

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：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670033

研究課題名(和文) 分子動態リアルタイムイメージングによる骨髄幹細胞の血液脳関門通過機構の解析

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms for interaction between mesenchymal stem cells and blood brain barrier using real-time imaging

研究代表者

南 雅文(MINAMI, Masabumi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20243040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：BBBバリア機能制御に関わる分子を明らかにするため、アストロサイト条件培地中に含まれる液性因子を抗体アレイにより網羅的に解析し、インビトロBBBモデルを用いてバリア機能に及ぼす影響を検討した。検討した分子のうち、LIFがBBBバリア機能を低下させた。LIF同様にIL-6ファミリーに属するIL-6およびoncostatin Mについても検討したところ、oncostatin MはBBBバリア機能を低下させたが、IL-6は影響を及ぼさなかった。今後は、LIFやoncostatin MのBBBバリア機能制御機構を明らかにすることで、BBBバリア機能制御につながる知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We carried out antibody array analysis to identify the proteins contained in mouse astrocyte-conditioned medium (ACM), and examined the effects of those proteins on the blood-brain barrier (BBB) function using a mouse in vitro BBB model. We found that leukemia inhibitory factor (LIF) was contained in ACM and significantly attenuated barrier function. Because LIF belongs to Interleukin (IL)-6 family, we examined the effect of other family members IL-6 and oncostatin M on BBB function. Oncostatin M, but not IL-6, significantly attenuated barrier function. Further study for the molecular mechanism of the effects of LIF and oncostatin M may lead to development of the method to control BBB function.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経科学 移植・再生医療 薬学

1. 研究開始当初の背景

骨髄間質細胞に由来し多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は、採取が容易であり、かつ培養技術が確立している。また、自家移植が可能なことから拒絶反応を考慮する必要もないため臨床への応用が期待されている。実験動物での研究から脳梗塞後の神経障害に対する有用性が示されており、ヒトにおいてもその有用性が報告されている。静脈内投与された MSC の脳保護作用機構の全容を解明するためには、MSC の Blood-Brain barrier (BBB) 通過機構、脳傷害部位集積機構、ならびに神経細胞生存促進機構の3つの段階について分子メカニズムが明らかにされることが必要である。神経細胞生存促進機構については、従来型の分散共培養系を用いた研究手法でのアプローチが容易であり、MSC による神経細胞生存促進に関与する因子が複数報告されている。一方、BBB 通過機構と脳傷害部位集積機構、特に BBB 通過機構については、複数の細胞種からなる立体的な培養系での解析が必要であり、その分子機構はほとんど不明のままである。そこで我々は、脳微小血管内皮細胞 (BMEC) を用いたインビトロ BBB モデルを活用し、MSC の BBB 通過をリアルタイム観察で捉えることのできる実験系 (インビトロ BBB-MSC 観察システム) を構築した。

2. 研究の目的

本研究では、このインビトロ BBB-MSC 観察システムを活用し、蛍光タンパク融合機能分子作製と蛍光 Ca^{2+} イメージング技術を駆使することにより、MSC が BBB を通過する際の機能分子動態と細胞内情報伝達を可視化し、種々の薬理的・細胞生物学的解析により MSC の BBB 通過機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) BMEC の調製およびインビトロ BBB モデルの作製

雄性 Wistar/ST ラット (4-6 週齢) あるいは雄性 ICR マウス (4 週齢) から BMEC を調製し、コラーゲンあるいはマトリゲルでコーティングした多孔質細胞培養インサート (Transwell: ポアサイズ $0.4 \mu\text{m}$) upper チャンバーに、 $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の密度で播種することで作製した。

(2) 経内皮電気抵抗値 (TEER) 測定

Millicell[®] ERS および Endohm for 6 mm Culture Cup を用いて、電気抵抗値を測定し、TEER 値 ($\cdot \text{cm}^2$) を算出した。TEER の変化の指標として、Ratio of TEER = (培地交換後の TEER / 培地交換前の TEER) を算出した。各種リコンビナントタンパク質の効果の検討では、BMEC 播種 24 時間後に TEER を測定し、その直後に各種リコンビナントタンパク質を含む培地へ交換した。その後は 24 時間ごと、3 日間 TEER を測定した。

