

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06813

研究課題名(和文) 病変型脳ペリサイトの シヌクレイン処理能障害による頭部外傷後のパーキンソン病発症

研究課題名(英文) Role of pericytes in alpha-synuclein accumulation in traumatic brain injury mouse model

研究代表者

高田 芙友子 (Takata, Fuyuko)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：70412575

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)：頭部外傷(TBI)はパーキンソン病(PD)発症のリスクを高めることが報告されている。PDは脳内の シヌクレイン(syn)蓄積を特徴とする病態であるが、TBIが脳内の syn蓄積を誘導するメカニズムは不明である。TBIマウスを用いた本実験で、脳内 synの発現が増加することが判った。また脳ペリサイトPDGFR 発現減少は、ペリサイトの syn分解能を亢進させた。TBI時には脳ペリサイトのPDGFR 発現が増加することから、脳ペリサイトの syn分解能が低下している可能性がある。以上の知見は、TBI後の脳ペリサイトの活性化が脳内 syn蓄積に関与している可能性を提示するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまでに注目されていなかった頭部外傷とペリサイトの関係に着目し、パーキンソン病病態責任分子である -synucleinの脳内蓄積機構について研究した点に学術的意義がある。パーキンソン病は加齢に伴い発症率が高くなる難治性疾患である。人口の高齢化により患者数は増加することが予測されるため、予防・治療戦略の構築は急務である。新たな治療戦略を提案するための基盤となる知見を得た本研究には社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Traumatic brain injury (TBI) produces the secondary damages including Parkinson's disease (PD). However, it's unclear the mechanisms by which TBI induces the -synuclein (syn) accumulation in the brain, a responsible factor of the pathology of PD. Our data showed that syn expressions were increased in brain of TBI mice. Pericytes in TBI mice and aged pericytes showed the increased expression of PDGFR . To evaluate whether PDGFR in pericytes is associated with the syn degradation, we prepared PDGFR knockdown pericytes. The ability of syn degradation in PDGFR -knockdown pericytes is higher than those in pericytes expressing PDGFR , indicating that pericyte activation down-regulated the degradation ability of syn in pericytes. Taken together, activation of pericytes induced by TBI and aging might be involved in the accumulation of syn in the brain. These finding raise a possibility that pericytes is therapeutic target for preventing the development of PD.

研究分野：応用薬剤学

キーワード：ペリサイト 頭部外傷 パーキンソン病 alpha-synuclein

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、黒質・線条体ドパミン神経の変性・脱落および脳の広範囲に認められる Lewy 小体を病理的特徴とする神経変性疾患で、運動機能障害だけでなく認知機能低下など多彩な非運動症状を呈する。中年以降に発症し加齢に伴い患者数は増加する。本邦では 65 歳以上の 100 人に一人が発症し、その大半を成す孤発性パーキンソン病は、発症機序不明で根本的治療もなく、医療の解決すべき喫緊の課題である。その病理として Lewy 小体で認められる α -synuclein のリン酸化および凝集体が、神経機能障害および細胞死の病因となることが判っている。では、 α -synuclein は孤発性パーキンソン病ではどのように脳内で増加・変性し、凝集体として Lewy 小体を形成し、ドパミン神経機能障害へと導くのか？

パーキンソン病発症の危険因子として、これまでに遺伝的要因や環境要因（年齢や疾患既往歴：加齢や頭部外傷受傷歴）の関与が指摘されている。一卵性双生児におけるパーキンソン病発症一致率は 1 割程度に留まるため、孤発性パーキンソン病発症への遺伝的寄与度は高くない。従って、環境要因がパーキンソン病の発症を規定する重要な協働的要因と言える。

