

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790102

研究課題名(和文)糖尿病末梢慢性炎症の脳内誘導の起因となる脳ペリサイトのPAR-1シグナル

研究課題名(英文)Brain pericytes induce the brain inflammation that derived from chronic peripheral inflammation in diabetic mellitus via PAR-1 signal

研究代表者

町田 崇(MACHIDA, Takashi)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：30586144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病時には末梢だけでなく脳内でも炎症が見られ、糖尿病性認知機能障害が生じる。本研究は、糖尿病時末梢炎症の脳内伝播機構に対するトロンビン応答性脳ペリサイトの関与について明らかにすることを目的とした。高脂肪食負荷により作成した肥満・耐糖能異常モデルマウスの脳内でトロンビン量の増加が見られた。また、脳ペリサイトはトロンビンに反応して、血液脳関門の透過性を亢進すること、matrix metalloproteinase-9を産生・放出することが明らかとなった。これらの結果は、糖尿病時の脳内炎症形成過程にトロンビン応答性脳ペリサイトが重要な働きを持つことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：In diabetic mellitus, inflammation is observed in the brain as well as the peripheral and contributes to the pathogenesis of diabetic cognitive dysfunction. This study aimed to clarify the involvement of thrombin-responsive brain pericytes in the propagation mechanism of inflammation from the peripheral to the brain. Increase the amount of thrombin was observed in the brain of high-fat diet induced obesity and glucose-intolerance model mouse. Further, thrombin-treated brain pericytes enhanced the permeability of the blood-brain barrier, and released matrix metalloproteinase-9. These results suggest that thrombin-responsive brain pericytes have an important role in the formation of brain inflammation in diabetic mellitus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学

### 1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は、肥満による脂肪組織へのマクロファージの侵入とそれに伴うTNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1などの炎症性サイトカインやケモカインの産生増加によりインスリン抵抗性をきたす全身性の慢性炎症疾患である。糖尿病においては、網膜症、腎症、末梢神経障害などの末梢微小血管病変による合併症に加え、糖尿病性認知機能障害(アルツハイマー病、血管性認知症)などの中枢性合併症が生じることが知られている。薬物療法により血糖管理されている2型糖尿病患者においても糖尿病性認知機能障害が発症することから(Chiu SL, Cline HT, Neural Dev., 2010;5:7)、血糖異常のみをこの障害の直接的かつ主要な成因と捉えることはできない。また、糖尿病病態時には末梢だけでなく脳内でも炎症が認められることから(Celik S, Erdogan S, Mol Cell Biochem., 2008;312:39-46)、末梢炎症の脳内への誘導が糖尿病性認知機能障害の発症・進展に関与することが推測される。しかし、その詳細な仕組みについては未だ不明な点が多い。

脳は、その恒常性を厳密に保つために、血液脳関門(blood-brain barrier:BBB)により保護されている。BBBは、脳血管内皮細胞、アストロサイト及び脳ペリサイトで構成される高次に分化した機構であり、物質や細胞の透過・浸潤を高度に制限している。そのため、末梢の炎症性物質やマクロファージなどの免疫担当細胞は脳内へは容易に透過・浸潤できない。それにも関わらず、糖尿病病態時の脳内では炎症がみられることから、本研究者は、糖尿病病態時に増加した末梢血液中の炎症性サイトカインなどの液性因子にBBB構成細胞が反応することにより、末梢炎症を脳内へと緩徐に伝播すると考え、以下の(1)、(2)に着目した。

(1)本研究者は、糖尿病病態時の末梢炎症が脳内へ伝播する際の原因物質として、トロンピンに着目した。トロンピンは糖尿病病態時の末梢血液中(Gosk-Bierska I, *et al.*, Int Angiol., 2002 Jun;21(2):128-33)やアルツハイマー病病態時の脳内(Yin X, *et al.*, Am J Pathol., 2010 Apr;176(4):1600-6)で上昇することが報告されている。凝固因子であるトロンピンは、血栓形成成分であるフィブリンを生成するセリンプロテアーゼとして知られる一方で、近年では主要な炎症誘発因子の一つとして考えられており、トロンピン受容体であるprotease-activated receptors(PARs)を介して種々の細胞反応に直接的に影響する。