(3) MSC の調製および蛍光標識

4-6 週齢の雄性 Wistar/ST ラット大腿骨髄より MSC を調製し、レンチウイルスベクターを用いて ECFP により蛍光標識を行った。

(4) Venus-Claudin-5 および R-GECO の BMEC への導入

4-6 週齢の雄性 Wistar/ST ラットから単離した BMEC に組換えレンチウイルスを感染させることで、Claudin-5 と黄色蛍光タンパク Venus との融合タンパク Venus-Claudin-5 を発現させた。同様に、組換えレンチウイルスを用いて、赤色蛍光カルシウムセンサータンパク R-GECO を BMEC に発現させた。

(5) アストロサイト条件培地の調製

アストロサイトは生後 1-2 日齢のマウスの大脳皮質から単離した。培養 12-14 日後にエンリッチを行うことで高純度なアストロサイトを調製した。全ての細胞は 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。アストロサイトを 24 時間培養後に培養上清を回収した。回収した培養上清を $1,000 \text{ g}$ 、4、10 分間遠心し、その上清を条件培地として用いた。

(6) 抗体アレイ

抗体アレイによる条件培地中の液性因子量の測定は、RayBio[®] label-based (L-series) mouse antibody array L-308 membrane kit (マウス、308 種類の因子) を用いて網羅的に解析した。

4. 研究成果

レンチウイルスベクターを用いることにより、BMEC に、Claudin-5 と黄色蛍光タンパク Venus との融合タンパク Venus-Claudin-5 と赤色蛍光カルシウムセンサータンパク R-GECO を同時に発現させた。Venus-Claudin-5 の蛍光観察とカルシウムイオノフォア等による細胞内 Ca^{2+} イオン濃度上昇のリアルタイムイメージングに成功したため、インビトロ BBB-MSC 観察システムを用いて、CFP 標識の MSC との 3 蛍光リアルタイムイメージングを試みたが、Venus と CFP の蛍光イメージの分離が不十分であったこと、また、単位時間あたりの MSC の BMEC 層透過数が少なく、十分な数のデータ取得が困難であったことから、実験系の改良が必要となった。一方、実験の過程で、MSC の BBB 透過性が、Claudin-5 によるタイトジャンクション形成の程度、すなわち、BBB バリア機能に影響されることを示唆する観察結果が得られた。そこで、BBB バリア機能に影響を及ぼす因子を同定することにより、MSC の BBB 透過性の分子機構解明の手がかりが得られるものと考えられた。

アストロサイト培養上清 (条件培地) 中に BBB バリア機能に影響を及ぼす因子が含まれていることが予備的実験により明らかになったため、マウスアストロサイト条件培地に含有される液性因子を、抗体アレイにより網羅的に解析した。通常培地に含まれるタンパク量と比較し、45 種の液性因子がアストロサ

イト条件培地中で増加していることが明らかとなった(図1)。

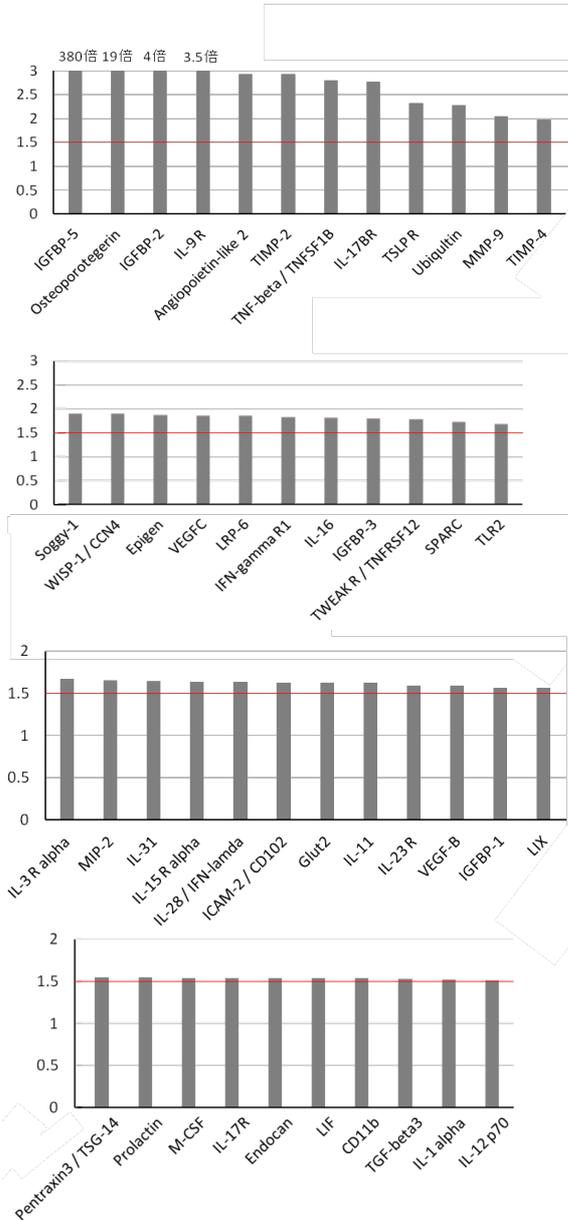


図1 アストロサイト条件培地中の液性因子
24 時間アストロサイトを培養した培養上清(アストロサイト条件培地)中の液性因子を抗体アレイにより網羅的に解析した。データは通常培地の液性因子のタンパク量を1とした際の比率で示している。1.5 を超える因子に関して増加したと判断した。