一方、頭部外傷は日常に潜む身近な疾患で、その原因はスポーツによる脳震盪、交通事故、転倒・転落など様々である。本邦では年間 28 万人、世界では年間 5000 万人が受傷しており、中高年齢期ではその受傷頻度は他世代の 3 倍に増加する。過去 10 年で相次いで頭部外傷と脳神経疾患発症の関連が指摘され、受傷経験者のパーキンソン病発症率は非経験者と比較して 1.4 倍に増加すること、また受傷後 5 年以上を経て発症することも報告されている(Gardner et al., Ann. Neurol. 2015)。驚くことに、脳震盪など軽症な頭部外傷においてもその発症リスクは増加する。これら知見は、頭部外傷後の無症候期にパーキンソン病易発症機構が形成される可能性を示唆する。

脳ペリサイトは、脳微小血管に存在する血液脳関門 (BBB) の構成細胞である。健常下では、BBB の機能を促進的に維持するだけでなく、神経機能も制御する。一方、病態下では、ペリサイトは BBB 障害因子や炎症関連因子を産生し、脳神経血管機構 (neurovascular units: NVU) の不調和の形成に関与する。実際、パーキンソン病の病態責任分子である α -synuclein に対してもペリサイトは応答し、BBB 機能障害を誘導する(Dohgu et al., Microvasc Res. 2019)。頭部外傷では、脳ペリサイトはグリア細胞よりも早期に活性化し、グリア細胞の活性化や神経機能の不調をけん引する(Sakai et al., J Pharmacol Sci. 2021)。頭部外傷では、脳ペリサイトの活性化を契機に、NVU の不調が起ることから、頭部外傷後の無症候期におけるパーキンソン病易発症機構の形成に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

パーキンソン病発症の危険因子である頭部外傷および加齢に着目し、「健常型ペリサイトから病変型ペリサイトへの変換が、 α -synuclein の脳内蓄積を惹き起こし、孤発性パーキンソン病を発症・進展させる」と仮説した。本研究では頭部外傷後のペリサイトの病変化（活性化）に着目し、頭部外傷後にパーキンソン病の病態責任分子である α -synuclein が脳内で蓄積するか、また α -synuclein の脳内蓄積にペリサイトが関与するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 頭部外傷モデルマウスの作製：CCI モデルマウスの作製:雄性 C57BL/6J マウスの左脳に controlled cortical impact (CCI) 装置を用いて頭部外傷を受傷させ、頭部外傷モデルマウス (CCI マウス) を作製した。頭部外傷の重症度は、neurological severity score (NSS)を用いて評価した。本実験で用いた CCI マウスにおける受傷後 1 時間の NSS は、スコア 5 程度（中等度の神経障害）であった。

(2) CCI マウスへの BMP 阻害薬の投与：イソフルラン麻酔科で、CCI 負荷する当日（負荷 1 時間前）から 4 日後まで、1 もしくは 3 μ g noggin を経鼻投与した。CCI オペ時には外傷部位に直接 1 もしくは 3 μ g noggin を投与し、その後縫合した。

(3) 脳ペリサイトの採取：ラットの脳より採取した脳微小血管をコーティングしていない 75 cm² フラスコに播種し、20%FBS を含む培地で培養することで脳ペリサイトを採取した。

(4) 脳血管内皮細胞の採取：ラットの脳より採取した脳微小血管をコーティングした dish に

播種し、10%FBS, ITS, heparin や bFGF などを含む培地で培養することで脳血管内皮細胞を採取した。採取した脳血管内皮細胞を membrane filter のついた insert に播種し、ペリサイトを共培養し、実験に供した。

(5) 脳ペリサイトによる α -synuclein の取り込み： α -synuclein の取り込み能を評価するため、1 μ g α -synuclein を1時間処理した後、脳ペリサイトを回収し細胞内の α -synuclein 量をウェスタンブロット法を用いて評価した。

(6) 脳ペリサイトによる α -synuclein の分解： α -synuclein の分解能を評価するため、1 μ g α -synuclein を含む緩衝液で1時間処理した後、緩衝液中の α -synuclein を wash out し0および6時間放置した。その脳ペリサイトを回収し、0および6時間における細胞内の α -synuclein 量をウェスタンブロット法を用いて評価し比較検討した。

