するドコサヘキサエン酸(DHA)は炎症性サイトカインの減少や神経保護作用を有し(J Neuroinflammation, 7 (2010), p. 9)、その脳内含有量は加齢に伴い低下する。そのため、加齢に伴う脳内 DHA レベルの低下が、脳内炎症の拡大に寄与している可能性がある。

ペリサイトは BBB に発現する DHA のトランスポーターである MFSD2A の発現制御に関与しており、加齢に伴うペリサイトの機能変化が脳内 DHA レベルの低下を惹き起こす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ペリサイトの加齢性病変を基軸とした脳血管の機能劣化が慢性的な脳内炎症を引き起こすことで神経細胞障害が増幅し、更なる脳血管障害の重積が爆発的に脳内炎症を加速させ神経機能の増悪回路が駆動される結果、高齢発症てんかんが顕在化するとの仮説を検証すること、そして本研究結果を「血管を治療し神経を護る」独自の防御法開発・創薬へと繋げることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 老齢マウスでの DHA 輸送能および脳組織学的変化

2、8、12、24 カ月齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用し、経心臓脳灌流法を用いて RI ラベル化された DHA (^{14}C DHA)の脳移行について評価することで、DHA 脳移行の加齢に伴う変化について検証した。また、2、8、12、24 カ月齢の雄性 C57BL/6J マウスから脳微小血管を単離し、ウエスタンブロット法を用いて密着結合関連タンパク質(Tjs)である ZO-1、接着結合関連タンパク質(Ajs)である cadherin、ペリサイトマーカーである PDGFR 及び SMA、老化細胞のマーカーである p16、p21、p53 発現量を評価した。更に、2、12、24 カ月齢の雄性 C57BL/6J マウスから全脳を採取し脳切片を作製後、蛍光免疫染色法を用いて、BBB バリア破綻のマーカーである Fibrinogen、脳内免疫担当細胞であり脳内炎症形成に寄与するミクログリアのマーカーである Iba1、ペリサイトマーカーである PDGFR 発現について評価した。

(2) 老齢マウスにおけるてんかん感受性の変化

高齢者で発症するてんかん(高齢発症てんかん)は、側頭葉てんかん(temporal lobe epilepsy; TLE)が最も多いことが特徴であり、TLE モデルマウスに利用される急性重積てんかん発作誘発薬であるピロカルピン(Pilocarpine; PIL0)を用いて、PIL0 誘発性てんかん発作感受性の加齢に伴う変化について検討した。2、4、12、24 カ月齢の C57BL/6J マウスに PIL0 (50、150、250、350 mg/kg)を投与し、modified Racine scaleを用いて、120 分間の観察時間におけるてんかん発作重症度を評価した。TLE 患者の多くは海馬においていくつかの病理的所見が認められるが、苔状線維の発芽はその中でも特に頻繁に生じる現象であり、ニューロフィラメントの発現が神経軸索の発芽を示すと考えられている。そのため、

全脳を採取し脳切片を作製後、蛍光免疫染色法を用いて、ニューロフィラメントのマーカーである SMI312 発現について評価した。

(3) 老化ペリサイトが BBB 機能へ与える影響

ペリサイトの細胞老化が BBB バリア機能に与える影響を検証するため、3 週齢（若年）及び 18 カ月齢（老齢）の Wistar rat からペリサイトを単離し、脳血管内皮細胞のバリア機能に与える影響を *in vitro* において検証した。併せて、一般的に老化細胞を作製する手段として用いられる長期継代培養による複製老化と（2、4、7、10 代目を作製）老齢ラットから単離したペリサイト（老齢ペリサイト）との差異についても評価した。バリア機能は経内皮電気抵抗値（TEER）及び Na-F 透過性により評価した。

(4) ペリサイトによる MFSD2A 発現制御機構

ペリサイトによる MFSD2A 発現の制御機構について検証するため、3 週齢の Wistar rat から単離した脳血管内皮細胞及びペリサイトを用いて共培養モデルを作製し、脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現量について検証した。更に、脳血管内皮細胞とペリサイトとの PDGFB/PDGFR シグナリングが MFSD2A 発現に及ぼす影響を検証するため、Pdgfrb ノックダウンペリサイトを作製した。