そこでまず、抗体アレイにおいて増加が認められた因子のうち、再現性が高かった因子を中心とした液性因子に注目し、M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein 2), TIMP4 (metalloproteinase inhibitor 4), CXCL14 (chemokine (C-X-C motif) ligand 14), FSTL1 (follistatin-like protein 1), pentraxin3, LIF (leukemia inhibitory

factor), angiopoietin-like protein 2, endocan について、リコンビナントタンパク質をインビトロ BBB モデルに処置し、BBB バリア機能への影響を検討した(図2)。これら液性因子のうち LIF は BBB のバリア機能を有意に低下させた。

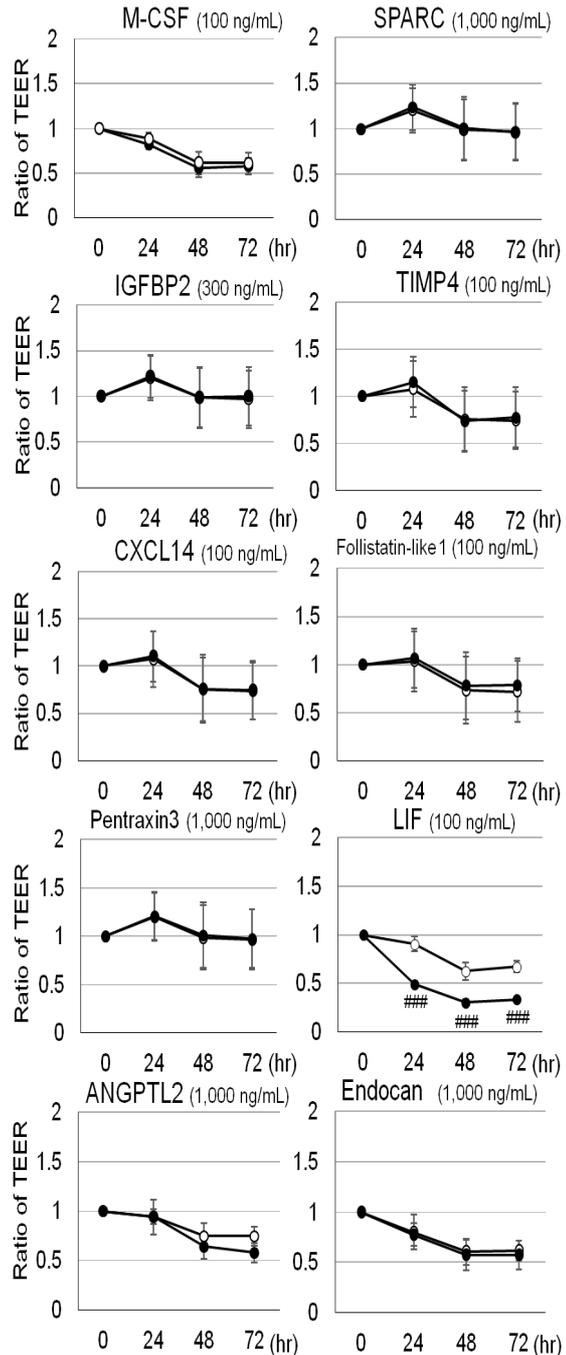


図2 アストロサイト条件培地で増加する液性因子が BBB バリア機能に及ぼす影響

マウスインビトロ BBB モデルに、アストロサイト条件培地で増加する液性因子のリコンビナントタンパク質を処置し TEER を測定した。データは培地交換前(0 h)の TEER を baseline としたときの比率で示している (open circle, vehicle; closed circle, リコンビナントタンパク質; n = 2-4, ### P < 0.001 vs control)。