4. 研究成果

CCI マウスの海馬における α -synuclein の発現変化:

免疫組織染色法を用いて、CCI マウスの海馬における α -synuclein の発現量変化を観察した。CCI 受傷14週目の海馬における α -synuclein の発現量は、sham マウスと比較し増加した (Fig. 1)。 α -synuclein の脳内蓄積は、パーキンソン病病態の特徴であることから、CCI マウスではパーキンソン病の易発症病態が形成されている可能性がある。

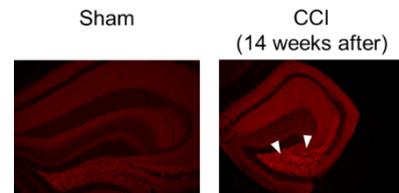


Fig. 1. CCI マウスの海馬における α -synuclein (red) の発現量

CCI マウスの線条体におけるリン酸化 α -synuclein およびドパミントランスポーターの発現変化:

ウェスタンブロット法を用いて、CCI マウスの線条体におけるリン酸化 α -synuclein (P- α -syn) およびドパミントランスポーター (DAT) の発現量変化を観察した (Fig. 2)。CCI 受傷14週目の線条体における P- α -syn の発現量は増加し、DAT の発現量は減少した。DAT の減少は、パーキンソン病病態の特徴であることから、CCI マウスではパーキンソン病の易発症病態が形成されている可能性がある。

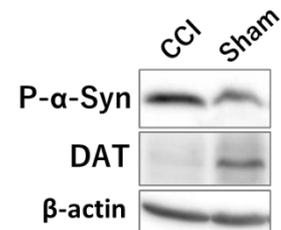


Fig. 2. CCI マウスの線条体における P- α -syn および DAT の発現量

脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能における PDGFR β の役割:

脳ペリサイトは、脳血管内皮細胞およびアストロサイトと同様に BBB を構成する細胞である。脳ペリサイトは α -synuclein を取り込み・分解する能力があるため、脳内の細胞外 α -synuclein のクリアランスに関与していると考えられる。脳ペリサイトの α -synuclein クリアランス能は、他の BBB 構成細胞よりも高い。頭部外傷により脳ペリサイトの PDGFR β は増加するが、脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能における PDGFR β の役割は不明である。そこで siRNA PDGFR β を用いて PDGFR β の発現量を低下させた脳ペリサイトを作成し、 α -synuclein の取り込みおよび分解能を評価した (Fig. 3)。脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み量は、PDGFR β 発現ペリサイトと PDGFR β 発現減少ペリサイトの間で変化は認められなかった。一方、脳ペリサイトの α -synuclein 分解能は、PDGFR β 発現減少ペリサイトで亢進した。すなわち、PDGFR β の発現が増加したペリサイトでは α -synuclein の分解能が低下している可能性がある。

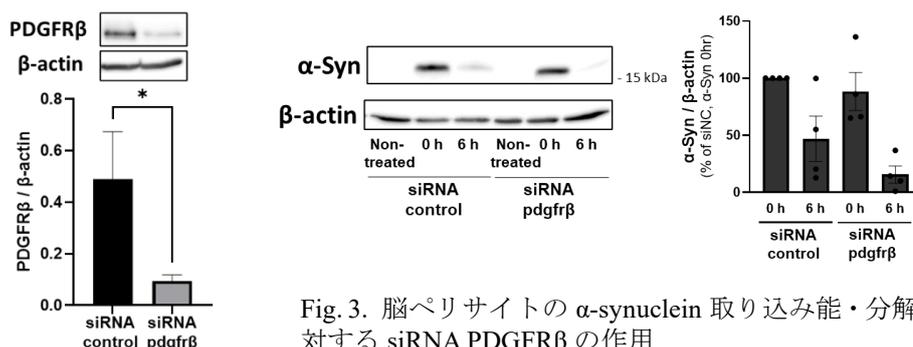


Fig. 3. 脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能に対する siRNA PDGFR β の作用

