

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591260

研究課題名(和文) 動脈硬化危険因子による脳小血管内皮細胞の接着機構障害とその機序の解明

研究課題名(英文) Dysfunction of endothelial junction by vascular risk factors in the cerebral small vessel.

研究代表者

八木田 佳樹 (Yagita, Yoshiki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：20403066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血後VEGF、VE-cadherinはともに発現亢進する。しかしVE-cadherin関連分子であるIQGAP1活性化を介して接着能は負に制御されている可能性が示唆された。動脈硬化危険因子の一つである糖尿病では、血管透過性亢進に関与するTNF α とその受容体が脳実質内で発現亢進していることが認められた。脳内組織マクロファージから分泌されるTNF α が糖尿病における血管機能障害に関与している可能性が考えられる。内皮型一酸化窒素合成酵素は内皮機能を維持する上で主要な分子であるが、虚血病巣においては単量体化を引き起こしており、逆に酸化ストレスの源となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：VE-cadherin mediated endothelial cell-cell junction play an important role to form barrier in the brain. VEGF was induced after ischemia and might suppress the VE-cadherin mediated cell-cell adhesion via increasing in interaction with IQGAP1. TNF α is another molecule to induce vascular permeability in diabetes mellitus. We found TNF α was increased in the brain parenchyma in db/db mice. eNOS is one of key molecule to maintain the endothelial function. In the ischemic brain, eNOS monomer was increased and nitrotyrosine signals were observed in the cerebral endothelial cells. These results may contribute to develop new therapy for acute ischemia and small vessel disease in the brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳小血管 血管内皮 脳虚血

1. 研究開始当初の背景

脳実質内小血管(細動脈、毛細血管)の障害によって引き起こされる疾患には脳卒中(ラクナ梗塞、脳出血)や脳血管性認知症などがある。また脳小血管障害が存在すると虚血性脳卒中の増悪因子ともなる。これらの疾患は人口の高齢化とともに今後さらに発症数が増加することが懸念されており、要介護の原因疾患の上位を占めていることから社会的にも脳小血管障害の機序を明らかにすることは急務である。脳小血管障害は高血圧等の動脈硬化危険因子や脳虚血により生じ、血管内皮バリア機能の破綻や炎症の惹起などを介して脳虚血病態の悪化を引き起こす。これら一連の病態の中で脳血管内皮障害は最初期の変化と考えられ、その機序を解明し制御法を確立することは有効な治療法開発につながると考えられる。

1) 脳虚血病態における内皮細胞間接着機構関連分子の動態

血管内皮バリア機能の低下により、血漿蛋白や血球が細動脈壁や脳実質内に漏出してくる。ここで脳実質組織に炎症を引き起こし、脳機能障害や脳虚血病態増悪に関与する。血管内皮バリア機能は内皮細胞間接着機構に依存している。脳血管内皮における内皮細胞間接着機構は adherence junction を形成する VE-cadherin と tight junction を形成する claudin、occludin が中心となって構成されている。このうちバリア機能の本体を担うのは tight junction であるが、adherence junction の形成不全状態では tight junction は形成されない。脳虚血病態に関与する重要な分子である VEGF は VE-cadherin の接着能を低下させることが知られている。両者の間には多くの分子機構が介在していると考えられる。VEGF の下流で働く分子のうち、主に血管内皮細胞で作用する分子として IQGAP1 がある。IQGAP1 は内皮細胞接着機構

に関与すると考えられるが、脳虚血病態においてどのような動態をとるかについては明らかとなっていない。

2) 糖尿病病態下におけるマクロファージと内皮細胞間接着機構

我々は既に主要な動脈硬化危険因子である高血圧により、脳実質内小血管の内皮機能障害が進行することを報告してきた。高血圧と同様、動脈硬化危険因子である糖尿病については脳内に常在する組織マクロファージを介して、脳小血管を含む脳内環境に影響を与えることが推察される。糖尿病病態下のマクロファージから産生される因子の中に、血管内皮機能障害に関するものが存在することは報告されているが、脳内環境の中で検討されたものはほとんどない。また糖尿病病態では血管内皮透過性亢進をきたすことが知られているが、脳毛細血管における血管内皮細胞とペリサイトの相互作用に糖尿病がどのように関与するかについては不明な点が多い。これらを明らかにしていくことは糖尿病と脳血管障害の関与について、さらなる知見を積み治療への展望を開くのに重要なことである。