(5) DHA 高含有食摂取が加齢性 BBB 機能変化及びてんかん感受性に与える影響

加齢に伴う BBB バリア機能の脆弱化と DHA との関係を検証するため、19 カ月齢の C57BL/6J マウスに DHA 非含有食（コントロール群）もしくは DHA 高含有食（DHA 群）を 13 週間摂取させ、脳微小血管における Tjs、Ajs、MFSD2A 発現量を評価した。更に、Fibrinogen の脳内漏出、ミクログリア活性化及び神経軸索の発芽についても評価した。

4. 研究成果

(1) 血液脳関門を介した DHA 脳移行は 12、24 カ月齢マウスにおいて減少する

12、24 カ月齢マウスにおいて [¹⁴C]DHA の脳/灌流液割合は、2 カ月齢マウスと比べ 12、24 カ月齢の有意な減少が認められた。特に、嗅球、脳前方、海馬、視床・視床下部において有意な減少が認められた。これは、加齢に伴い DHA 脳移行性が低下することを示しており、加齢に伴う脳内 DHA レベルの低下に中高齢の時より始まる DHA 脳移行の低下が寄与していることを示唆している。更に、脳微小血管における MFSD2A 発現量は 12、24 カ月齢マウスにおいて有意に減少しており、DHA 脳移行の低下に MFSD2A 発現量の低下が寄与している可能性がある。

(2) PIL0 誘発性てんかん発作感受性は加齢に伴い増大する

PIL0 250 mg/kg、350 mg/kg 投与群において、2 カ月齢マウスと比較し 12、24 カ月齢マウスでのてんかん発作重症度は有意に増加した。PIL0 150 mg/kg 投与群では、2、4 カ月齢マウスと比べ 24 カ月齢マウスでのてんかん発作重症度が有意に増加した。また、海馬において SMI312 陽性面積及び強度は 2 カ月齢、12 カ月齢と比較して 24 カ月齢で有意に増加した。以上のことから、加齢に伴い海馬において苔状線維の発芽が増加し、異常シナプスが形成されることで海馬の脳神経が過興奮に陥りやすくなり、てんかん発作感受性が増加した可能性がある。

(3) 細胞老化を伴う血液脳関門の加齢性変動とミクログリア活性化との関連

脳微小血管における Tjs 構成タンパク質である ZO-1、Ajs である cadherin 及びペリサイトマーカーである PDGFR は加齢に伴い減少が認められた。更に、細胞老化を特徴づける p53、p21、p16 発現量の加齢に伴う増加も認められた。また、ペリサイト細胞数は 2 カ月齢マウスと比較し 12 カ月齢マウスから大幅に減少しており、MFSD2A 発現量の減少が加齢に伴うペリサイトの減少によるものであることを示唆している。血漿タンパク質であるフィブリノーゲンの脳内漏出は 24 カ月齢マウスにおいて確認され、それに付随してミクログリアの活性化が確認された。これは、脳内に流入したフィブリノーゲンがミクログリア活性化に寄与していることを示唆するものである。加齢に伴うフィブリノーゲンの脳内漏出は、PDGFR 及び ZO-1 発現量が最も低レベルにあり、p16 発現量が最も高レベルにある状態で生じており、脳微小血管における細胞老化進行が BBB バリア機能にとって致命的な影響を与えることを示唆している。更に、加齢に伴う DHA 脳移行性の低下は BBB バリアの破綻に先行しており、脳内 DHA レベルの低下が BBB バリア機能障害に寄与している可能性がある。

(4) ペリサイトの血液脳関門バリア機能増強作用は加齢によって減弱する

老齢ラット由来ペリサイト、及び複製老化によって細胞老化を誘発したペリサイトは BBB バリア機能強化作用が減弱した。更に、これらの細胞は老化細胞の表現型を示し、老齢動物から単離したペリサイトは老化細胞の特徴を保持していることを示唆している。老齢ラットから単離したペリサイトの p21 発現量は変化しておらず、p16 発現量が増加していたことから、老齢マウスの脳微小血管における p16 発現量の増加には、脳ペリサイトの細胞老化が一部寄与している可能性が示された。

(5) ペリサイトは PDGFB/PDGFR シグナルを介して脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現及び細胞膜局在を誘導する

ペリサイトは脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現量及び細胞膜局在を増加させ、この結果はペリサイトの PDGFR をノックダウンすることにより打ち消された。また、ペリサイトの

培養上清では脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現を誘導できなかったことから、ペリサイトは脳血管内皮細胞との PDGFB/PDGFR シグナルを介して MFSD2A の発現及び細胞膜局在を誘導していることが明らかになった。これは加齢に伴うペリサイトの消失が MFSD2A 発現の減少に寄与していることを示唆するものである。