(2)本研究者は、末梢炎症を脳内に伝播する起因細胞として脳ペリサイトに着目した。本研究者らは、以前にBBB構成細胞である脳血管内皮細胞・アストロサイト・脳ペリサイトの炎症刺激応答の差異に着目しTNF- $\alpha$ 刺激に対して脳ペリサイトが最も高感受性の応答細胞であることを明らかにした(Takata

F, Machida T, *et al.*, J Neuroinflammation., 2011 Aug 26;8:106)。

すなわち、糖尿病病態時に末梢血液中に増加したトロンピンに脳ペリサイトが反応することで末梢炎症を脳内に伝播し、糖尿病性認知機能障害が発症するとの仮説を立て、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究は、末梢炎症の脳内への伝播機構の解明と、脳内炎症に起因する糖尿病性認知機能障害の新規治療標的を提示することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肥満・耐糖能異常モデルマウスの作製

ICRマウスにhigh fat diet (HFD)を2, 8週間負荷し、肥満・耐糖能異常モデルマウスを作製した。体重は1週間ごとに測定した。サンプリング直前に、空腹時血糖値測定と経口糖付加試験(OGTT)を行った。

#### (2) 組織および血液中のトロンピン濃度の測定

肥満・耐糖能異常モデルマウスおよびコントロールマウスから肝臓、脳、血漿を採取し、ELISA法にてトロンピン濃度を測定した。

#### (3) 初代培養BBB構成細胞の採取

3週齢のwistar ratから脳血管内皮細胞(BMECs)および脳ペリサイトを単離培養した。アストロサイトは生後1-2日のwistar ratから単離培養した。

#### (4) BBB構成細胞間のPARs発現量比較

BMECs、アストロサイト、脳ペリサイトのmRNAを用いて、リアルタイムRT-PCR法にてPAR1-PAR4の発現量比較を行った。

#### (5) BBB構成細胞間でのトロンピン誘発性MMP-9産生・放出量の比較

BMECs、アストロサイトおよび脳ペリサイトを無血清培地で12時間処理した後、トロンピンを24時間処理した。処理後、濃縮した培養上清中のmatrix metalloproteinase-9(MMP-9)をウェスタンブロット法により測定した。また、脳ペリサイトにPAR1阻害剤SCH79797を20分間前処理した後にトロンピンを24時間処理し、同様にして培養上清中のMMP-9を測定した。

#### (6) in vitro BBBモデルの作成

脳ペリサイトを24wellカルチャープレート上(abluminal side:脳実質側)に、BMECsをトランスウェルインサートのメンブレン上(luminal side:脳血管側)に播種し、BMECs-脳ペリサイト共培養系(co-culture)およびBMECs単独培養系(monolayer)のin vitro BBBモデルを作成した。

(7) in vitro BBB モデルを用いたナトリウムフルオレセイン(Na-F)透過性の評価

monolayer および co-culture in vitro BBB モデルの abluminal side または luminal side に トロンピン を処理し、24 時間後に luminal side に Na-F 試薬を添加し、BMECs を透過した Na-F 量を測定し、透過係数を求めた。

(8) in vitro BBB モデルを用いた BMECs の細胞障害実験

monolayer および co-culture in vitro BBB モデルの abluminal side に トロンピン を処理し、24 時間後に BMECs の細胞障害を WST-8 試薬を用いて評価した。

(9) in vitro BBB モデルを用いた BMECs タイトジャンクションタンパクの免疫染色

monolayer および co-culture in vitro BBB モデルの abluminal side に トロンピン を 24 時間処理し、BMECs タイトジャンクションタンパクの局在変化を ZO-1 および Claudin-5 の免疫染色により評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 肥満・耐糖能異常モデルマウスの作製

ICR マウスに high fat diet (HFD) を 2, 8 週間負荷し、肥満・耐糖能異常モデルマウスを作製した。肥満・耐糖能異常モデルマウスは、HFD 負荷期間依存的な体重増加を示した(図 1A, 1D)。また、2W, 8W ともに HFD 負荷群で空腹時血糖値の上昇および耐糖能異常がみられた(図 1B, 1E)。OGTT のグラフから求めた血統曲線下面積(AUC)は、2W では有意な差はみられず、8W でのみ HFD 負荷群で有意な上昇が見られた(図 1C, 1F)。