3) 脳虚血病態における eNOS uncoupling

血管内皮機能に関与する重要な分子の一つとして内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)がある。脳虚血発症前の eNOS 機能は虚血性脳障害発症後の重症度と関連があることはよく知られているが、脳虚血発症後の eNOS 機能がどのように変化するかについては不明な点が多い。eNOS は構成的に発現している分子であり、様々な機能調節機構が存在する。病的な状態においては、二量体化が阻害され単量体となった eNOS 分子が NO ではなく、ヒドロキシラジカルを産生し、さらにパーオキシナイトライトとなることで酸化ストレスの源となる(eNOS uncoupling)。脳虚血発

症後の eNOS に対する治療介入を考える時の問題点の一つとしてこの eNOS uncoupling が推定されるが、これまで脳虚血病態における eNOS uncoupling について検討された報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では脳小血管における血管内皮細胞の機能、特に細胞間接着機構に焦点をあて、関連分子の脳虚血病態下および動脈硬化危険因子の影響を検討する。具体的には以下の点について検討することを目的とした。1) 脳虚血病態下における VEGF、VE-cadherin、IQGAP1 の発現と相互作用の動態、2) 2 型糖尿病病態下における脳内マクロファージ発現分子の検索、3) 内皮細胞、ペリサイト相互作用に関連する分子の検索、4) 脳虚血病態下における eNOS uncoupling について明らかにする。

3. 研究の方法

1) 局所脳虚血モデルにおける VEGF、

VE-cadherin、IQGAP1 の発現と相互作用

Wistar ラットを用い、ハロセン吸入麻酔下に総頸動脈から栓系を挿入することで主に中大脳動脈領域に虚血を誘導し、80 分間の脳虚血後、再灌流させた。虚血誘導の 6、24、72 時間後に脳を取り出し、組織解析用の凍結切片もしくは蛋白、遺伝子発現解析用のサンプルとした。VE-cadherin、IQGAP1 および各種細胞マーカーと免疫組織化学染色を行い、western blot でその発現量を評価した。VEGF についてはアイソフォーム特異的なプライマーを用い、各々の発現量を比較した。脳組織内において最も発現の高かった VEGF165 について、real time-PCR を用いて発現動態を解析した。IQGAP1 と VE-cadherin-catenin 系の相互作用については免疫沈降法により評価を行った。

2) 2 型糖尿病病態下における脳内マクロフ

ージ発現分子の検索

2 型糖尿病モデルとしてレプチン受容体機能異常により過食、肥満。高血糖を呈する db/db マウスを用いた。このマウス及びコントロールとして用いた db/+マウスの脳組織を採取し、RNA を精製した。候補遺伝子に対する特異プライマーを用いて real time-PCR を行い、各々の発現量を定量評価した。

3) 内皮細胞、ペリサイト相互作用に関連する分子の検索

脳微小血管内皮細胞およびペリサイトの単培養系、および共培養系を樹立する。各々の発現マーカーを用いて細胞培養系の純度を評価する。単培養系および共培養系の各々から蛋白サンプルを回収し、調整後 SDS-PAGE で展開し、蛋白発現パターンの変化を評価する。

4) 脳虚血病態下における eNOS uncoupling についての検討

1) で用いた動物モデル使用し、免疫組織化学染色のための凍結切片、遺伝子発現、蛋白発現を解析するためのサンプルを作成、調整する。eNOS の単量体化は非還元 SDS-PAGE、western blot で評価した。パーオキシナイトライト等による蛋白のニトロ化ストレスについては抗ニトロチロシン抗体による免疫組織化学染色で評価を行った。

4. 研究成果

1) 局所脳虚血モデルにおける VEGF、VE-cadherin、IQGAP1 の発現と相互作用
成熟ラット脳組織において VE-cadherin は血管内皮に特異的に発現していた。一方で、すべての cadherin 分子の接着機能発現に必須の関連タンパクである -catenin は脳全体に広く分布していた。VEGF のスプライシングアイソフォームである VEGF206、189、165、145、121、206b、189b、165b、145b、121b の mRNA 発現を共通領域に対するプライマーで

