

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462167

研究課題名(和文)スフィンゴシン1リン酸による血液脳関門(BBB)機能制御の解明

研究課題名(英文)Roles of sphingosine-1-phosphate on the blood-brain barrier

研究代表者

中川 慎介(NAKAGAWA, Shinsuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：10404211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、脂質メディエーターの一つであり、免疫細胞や血管内皮細胞の機能調節に重要な役割を果たしている。S1Pが血液脳関門(BBB)の機能制御に関与するかを検討するために、in vitro BBBモデルを作製し、正常培養時と低酸素培養時におけるS1Pの影響を検証した。正常培養下でS1Pは、バリアー機能を低下させた。また、低酸素負荷時では、S1P産生の増加が観察された。S1Pシグナルの抑制薬を処理すると、低酸素負荷で誘導されるバリアー機能の低下が抑制された。以上のことから、S1Pは正常時および病態時においてBBB機能調節に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The bioactive sphingolipid metabolite, sphingosine-1-phosphate (S1P), is known as regulator of many physiological and pathophysiological processes. We examined the effects of S1P on barrier functions using an in vitro blood-brain barrier (BBB) model. S1P decreased transendothelial electrical resistance (TEER) and increased the permeability of sodium fluorescein under normal culture condition. Next, we examined the role of S1P on BBB function under oxygen glucose deprivation (OGD)/ reoxygenation condition. OGD/reoxygenation induced the increment of S1P production in endothelial cells, pericytes and astrocytes. OGD/reoxygenation decreased the BBB barrier function. However, treatment of inhibitors of S1P synthesis enzyme or S1P transporter improved the BBB dysfunction induced by OGD/reoxygenation. Thus, inhibition of S1P signaling is considered to improve blood-brain barrier dysfunction induced by oxygen glucose deprivation.

研究分野：血液脳関門学

キーワード：血液脳関門 スフィンゴシン1リン酸 タイトジャンクション スフィンゴシンキナーゼ プロブコール
虚血再灌流 ABCA1

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管・免疫系で重要な役割を担う、脂質メディエーターのスフィンゴシン1リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) が、発生段階の血管形成で重要な役割を担うことは知られていた。しかし、成熟した血管や病態時における血管機能での役割については不明な点が残されている。

(2) 我々は血管の中でも、特に血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) 機能における S1P の役割に注目した。BBB は、関門としての静的な役割だけでなく、Neurovascular unit の一員として神経細胞と積極的にクロストークを行っており、その機能破綻は中枢性疾患の進展に深く関わっている。BBB の機能制御は構成細胞同士のクロストークや循環血液中に含まれる様々な因子によって行われており、S1P が BBB の機能調節に関係することが推察されるものの、十分な検討はなされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、in vitro BBB 再構成モデルを用いて、脂質メディエーターのスフィンゴシン1リン酸 (S1P) が、BBB 機能調節の一因となりうるか検証した。生理的な条件下での BBB 構成細胞における S1P 関連分子の発現形式の解析と、S1P が BBB 機能へ与える影響を検討した。

(2) 生理的条件下に加え、BBB 障害モデル (虚血再灌流モデル) を用いて、S1P がそのバリアー機能に与える影響を検討した。また、BBB の機能障害を軽減する S1P シグナル調節薬の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 初代培養細胞、in vitro BBB モデル
Wistar ラットより、脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトを単離培養し Transwell® または Millicell® を用いて共培養し、in vitro BBB モデルとした。

(2) BBB 機能評価

EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた、経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) 測定

sodium fluorescein (小分子 (376Da) の paracellular transport

Immunoblot, immunostaining 法にてタイトジャンクションタンパク (claudin-5, occluding, ZO-1) の発現解析。

PCR による受容体や産生酵素の発現解析

(3) BBB 障害モデルの作製

脳虚血再灌流 BBB モデルの作成

(a) Normoxia 群: 血清なしの DMEM (glucose 4.5g/L) に交換し、通常 (95% air-5% CO₂) の培養環境で培養した。

(b) Hypoxia 群: 血清なしの DMEM (glucose free) に交換し、酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を行う。CO₂ インキュベーターで 3 ~ 6 時間インキュベートする。再還流は通常の培養液に交換する事で作製した。