CCIによる脳ペリサイト活性化に対する bone morphogenetic protein (BMP)阻害薬の作用：

CCIにより脳ペリサイトの PDGFR β が増加した。ペリサイトの PDGFR β 発現が増加したことから、CCI後の活性化ペリサイトでは α -synuclein の分解能が低下している可能性がある。次に、ペリサイトの α -synuclein の分解能を回復させる候補薬を探索するため、CCIマウスに BMP 阻害薬 noggin を投与した。しかし、noggin 投与は CCIによる PDGFR β の増加を抑制しなかった(Fig. 4)。BMP 阻害薬 noggin は、ペリサイトの PDGFR β 発現量を減少させなかったことから、noggin にペリサイトの α -synuclein 分解能を回復させる効果がある可能性は低いことが判った。さらに CCIによるミクログリア活性化(Iba1 発現増加)およびアストロサイト活性化(GFAP 発現増加)も noggin 投与により抑制されなかった。一方で、CCIにより減少した NeuN (神経マーカー)は、noggin 投与により回復傾向を示した。

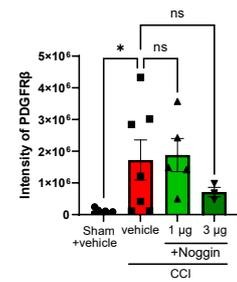


Fig. 4. CCIマウスにおける PDGFR β 増加に対する noggin の作用

加齢に伴う脳ペリサイトにおける PDGFR β 発現量変化と細胞老化関連分泌物質 (SASP) 関連因子の産生：

老齢ラットより採取した脳ペリサイト (老化ペリサイト) における PDGFR β の発現量を、若年ラットから採取したペリサイトと比較した。老化ペリサイトにおける PDGFR β mRNA 量は、若年ペリサイトのそれと比較し、有意に増加していた。ペリサイトの PDGFR β 発現が増加したことから、老化ペリサイトでは α -synuclein の分解能が低下している可能性がある。また、老化ペリサイトは若年ペリサイトと比較して、TNF- α mRNA, IL-1 β , IL-6, MCP-1 の発現が有意に高いことが判った。

脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能に対する 頭部外傷もしくは加齢に関連する因子の作用：

頭部外傷や加齢に伴い増加する fibrinogen, TNF- α , BMP および PDGF-BB を脳ペリサイトに処理し、 α -synuclein の取り込みおよび分解能を評価した(Fig. 5)。PDGF-BB 処理は脳ペリサイトの α -synuclein の取り込み量を低下させ、TNF- α および fibrinogen 処理は脳ペリサイトの α -synuclein の取り込み量を増加させた。

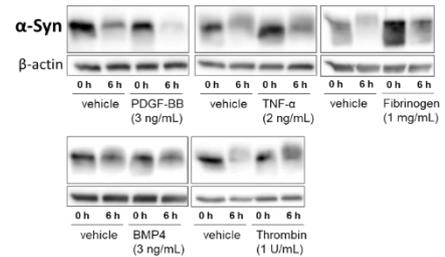


Fig. 5. 脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能に対する生理活性物質の作用

CCIマウスにおけるパーキンソン病の病因遺伝子の変化：

パーキンソン病の病因遺伝子である、Atp13a2, Lrrk2, Pink1 および Park2 の変化を観察した。CCIマウスにおけるそれらの mRNA 発現は、Shamマウスと同程度であった。

脳ペリサイトにおけるパーキンソン病の病因遺伝子の変化：

脳ペリサイトにおける Atp13a2, Lrrk2, Pink1 および Park2 の mRNA 発現量は、他の BBB 構成細胞と比較し有意に低かった。頭部外傷や加齢に伴い増加する生理活性物質である fibrinogen, TNF- α , BMP および PDGF-BB を脳ペリサイトに処理し、Lrrk2 発現量の変化を観察したが顕著な変化は認められなかった。脳ペリサイトに α -synuclein を処理すると、Lrrk2 mRNA 発現量は減少した。老齢マウスの脳では Lrrk2 mRNA 量 (内標準 ywhaz に対する相対定量) が増加した。しかし老化ペリサイトにおける Lrrk2 発現量は、若年ペリサイトのそれと同程度であった。よって加齢による Lrrk2 mRNA 量の変化はペリサイトの老化とは関連しないと考えられる。

脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み能・分解能における Lrrk2 および Park7 の役割：

siRNA Lrrk2 および siRNA Park7 を用いて Lrrk2 および Park7 の発現量を低下させた脳ペリサイトを作成し、 α -synuclein の取り込みおよび分解能を評価した。脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み量は、Lrrk2 発現ペリサイトと Lrrk2 発現減少ペリサイトの間で差異はなかった。脳ペリサイトの α -synuclein 取り込み量は、Park7 発現ペリサイトと Park7 発現減少ペリサイトの間で差

異はなかった。

α -synuclein の BBB 透過性 :

RI ラベル化 α -synuclein を静脈内投与し、BBB 透過クリアランス(K_{in})を算出したところ 0.1820 ($\mu\text{L}/\text{min}\cdot\text{g brain}$)であった。非ラベル化 α -synuclein を併用して RI ラベル化 α -synuclein の K_{in} を測定したところ $K_{in} = 0.0121 \mu\text{L}/\text{min}\cdot\text{g brain}$ となり、 K_{in} は低下した。このことから、血液中の α -synuclein は輸送担体を介して、BBB を透過し脳内に移行することが判った。

血液中の α -synuclein 量 :

マウス血漿中の α -synuclein 量を ELISA 法を用いて測定したところ、血液中に $115.1 \pm 27.6 \text{ pg}/\text{mL}$ の α -synuclein が存在することが判った。

CCI マウスの BBB 機能低下に対する bone morphogenetic protein (BMP)阻害薬の作用 :

CCI マウスでは BBB が障害され、血液由来成分である fibrinogen が脳内に漏出した。BMP 阻害薬である noggin を投与したところ、脳内への fibrinogen の漏出は有意に抑制された (Fig. 6)。このことから、noggin は頭部外傷後の BBB 機能低下を回復させることがわかった。TBI により BBB が障害されれば、血液中の α -synuclein の BBB 透過量が亢進する可能性がある。TBI による α -synuclein の BBB 透過量亢進が、CCI マウスにおける α -synuclein の蓄積に関与している可能性がある。

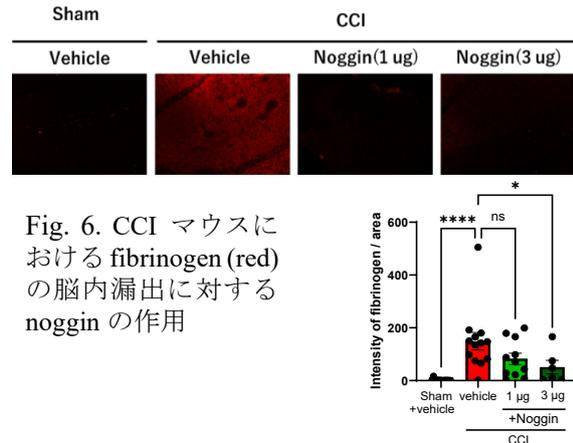


Fig. 6. CCI マウスにおける fibrinogen (red) の脳内漏出に対する noggin の作用

病変化ペリサイト由来 BBB 障害因子産生に対する Lrrk2 阻害薬の作用 :

病態下において脳ペリサイトは、BBB 障害因子や SASP 関連因子である MMP-9, CCL-2 や IL-6などを産生する。そこで、BBB 障害因子の産生に対する Lrrk2 阻害薬 PF-06447475 の作用を検討した。TNF- α もしくは α -synuclein 刺激によって増加した MMP-9, CCL-2 および IL-6 は 0.5 μM PF-06447475 処理により抑制されなかった。よって Lrrk2 阻害薬 PF-06447475 は TBI 後の BBB 障害に伴う α -synuclein の脳移行量の増加を抑制する可能性が低いことが判った。