PCR 後、アガロース電気泳動におけるバンド長で分離したところ、VEGF165 が脳内において最も豊富に発現していることを示唆する所見を得た。VEGF165 に対する特異的なプライマーを用いて real time-PCR で発現変化を評価したところ、脳虚血 24 時間後、VEGF mRNA の発現は約 2 倍程度に亢進していた。これに対して VE-cadherin mRNA は虚血 24 時間後に約 10 倍程度の著明な発現亢進が認められた。VE-cadherin に関しては 24 時間後には有意な発現変化は認められなかったが、72 時間後に 2.3 倍程度に発現亢進していた。β-catenin はタンパクレベルで有意な発現変化はなく、むしろ degradation による western blot 上の band density の低下傾向とスメアを認めた。免疫組織化学染色では VE-cadherin は虚血後も血管内皮に局限して発現しており、異所性の発現は認めなかった。

脳実質内において IQGAP1 は脳血管内皮細胞と subventricular zone に高い発現を認めた。脳虚血 24 時間後には有意な発現亢進を認め、72 時間後には 5.2 倍程度の発現亢進を認めた。免疫組織化学染色では 24 時間後までは主な発現部位は正常脳同様、血管内皮であったが、72 時間後には活性化ミクログリア/マクロファージに高い異所性の発現を認めた。IQGAP1 の発現が比較的血管内皮に局限していた虚血 24 時間後のサンプルを用いて免疫沈降法で評価したところ、虚血脳において IQGAP1 と β-catenin の相互作用が増強されていることが示唆された。以上より脳虚血後の血管内皮間接着は VEGF による IQGAP1 と VE-cadherin-β-catenin 系の相互作用増強が生じることにより、細胞間接着が减弱している可能性が示唆された。脳虚血後、VE-cadherin の発現量のみでは内皮細胞間接着は評価することができず、IQGAP1 などの関連分子の動態もともに評価することが必要であると考えられた。

2) 2 型糖尿病病態下における脳内マクロファージ発現分子の検索

12, 13 週齢の db/db マウスおよび db/+マウスの脳組織より mRNA を調整し、real time-PCR により定量的に発現動態を解析した(図 1)。TNF、iNOS2 など炎症関連分子の発現上昇を認めた。TNF に関しては糖尿病病態下で血管透過性亢進に関与する分子として知られているため、さらにその受容体の発現についても検討したところ、TNF 同様に発現亢進を認めた。今後、脳微小血管内皮細胞およびペリサイトの単培養系、および共培養系において TNF が両者の相互作用にどのような影響を及ぼすか評価を行っていく予定である。

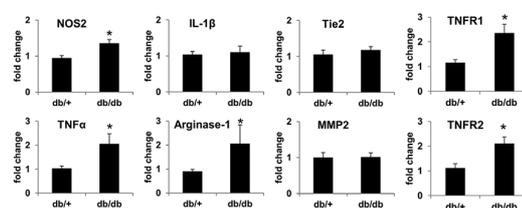


図 1 . db/db マウスの脳組織におけるマクロファージ関連分子の発現。

3) 内皮細胞、ペリサイト相互作用に関連する分子の検索

脳微小血管内皮細胞、ペリサイトの単培養系および共培養系において、細胞接着関連分子の発現を評価した(図 2 左)。内皮細胞では VE-cadherin がペリサイトでは PDGFR が各々特異的に発現していた。N-cadherin、β-catenin は両者ともに発現が認められた。内皮細胞単培養(E)、ペリサイト単培養(P)、共培養(E+P)の各々から蛋白サンプルを抽出、調整したのち SDS-PAGE で展開したところ、共培養系で特に濃くなっているいくつかのバンドが見出された(図 2 右)。今後これらのバンドについて解析を行い、分子の特定を目指す予定である。

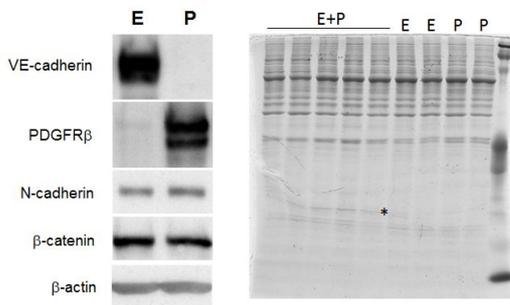


図2 . 脳微小血管内皮細胞、ペリサイトの単培養系における発現蛋白の解析 (左)。SDS-PAGE で展開後、CBB 染色を行い、共培養系で発現上昇している候補分子 (*) を認める (右)。