さらに、抗体アレイにおいて著しい増加が認められた IGFBP5 と osteoprotegerin, angiopoietin-like protein 4、BBB バリア機能を向上させる報告がある GDNF、LIF と同じ IL-6 ファミリーに属するサイトカインである IL-6 ならびに oncostatin M についても BBB バリア機能に対する影響を検討した(図3)。これら 6 種類のリコンビナントタンパク質の内、oncostatin M は BBB バリア機能を有意に低下させた。

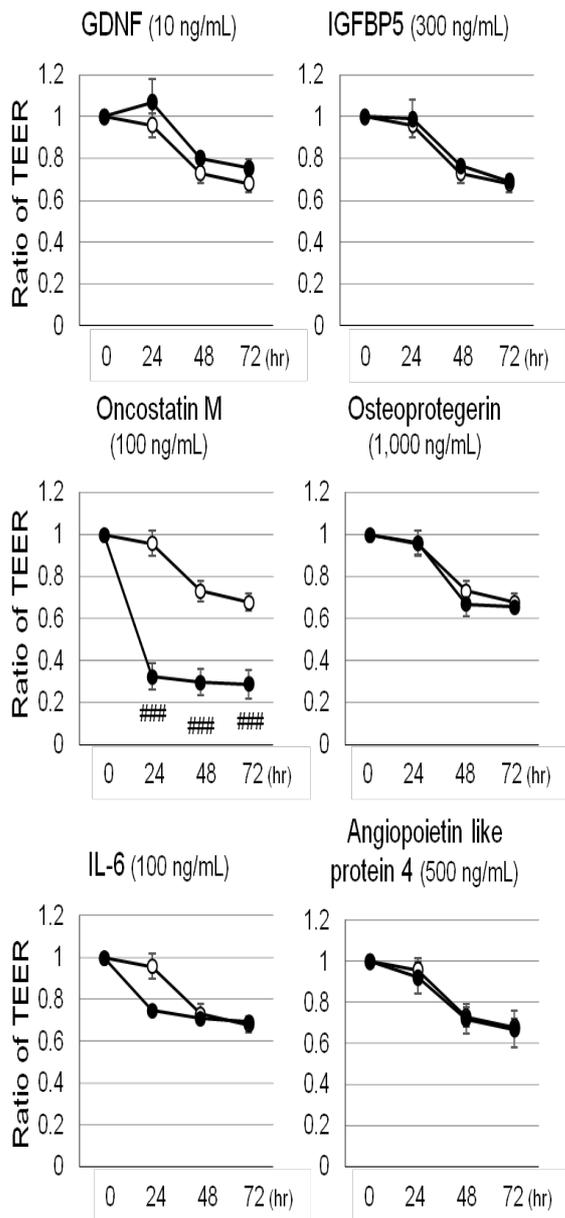


図3 各種リコンビナントタンパク質が BBB バリア機能に及ぼす影響

マウスインビトロ BBB モデルに対し、各種リコンビナントタンパク質を処置し TEER を測定した。データは培地交換前 (0 h) の TEER を baseline としたときの比率で示している (open circle は vehicle、closed circle はリコンビナントタンパク質。n = 2-4, ### P < 0.001 vs control)。

以上の結果より、アストロサイト条件培地に含まれる液性因子のうち、LIF が BBB バリア機能を調節していることが明らかとなった。また、LIF 同様 IL-6 ファミリーに属するサイトカインである oncostatin M も BBB バリア機能調節に関わることが明らかとなった。一方で、同じく IL-6 ファミリーに属するサイトカインである IL-6 は BBB バリア機能に影響を与えなかった。IL-6 は、LIF や oncostatin M と受容体サブユニット構成が異なるため、今後、BMEC における受容体各サブユニットタンパク質の発現を検討することにより、これら IL-6 ファミリーに属するサイトカイン類の作用の相違の原因が明らかになることが考えられる。

本研究により、IL-6 ファミリーに属するサイトカインである LIF と oncostatin M が BBB バリア機能を低下させることが明らかとなった。BBB バリア機能を亢進させる因子を見いだすことで、BBB 機能を正および負に制御できる可能性がある。今後、BBB 機能の低下や亢進が MSC の BBB 通過に及ぼす影響を検討することで、MSC の BBB 通過制御につながる知見を得ることができると期待される。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) 磯有希奈、松原滉、出山諭司、片山貴博、南雅文、血液脳関門バリア機能に対するニコチンの作用、第 23 回日本臨床精神薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同学会、2013 年 10 月 24-26 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 雅文 (MINAMI MASABUMI)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：20243040

(2)

磯 有希奈 (ISO YUKINA)

松原 滉 (MATSUBARA AKIRA)

南島 拓矢 (MINAMISHIMA TAKUYA)