

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790821

研究課題名（和文） 後期糖化反応生成物が血液神経関門に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文） The effect of advanced glycation end-products on blood-nerve barrier

研究代表者

清水 文崇 (SHIMIZU FUMITAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90535254

研究成果の概要（和文）：糖尿病性末梢神経障害の成因として後期糖化反応生成物（AGEs）による血液神経関門(BNB)の破綻が重要である。ヒト BNB 不死化細胞株を用いて AGEs による BNB 破綻の分子メカニズムを解明した。AGEs によりペリサイトの基底膜関連分子の発現が増加し内皮細胞のバリア関連蛋白の発現が低下したが、TGF- β や VEGF の活性を中和すると元に戻った。糖尿病性末梢神経障害において AGEs は TGF- β , VEGF により基底膜の肥厚を生じ BNB のバリア機能を破綻させると考えた。

研究成果の概要（英文）： The breakdown of the blood-nerve barrier (BNB) is considered to be a key step in diabetic neuropathy. Although basement membrane hypertrophy and breakdown of the BNB are characteristic features of diabetic neuropathy, the underlying pathogenesis remains unclear. The purpose of the present study was to identify the possible mechanisms responsible for inducing the hypertrophy of basement membrane and the disruption of the BNB after exposure to AGEs using our newly established human peripheral nerve microvascular endothelial cell (PnMEC) and pericyte cell lines. AGEs reduced the production of claudin-5 in PnMECs by increasing autocrine signalling through vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by the PnMECs themselves. Furthermore, AGEs increased the amount of fibronectin, collagen type IV and TIMP-1 in pericytes through a similar upregulation of autocrine VEGF and transforming growth factor (TGF)- β released by pericytes. These results indicate that pericytes may be the main regulators of the basement membrane at the BNB. AGEs induce basement membrane hypertrophy and disrupt the BNB by increasing autocrine VEGF and TGF- β signalling by pericytes under diabetic conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：血液神経関門，後期糖化反応生成物，糖尿病性末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性末梢神経障害の成因として糖尿病性細小血管症による微小血管障害が一因であると考えられている。神経内膜内微小血管は血液神経関門(blood-nerve barrier: BNB)の局在する部位であり、糖尿病性末梢神経障害患者の腓腹神経病理像では、BNBを構成する神経内膜内微小血管の基底膜肥厚、ならびに血管内皮の過形成、ペリサイトの変性を認めBNBが破綻することが知られている。一方、糖尿病性末梢神経障害では後期糖化反応生成物(advanced glycation endproducts: AGEs)が末梢神経のシュワン細胞や軸索、およびBNB構成細胞である末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞(peripheral nerve microvascular endothelial cell: PnMECs)、ペリサイト、基底膜に蓄積することが知られている。しかし、AGEsがどのような分子メカニズムでBNBを破綻させるかは今までに明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

我々が樹立したPnMECsとpericyteからなるBNB in vitroモデルを用いて糖尿病性末梢神経障害におけるBNB破綻の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) PnMECsとペリサイトのどちらが基底膜関連分子を産生しているかをWestern blot法で解析した。
- (2) ペリサイトにAGEsを作用させ、ペリサイトから産生される基底膜関連分子である(Fibronectin, Collagen type IV, MMP-2/9, TIMP-1)、生理活性物質(VEGF, TGF- β , bFGF)の発現変化をWestern blot法で確認した。
- (3) ペリサイトにTGF- β やVEGFを作用させ、ペリサイトから産生される基底膜関連分子(Fibronectin, Collagen type IV, MMP-2/9, TIMP-1)の発現の変化をwestern blot法で解析した。

(4) ペリサイトにAGEsと併せて抗TGF- β 中和抗体や抗VEGF中和抗体を作用させ、FibronectinとCollagen type IVの発現変化を解析した。

(5) PnMECsにAGEsを作用させ、PnMECsのtight junction関連蛋白であるclaudin-5の発現変化、バリア機能を反映する電気抵抗値の変化を解析した。AGEsに併せて、抗VEGF中和抗体を作用させるとPnMECsのclaudin-5発現と電気抵抗値を測定した。

4. 研究成果

(1) ペリサイトがPnMECsと比較して基底膜関連分子であるFibronectin, Collagen type IV, TIMP-1, MMP-2を主に産生していた。

(2) ペリサイトにAGEsを作用させると、ペリサイトから産生される基底膜関連分子であるFibronectinとCollagen type IVの発現が増加し、ペリサイトから放出されるMMP-9の産生が低下したことをWestern blot法で確認した。