4. 研究成果

(1) BBB 構成細胞 (脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト) での、S1P 関連分子の発現解析

PCR を用いて、S1P 受容 (S1PR1~S1PR5) と S1P 産生酵素 (Sphk1, Sphk2) S1P の細胞外輸送を担うトランスポーター (ABCA1, Spns2) の発現を解析した。発現量の差はあるものの、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの BBB 構成細胞に、S1P 関連分子の発現が確認できた。

(2) S1P の BBB 機能への影響

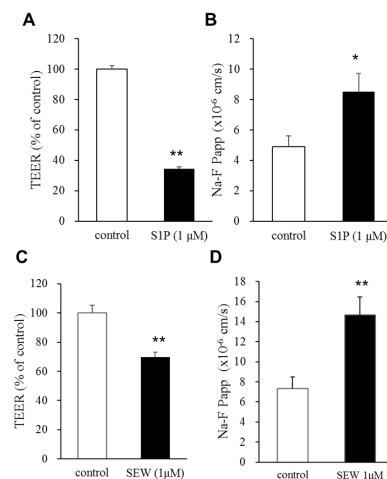
S1P を BBB モデルに添加すると、バリアー機能の指標である TEER の減少と低分子化合物 (Na-F) の透過性上昇が観察された (図 1A, B)。

S1P の受容体の一つである、S1PR1 に対する選択的刺激薬 (SEW2871) でも、同様に TEER の減少が生じた (図 1C, D)。

S1P や SEW2871 はタイトジャンクションタンパク質の claudin-5 や occludin を減少させた。

以上のことから、S1P は生理的な条件下において、BBB のバリアーを低下させることが判明した。

図 1 S1P、SEW2871のBBB機能への影響



(3) 虚血下での、S1P 関連分子の発現解析

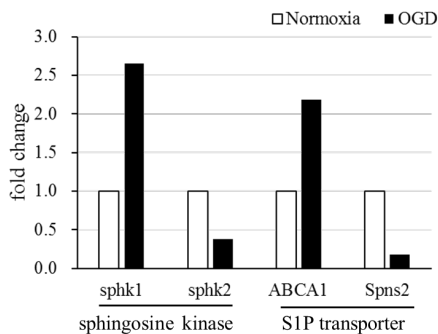
脳毛細血管内皮細胞に低酸素負荷を行い、PCR で S1P 関連分子の発現を

検討した。S1P の産生酵素である Sphk1 と、細胞外輸送担体である ABCA1 の発現が亢進していた(図2)。

虚血再灌流後に、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの培養上清中の S1P 濃度を ELISA で測定すると、S1P の産生が増大していた。

以上のことから、虚血再灌流時には、S1P シグナルの亢進が起こっていると考えられた。

図2 低酸素負荷によるS1P関連分子の発現変動



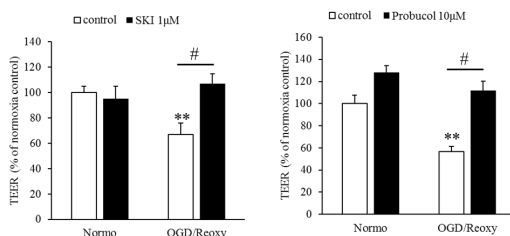
(4) 虚血再灌流モデルにおける、S1P シグナルの抑制がバリアー機能におよぼす影響

虚血再灌流により S1P の亢進が起こっていることから、S1P の産生抑制が BBB の障害にどのように影響するかを検討した。

S1P の産生酵素阻害薬 (SKI-II) や細胞外への輸送担体の阻害薬 (Probuco) の処理により、虚血再灌流で生じたバリアー機能の低下が抑制された(図3)。