4) 脳虚血病態下における eNOS uncoupling についての検討

eNOS 分子は 2 量体となって初めて機能する。非還元 SDS-PAGE と western blot を用いることで 2 量体と単量体を明確に区別しうる。この方法を用いて脳虚血モデルにおける脳組織サンプルを解析した (図 3)。正常能においてほとんど eNOS 単量体は検出されなかった。虚血後のサンプルでは、24 時間後より虚血中心部で eNOS 単量体が観察され、48 時間後をピークに 7 日後まで eNOS 単量体が認められた。抗ニトロチロシン抗体による免疫組織化学染色では血管内皮においてニトロ化ストレスが亢進していることを示唆する所見を得た。このことから虚血脳においては eNOS uncoupling が生じており、虚血後に eNOS 活性化を促進させるような治療介入を行う際には、この点に留意する必要があると考えられた。

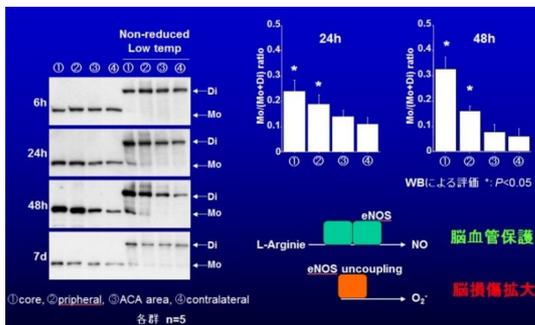


図3 脳虚血後、脳実質内小血管において eNOS

単量体化が認められる。単量体の eNOS は酸化ストレスの源となり、脳損傷拡大に寄与する。

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 4 件)

- 1) Yagita Y, Kitagawa K, Oyama N, Yukami T, Watanabe A, Sasaki T, Mochizuki H. Functional deterioration of endothelial nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 33(10):1532-1539, 2013. 査読あり 10.1038/jcbfm.2013.112
- 2) Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. Neurosci Lett. 564:16-20, 2014. 査読あり 10.1016/j.neulet.2014.01.053
- 3) Yukami T, Yagita Y, Sugiyama Y, Oyama N, Watanabe A, Sasaki T, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. Chronic elevation of tumor necrosis factor- α mediates the impairment of leptomeningeal arteriogenesis in db/db mice. Stroke. 46(6):1657-1663, 2015. 査読あり 10.1161/STROKEAHA.114.008062
- 4) 八木田佳樹. 「eNOS を標的とした治療」日本臨床増刊号 最新臨床脳卒中学 (上) 最新の診断と治療 . pp407-411. 2014 年 7 月 20 日 日本臨床社 査読なし

(学会発表)(計 6 件)

- 1) Yagita Y, Kitagawa K, Oyama N, Yukami T, Watanabe A, Sasaki T,

- Mochizuki H. Expression and role of IQGAP1 in the brain after focal ischemia. Brain13 (International Society for Cerebral Blood Flow & Metabolism), 2013.5.20-23, Shanghai, China
- 2) Yukami T, Yagita Y, Watanabe A, Sasaki T, Mochizuki H, Kitagawa K. Leptomeningeal Collateral Growth Is Impaired In Type 2 Diabetic Mice. International Stroke Conference. 2014.2.12-14, San Diego, USA
- 3) 八木田佳樹 . 血液脳関門障害とその分子マーカー(シンポジウム)第24回日本脳循環代謝学会(広島)平成24年11月8-9日
- 4) 八木田佳樹 他 . 脳小血管内皮細胞間接着結合に対する脳虚血の影響 . 第38回日本脳卒中学会(東京)平成25年3月21-23日
- 5) 八木田佳樹 他 . シンポジウム「ペナンブラの molecular biology」局所脳虚血病態における血管内皮機能障害と側副血行路発達の関与 . 第39回日本脳卒中学会(大阪)平成26年3月13-15日
- 6) 八木田佳樹 . 教育講演：虚血性脳障害の病態 . 第40回日本脳卒中学会(広島)平成27年3月26-29日

6. 研究組織

(1)研究代表者

八木田 佳樹 (Yagita Yoshiki)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：20403066

(2)研究分担者

北川 一夫 (Kitagawa Kazuo)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70301257
大山 直紀 (Oyama Naoki)
大阪大学・医学部付属病院・その他
研究者番号：90622895

(3)連携研究者

望月 秀樹 (Mochizuki Hideki)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90230044