Effect of the two AGEs concentrations (100 μ g/ml, 200 μ g/ml) on expression of basement membrane-related molecules in peripheral nerve pericytes

Protein	Ratio of target protein expression (protein/actin)	
	AGE 100 μ g/ml	AGE 200 μ g/ml
Collagen type IV	2.18 \pm 0.39*	2.93 \pm 0.61*
Fibronectin	4.83 \pm 0.52*	5.33 \pm 0.96*
TIMP-1	2.38 \pm 0.17*	2.86 \pm 0.14*
Act-MMP-9	0.68 \pm 0.06	0.36 \pm 0.18*
Act-MMP-2	1.15 \pm 0.07	0.94 \pm 0.05

RAGE	2.03±0.38*	2.40±0.42*
TGF-β	1.87±0.13*	2.68±0.18*
VEGF	2.26±0.29*	2.21±0.21*
bFGF	1.18±0.08	0.96±0.05

Each values reflect the combined densitometry data from three independent experiments and are represented as a fold of controls, mean±SEM (n=9).

*< 0.01 compared to control.

(3) ペリサイトに TGF-β や VEGF を作用させると、ペリサイトから産生される Fibronectin と Collagen type IV の発現が増加した。

Effect of TGF-β and VEGF on expression of basement membrane- related molecules in peripheral nerve pericytes

Protein	Ratio of target protein expression (protein/actin)	
	TGF-β	VEGF
Collagen type IV	4.49±0.15*	1.94±0.20*
Fibronectin	3.60±0.18*	1.92±0.15*
TIMP-1	1.23±0.14	1.10±0.14
Pro-MMP-9	1.84±0.13*	3.22±0.23*
Act-MMP-9	1.28±0.14	1.38±0.17
Pro-MMP-2	0.95±0.14	1.34±0.25
Act-MMP-2	1.43±0.32	1.32±0.14

Each values reflect the combined densitometry data from five independent experiments and are represented as a fold of controls, mean±SEM (n=5).

*< 0.01 compared to control.

(4) ペリサイトに AGEs と併せて抗 TGF-β 中和抗体や抗 VEGF 中和抗体を作用させると Fibronectin と Collagen type IV の発現が低下した。

(5) PnMECs に AGEs を作用させると PnMECs の tight junction 関連蛋白である claudin-5 の発現が低下し、バリア機能を反映する電気抵抗値が低下したが、抗 VEGF 中和抗体を併せて

作用させると claudin-5 の発現と電気抵抗値が増加した。

これらの結果より、糖尿病性末梢神経障害において AGEs は VEGF を介し BNB のバリア機能を破綻させ、TGF-β、VEGF により基底膜の肥厚を生じていると考えられた。実際の糖尿病性末梢神経障害の病理所見で認められる BNB での基底膜の肥厚やバリアの破綻を BNB in vitro model で再現し、その BNB 破綻メカニズムを分子レベルで明らかとした。

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 4 件)

① Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012; 83(3): 288-297. 査読有り

② Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, Kanda T. Pericyte-derived Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Increase the Expression of Claudin-5 in the Blood-brain Barrier and the Blood-nerve Barrier. Neurochem Res 2012; 37: 401-409. 査読有り

③ Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF-β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. Diabetologia 2011; 54(6):1517-1526. 査読有り

④ Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T. Peripheral nerve pericytes modify the

blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. J Cell Physiol. 2011; 226: 255-266. 査読有り

〔学会発表〕（計 3 件）

① Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Toshiyuki Takahashi, Hiroyo Haruki, and Takashi Kanda. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. ECTRIMS, 21-23, Oct, 2011, Amsterdam, Netherland.

② 清水文崇, 佐野泰照, 安部真彰, 前田敏彦, 斎藤和幸, 春木明代, 松井尚子, 梶 龍兒, 神田 隆: 多巣性運動ニューロパチー血清が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第 22 回日本末梢神経学会総会. 2011 年 9 月 2-3 日, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄.

③ 清水文崇, 佐野泰照, 斎藤和幸, 春木明代, 前田敏彦, 安部真彰, 神田 隆: 視神経脊髄炎血清での血液脳関門破綻メカニズムの解析. 第 52 回日本神経学会総会. 2011 年 5 月 19 日-21 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.

〔図書〕（計 1 件）

① 清水文崇, 神田 隆, 医歯薬出版株式会社, 医学のあゆみ, 血管内皮異常 2011; 239: 58-62.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 文崇 (SHIMIZU FUMITAKA)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 90535254