老化ペリサイトによる BBB 機能制御障害 :

若年ペリサイトと脳血管内皮細胞を共培養すると脳血管内皮細胞のバリア機能は亢進した。一方、老化ペリサイトを脳血管内皮細胞と共培養すると、脳血管内皮細胞のバリア機能は亢進しなかった。すなわち老化したペリサイトは BBB 機能を維持する作用が低下していることが判った。加齢に伴う BBB 機能の低下は、 α -synuclein の BBB 透過量を亢進する可能性がある。

頭部外傷によりパーキンソン病病態責任分子である α -synuclein の脳内蓄積が誘導されることが判った。PDGFR β の発現が増加した脳ペリサイトでは、 α -synuclein 分解能は低下している可能性がある。PDGFR β 発現増加を特徴とする活性化脳ペリサイトが増加する頭部外傷や加齢時には、 α -synuclein のクリアランスが低下し脳内の α -synuclein が蓄積した可能性がある。また頭部外傷による脳ペリサイトの活性化や脳ペリサイトの老化時には、BBB 機能が低下することが判った。血液中に豊富に存在する α -synuclein は BBB を透過することから、BBB 障害に伴う α -synuclein の BBB 透過の亢進が、頭部外傷時の α -synuclein 脳内蓄積に関与する可能性がある。以上の知見は、頭部外傷後のパーキンソン病易発症病態の形成にペリサイトの活性化が関与する可能性を示唆する。本研究は、TBI によるパーキンソン病発症を予防・治療するための新たな治療標的として脳ペリサイトを考慮する重要性を提起するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 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 -

1. 著者名 高田 芙友子、岩尾卓朗、道具伸也	4. 巻 40
2. 論文標題 頭部外傷後の脳ペリサイト応答異常と血液脳関門障害	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CLINICAL NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 1568-1570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4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 安永 美保、高田 芙友子、井上 愛菜、永井 友貴、西山 ひなた、前田 瑞歩、大庭 功也、岩尾 卓朗、道具 伸也
2. 発表標題 頭部外傷後の脳神経障害形成におけるBMP関連シグナルの役割
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 Shinya Dohgu, Miki Yokoya, Fuyuko Takata, Takuro Iwao, Junichi Matsumoto, Miho Yasunaga, Kazunori Sano
2 . 発表標題 Characteristics of monomeric α -synuclein uptake at the blood-brain barrier in vitro
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 Miho Yasunaga, Fuyuko Takata, Takuro Iwao, Shinya Dohgu
2 . 発表標題 BBB dysfunction in a mouse model of traumatic brain injury was attenuated by treatment with BMP antagonist noggin
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 Eren Tashiro, Fuyuko Takata, Takuro Iwao, Yuko Fukunaga, Shinya Dohgu
2 . 発表標題 Aging-induced changes in mRNA expression of dopaminergic neuronrelated genes in C57BL/6 mouse brain
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 Miki Yokoya, Fuyuko Takata, Junichi Matsumoto, Takuro Iwao, Miho Yasunaga, Mayu Shibata, Kazunori Sano, Yasuyoshi Tanaka, Shinya Dohgu.
2 . 発表標題 Mechanism of α -Synuclein degradation by brain pericytes.
3 . 学会等名 14th International Conference on Cerebral Vascular Biology (国際学会)
4 . 発表年 2023年

1. 発表者名 Miho Yasunaga, Fuyuko Takata, Takuro Iwao, Shinya Dohgu.
2. 発表標題 Fibrinogen infiltration through a leaky BBB is prevented with BMP antagonist noggin in mice subjected to traumatic brain injury.
3. 学会等名 14th International Conference on Cerebral Vascular Biology (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	岩尾 卓朗 (Iwao Takuro) (30846374)	福岡大学・薬学部・助教 (37111)	
研究分担者	道具 伸也 (Shinya Dohgu) (60399186)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

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