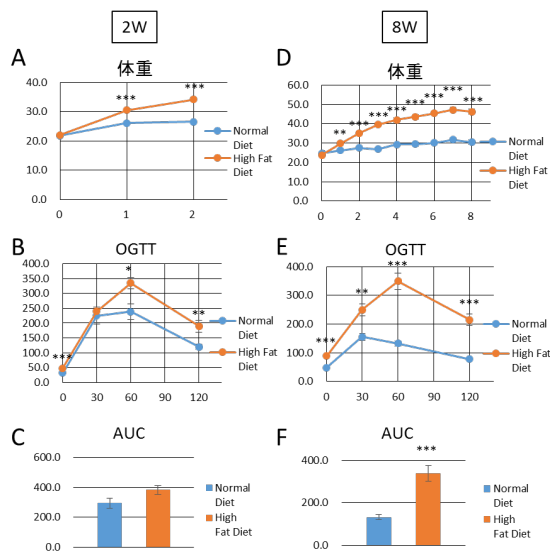


図 1. HFD 負荷による 2W, 8W 肥満・耐糖能異常モデルマウスの体重、OGTT、AUC の結果

2W, 8W モデルマウスで HFD 負荷時間依存的な体重増加、空腹時血糖値の上昇および耐糖能異常がみられた。AUC は 8W モデルマウスでのみ有意な上昇がみられた。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

(2) 肥満・耐糖能異常モデルマウスの組織および血漿中トロンピン濃度の測定

肥満・耐糖能異常モデルマウスおよびコントロールマウスから肝臓、脳、血漿を採取し、ELISA 法にてトロンピン濃度を測定した。2W モデルマウスでは血漿でのみトロンピン濃度の有意な上昇がみられた(図 2A-2C)。一方、8W モデルマウスでは肝臓および脳でトロンピン濃度の有意な上昇がみられた(図 2D, 2E)。8W モデルマウスの血漿中トロンピン濃度は上昇傾向ではあったが、有意な差はみられなかった(図 2F)。

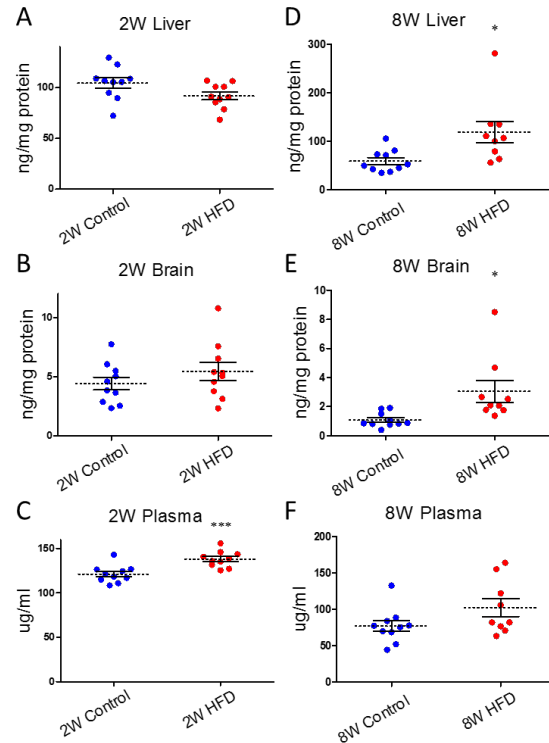
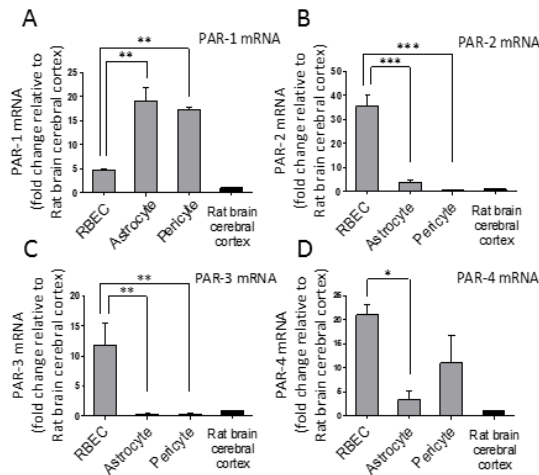


図 2. 肥満・耐糖能異常モデルマウスの組織および血漿中のトロンピン濃度の測定

2W モデルマウスでは血漿でのみトロンピン濃度の有意な上昇がみられた。8W モデルマウスでは肝臓および脳でトロンピン濃度の有意な上昇がみられた。\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