(6) DHA 摂取は加齢性血液脳関門障害を改善し、ミクログリア活性化及びてんかん発作感受性を抑制する

DHA 群はコントロール群と比較し ZO-1 及び MFSD2A 発現量が増加し、フィブリノーゲンの脳内漏出を抑制した。更に、海馬におけるミクログリア活性化及び神経軸索の発芽を抑制し、てんかん発作感受性も抑制される傾向を示した。以上のことから、DHA は脳血管内皮細胞に作用することで加齢性 BBB バリア機能障害を改善し、フィブリノーゲンの脳内漏出を抑制することで、ミクログリア活性化及び苔状線維の発芽を抑制し、加齢に伴うてんかん感受性の増大を抑制する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwao Takuro, Takata Fuyuko, Matsumoto Junichi, Aridome Hisataka, Yasunaga Miho, Yokoya Miki, Kataoka Yasufumi, Dohgu Shinya	4. 巻 18
2. 論文標題 Aging decreases docosahexaenoic acid transport across the blood-brain barrier in C57BL/6J mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0281946	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 Iwao Takuro, Takata Fuyuko, Matsumoto Junichi, Goto Yuki, Aridome Hisataka, Yasunaga Miho, Yokoya Miki, Kataoka Yasufumi, Dohgu Shinya	4. 巻 645
2. 論文標題 Senescence in brain pericytes attenuates blood-brain barrier function in vitro: A comparison of serially passaged and isolated pericytes from aged rat brains	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 154 ~ 163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.01.037	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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩尾 卓朗, 後藤 佑季, 高田 芙友子, 松本 純一, 有留 尚孝, 横谷 みき, 安永 美保, 道具 伸也
2. 発表標題 老化脳ペリサイトによる血液脳関門バリア機能強化作用の減弱
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗山 侑子, 岩尾 卓朗, 今村 心実, 新垣 翔, 高田 芙友子, 道具 伸也
2. 発表標題 加齢に伴う血液脳関門のバリア機能脆弱化に対するDHA補充の効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今村心実、岩尾卓朗、栗山侑子、新垣翔、高田英友子、道具伸也
2. 発表標題 ビロカルピン誘発性てんかん発作感受性の加齢に伴う変化とDHA補充の効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takuro Iwao, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Hisataka Aridome, Miho Yasunaga, Miki Yokoya, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Aging decreases docosahexaenoic acid transport across the blood-brain barrier in C57BL/6J mice
3. 学会等名 5th Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩尾卓朗、高田英友子、横谷みき、有留尚孝、安永美保、片岡泰文、道具伸也
2. 発表標題 Brain Transport of Non-Esterified Docosahexaenoic Acid Across the Blood Brain Barrier is decreased in Middle-Aged and Aged Mice
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾卓朗、高田英友子、松本純一、横谷みき、有留尚孝、安永美保、片岡泰文、道具伸也
2. 発表標題 血液脳関門を介した非エステル型ドコサヘキサエン酸の脳移行は加齢に伴い減少する
3. 学会等名 第75回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuro Iwao, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Brain pericytes promote brain endothelial DHA uptake through inducing membrane expression of the transporter MFSD2A
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾 卓朗、高田 芙友子、道具 伸也
2. 発表標題 脳ペリサイトの老化関連随伴分泌現象 (SASP) により誘発される血液脳関門機能障害
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Goto, Takuro Iwao, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Senescent brain pericytes induced BBB dysfunction by their senescence-associated secretory phenotype.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾 卓朗、高田 芙友子、松本 純一、片岡 泰文、道具 伸也
2. 発表標題 加齢により血液脳関門(BBB)を介したドコサヘキサエン酸の脳移行は減少する
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩尾 卓朗, 高田 芙友子, 松本 純一, 片岡 泰文, 道具 伸也
2. 発表標題 Transport of docosahexaenoic acid across the blood brain barrier is decreased in aged mice.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuro Iwao, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Yasufumi Kataoka, Shinya Dohgu
2. 発表標題 Senescent brain pericytes induced BBB dysfunction by their senescence-associated secretory phenotype.
3. 学会等名 3rd Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩尾 卓朗, 高田 芙友子, 道具 伸也
2. 発表標題 加齢によるMfsd2aの機能低下によりドコサヘキサエン酸の脳移行量は減少する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------