SKI-II の処置により虚血再灌流障害で生じた occludin の発現不全が解消された。

図3 虚血再灌流時におけるS1P抑制薬の効果



以上の結果より、S1P は BBB の機能調節に重要な働きを担っていることが判明した。さらに、虚血再灌流障害時には、BBB 構成細胞間の S1P シグナルの亢進により、BBB のバリアー機能が低下するものと考えられた。また、この障害は臨床で用いられている、プロブコールにより改善することが判明した。

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 2件)

Fukuda S, Nakagawa S, Tatsumi R, Morofuji Y, Takeshita T, Hayashi K, Tanaka K, Matsuo T, Niwa M. Glucagon-Like Peptide-1 Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells Under Basal and Hyperglycemia Conditions. *J Mol Neurosci*. 2016, 59(2): 211-219 (査読有) (DOI: 10.1007/s12031-015-0696-1)

So G, Nakagawa S, Morofuji Y, Hiu T, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Matsuo T, Niwa M. Candesartan Improves Ischemia-Induced Impairment of the Blood-Brain Barrier In Vitro. *Cell Mol Neurobiol*. 2015, 35: 563-572 (査読有) (DOI: 10.1007/s10571-014-0152-8)

[学会発表](計 10件)

中川慎介: 血液脳関門の成り立ちとその病態. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017年3月28-30日, 長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市)

中川慎介, 有賀純: 血液脳関門の虚血再灌流障害におけるスフィンゴシン 1-リン酸の役割. 第90回薬理学会年会, 2017年3月15-17日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

巽理恵, 前田肇, 中川慎介, 堀江信貴, 有賀純: ラット脳梗塞モデルにおける多能性幹細胞由来血管内皮細胞とペリサイト細胞移植の効果. 第90回薬理学会年会, 2017年3月15-17日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

渡邊大祐, 中川慎介, Deli Maria, 井澤賢, 有賀純, 丹羽正美: 初代培養サル脳毛細血管内皮細胞を用いた新規長類型インヴィトロ血液脳関門モデル. 第90回薬理学会年会, 2017年3月15-17日, 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

中川慎介, 有賀純: スフィンゴシン 1-リン酸経路の抑制は虚血再灌流による血液脳関門機能障害を軽減する. *STROKE*2016, 2016年4月14-16日, ロイトン札幌(北海道・札幌市)

中川慎介, 福田修志, 巽理恵, 諸藤陽一, 林健太郎, 丹羽正美: グルカゴン様ペプチド-1 は血液脳関門機能を強化する.

第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

中川慎介, 有賀純: In vitro 血液脳関門モデルを用いたスフィンゴシン 1-リン酸の役割. 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会, 2015 年 10 月 30-31 日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)

渡邊大祐, 諸藤陽一, 竹下朝規, 蓬萊彰士, 中川慎介, 丹羽正美: インヴィトロ血液脳関門モデルを用いた脳血管障害の薬理的解析. 第 40 回日本脳卒中学会総会, 2015 年 3 月 26-29 日, リーガロイヤル広島 (広島県・広島市)

福田修志, 中川慎介, 竹下朝規, 諸藤陽一, 林健太郎, 永田泉, 丹羽正美: 糖尿病性血液脳関門 (BBB) 機能障害モデルに対する保護薬の探索. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18-20 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

巽理恵, 中川慎介, 鈴木豊, 有賀純: Embryonic stem cells and their derivative neural progenitor cells enhance blood-brain barrier properties of monkey brain capillary endothelial cells. 12th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research. 2014 年 6 月 18-21 日, バンクーバー (カナダ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/index.html>

6. 研究組織

中川 慎介 (NAKAGAWA, Shinsuke)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・
講師

研究者番号: 10404211