(3) BBB 構成細胞間の PARs 発現量比較

BBB 構成細胞間において、PARs の 4 つのサブタイプ(PAR1-PAR4)について発現量比較を行った。PAR1 はアストロサイトと脳ペリサイトで BMECs と比較して有意に高発現していた(図 3A)。PAR2 および PAR3 については BMECs での発現量が著しく高かった(図 3B, 3C)。PAR4 に関しては BMECs でアストロサイトと比較して有意に高発現しており、脳ペリサイトは中程度の発現量であった(図 3D)。



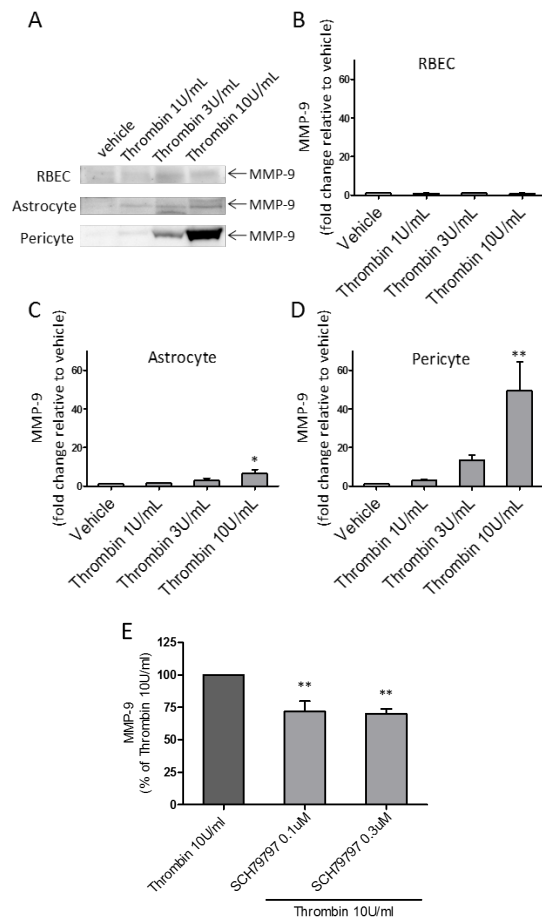
**図3. BBB 構成細胞間における PARs 発現量の比較**  
 BBB 構成細胞間における PARs mRNA の発現量比較をリアルタイム PCR 法にて行った。BBB 構成細胞間での比較において、脳ペリサイトでは PAR1 の発現量が高いことがわかった。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

(4) BBB 構成細胞間におけるトロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出量の比較

トロンビン処理による MMP-9 産生・放出については、ヒト脳血管内皮細胞(Kolev K, *et al.*, *Thromb Haemost.*, 2003 Sep;90(3):528-37)およびラットアストロサイト(Choi MS, *et al.*, *Brain Res Bull.*, 2008 Jul 1;76(4):368-75)では既に知られているが、脳ペリサイトについては未知である。トロンビン処理による MMP-9 産生・放出について BBB 構成細胞間において比較を行ったところ、BMECs、アストロサイトと比較して脳ペリサイトにおいて著しい MMP-9 の産生・放出がみられた(図 4A-4D)。また、この MMP-9 産生・放出は、PAR1 阻害剤の SCH79797 により一部抑制された(図 4E)。

(5) in vitro BBB モデルを用いた Na-F 透過性の評価および BMECs 細胞障害の評価

in vitro BBB モデルを用いて、トロンビン処理された脳ペリサイトが BBB のバリア機能に与える影響を調べた。トロンビンの abluminal side への処理により、co-culture でのみ、トロンビンの濃度依存的に Na-F の透過性が亢進した(図 5A)。この時、monolayer、co-culture とともに、BMECs の細胞障害はみられなかった(図 5C)。また、トロンビンの luminal side への処理では、monolayer、co-culture のいずれにおいても Na-F 透過性の亢進はみられなかった(図 5B)。

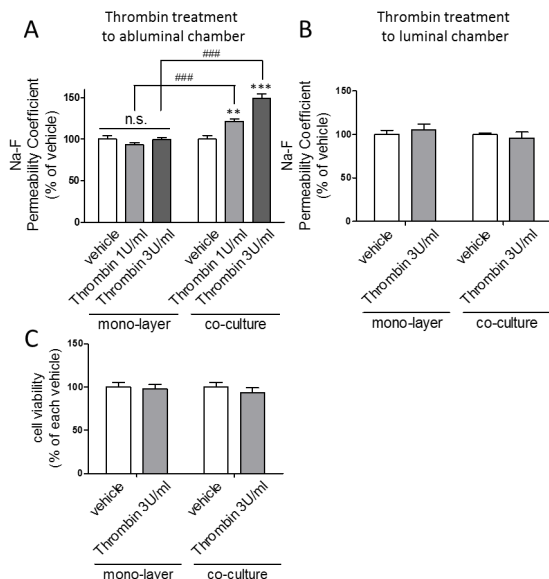


**図4. BBB 構成細胞間での MMP-9 産生・放出量の比較**

BMECs、アストロサイト、脳ペリサイトにトロンビン(1, 3, 10U/ml)を24時間処理し、培養上清中の MMP-9 産生・放出をウェスタンブロット法により評価した。脳ペリサイトにおいて著しい MMP-9 の産生・放出がみられた。脳ペリサイトに対する SCH79797 の前処理により、トロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出が一部抑制された。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle

(6) BMECs タイトジャンクションタンパクの局在変化

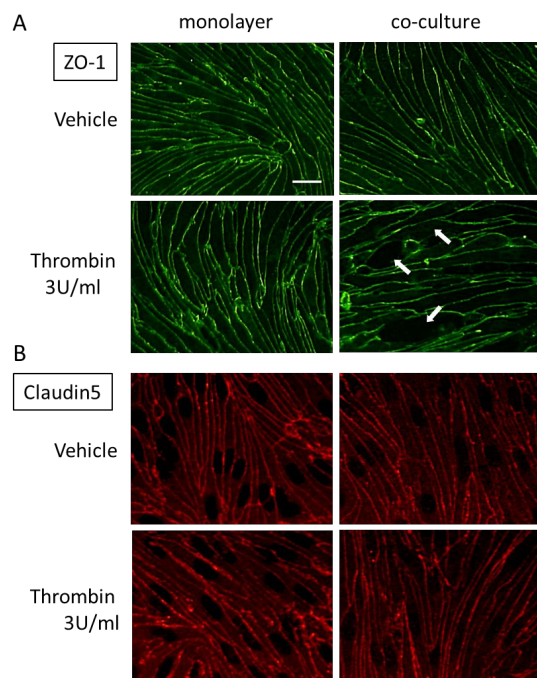
in vitro BBB モデルを用いて、トロンビン処理された脳ペリサイトが BMECs タイトジャンクションタンパクに与える影響を Claudin-5 および ZO-1 の免疫染色により評価した。ZO-1 では co-culture のトロンビン処理により局在変化がみられた(図 6A)。一方、Claudin-5 はいずれの群においても局在の変化がみられなかった(図 6B)。



**図5. in vitro BBB モデルを用いた Na-F 透過性の評価および BMECs の細胞障害の評価**

monolayer および co-culture in vitro BBB モデルを用いて Na-F の透過性を評価した。Abluminal side へのトロンビン(1, 3U/mL) 24 時間処理により、co-culture でのみ Na-F の透過性が増加した。トロンビン(1, 3U/mL) 24 時間処理では monolayer、co-culture ともに Na-F 透過性の亢進はみられなかった。Abluminal side へのトロンビン(3U/mL) 24 時間処理では、BMECs の細胞障害はみられなかった。

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. vehicle, ##p<0.01, ###p<0.001



**図6. BMECs タイトジャンクションタンパクの局在変化**

monolayer および co-culture in vitro BBB モデルの abluminal side にトロンビン(3U/mL) を 24 時間処理し、BMECs の ZO-1 および Claudin-5 の局在変化を免疫染色により評価した。ZO-1 では co-culture のトロンビン処理により局在変化がみられた(図 7A)。一方、Claudin-5 はいずれの処理においても局在の変化がみられなかった。

## 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)

(学会発表)(計1件)

町田崇、道具伸也、高田英友子、松本純一、竹之下恭代、山内淳史、片岡泰文. トロンビン誘発性血液脳関門障害における脳ペリサイトの関与. 第 86 回 日本薬理学会年会 2013 年 3 月 23 日 福岡

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

町田 崇 (MACHIDA, Takashi)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：30586144

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし