

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630101

研究課題名(和文) 衝撃圧力が血液脳関門のバリア機能破綻に及ぼす影響の評価

研究課題名(英文) Evaluation of the effect of impulsive pressure on the disruption of barrier function of blood-brain barrier

研究代表者

青村 茂 (AOMURA, Shigeru)

首都大学東京・システムデザイン研究科・教授

研究者番号：20281248

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)：血液脳関門(BBB)は、血液から中枢神経系に取り入れる物質の選択や、血液中に有害と判断される物質が存在した場合、脳や脊髄への侵入を防ぐ脳毛細血管の機能である。頭部外傷時に頭蓋内で発生する衝撃圧力とBBB破綻のメカニズムを明らかにするため、BBBを構成する脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトを播種したin vitro BBBモデルに衝撃圧力を負荷し、BBBのバリア機能を経内皮電気抵抗値(TEER)で評価した。衝撃圧力が脳毛細血管のバリア機能を低下させ、BBBの破綻に繋がることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is better understanding of the effect of impulsive pressure during head impact on the disruption of blood-brain barrier (BBB) that forms a physical barrier to filter between the blood and the brain parenchyma. Following impulsive pressure loading, transendothelial electrical resistance (TEER) was measured using the in vitro BBB models consisting of cultured endothelial cells, pericytes and astrocytes from rat brain capillaries. In the result, TEER decreased immediately after loading and the decrease in TEER was larger in the co-culture model with endothelial cells and astrocytes than in the endothelial monolayer model or the co-culture model with endothelial cells and pericytes. These results suggest that the impulsive pressure during head impact impair endothelial barrier function by the disruption of the integrity of endothelial cell-cell junctions, and the degree of increase in endothelial permeability depends on injured cells that compose BBB.

研究分野：バイオメカニクス、機械工学

キーワード：毛細血管 衝撃圧力 組織崩壊 脳内点状出血

1. 研究開始当初の背景

交通事故などによる頭部外傷では頭蓋内圧力が急激に変動し、脳毛細血管の血液脳関門 (BBB) のバリア機能が破綻し、脳浮腫や脳出血を引き起こす。これまでに、BBB の主構成要素の血管内皮細胞に衝撃圧力を加え、細胞間の結合力の低下が血液構成要素の漏出に至る可能性を示した。しかし従来の BBB 培養モデルでは、BBB 構成要素の血管内皮、ペリサイト、アストロサイトの 3 細胞のうちアストロサイトは異なる培養面に接着しており、3 細胞同時に圧力を負荷する衝撃試験ができないために、BBB 破綻の詳細なメカニズムは明らかになっていない。本申請研究では、3 細胞の多層化を図り、アストロサイト層をペリサイト層に接着させた 3 層 BBB 培養モデルを構築して衝撃圧力を加え、BBB の破綻と脳浮腫や脳出血に至るメカニズムを力学的に解明する。

2. 研究の目的

血液脳関門 (BBB) は、脳と脊髄に血液を供給する毛細血管を構成する血管内皮細胞とそれを囲むアストロサイトとペリサイトの配列構造からなる機能で、血液から中枢神経系に取り入れる物質の選択や、血液中に有害と判断される物質が存在した場合、脳や脊髄への侵入を防ぐ機能を持つ。交通事故などによる頭部外傷は、BBB の破綻を引き起こし、血管透過性が亢進することで血液構成要素が漏出し、血管原生浮腫に至ることが知られている。一方、頭部外傷時の頭蓋内では、圧縮や引張りの圧力が瞬間的に発生することが屍体実験や数値解析により報告されており、本研究室においても脳挫傷の症例解析により、脳表面の出血部位において頭部外傷による衝撃圧力の発生を確認している。しかし、頭部外傷時に頭蓋内で発生する衝撃圧力と BBB 破綻の関係性は不明瞭であることから、本研究では、衝撃圧力と BBB 破綻のメカニズムを明らかにするため、血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトを播種した *in vitro* BBB モデルに衝撃圧力を負荷し、BBB 破綻に関する内皮細胞間の接着タンパク質の低下を経内皮電気抵抗値 (TEER) を測定することで評価した。

3. 研究の方法

in vitro BBB モデルは生体外 (*in vitro*) で血液脳関門 (BBB) を模擬した試験モデルであり、薬理試験等で広く使用されている。本研究では、ラット脳毛細血管内皮細胞のみの単層モデル (E00 モデル)、ラット脳内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトの 3 種を共培養したモデル (EPA モデル)、ラット脳内皮細胞、アストロサイトの 2 種を共培養したモデル (EA モデル)、ラット脳内皮細胞、ペリサイトの 2 種を共培養したモデル (EP モデル) の計 4 種のモデルを用いた。単層モデルは、ラット脳毛細血管内皮細胞を 3.0 μm の小孔

を持つセルカルチャーインサートに、播種密度 2.5×10^5 cells/insert で播種し、12 ウェルマイクロプレートと組み合わせる。温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 100%、 CO_2 5% 下でコンフルエントになるまで培養し、7 日以内に使用した。EPA モデルは、3.0 μm の小孔を持つセルカルチャーインサート内部底面にラット脳毛細血管内皮細胞、インサートの外部底面にラットペリサイトを培養し、ラットアストロサイトを培養したカバーガラスをウェル底面に設置したマイクロプレートと組み合わせる。EA モデル、EP モデルではセルカルチャーインサート内部底面にラット脳毛細血管内皮細胞、インサート外部底面にラットアストロサイトまたはラットペリサイトを培養し、マイクロプレートと組み合わせる。内皮機能評価には、TEER 測定を使用した。細胞層に低周波電流を流すことで、細胞を傷つけることなく、細胞外抵抗値の測定を可能にし、TEER は内皮細胞間の接着タンパク質の発現量に依存する。TEER 値測定には EVOM2 と EndOhm を組み合わせて使用した。TEER 値は、作成した *in vitro* BBB モデルのインサートの測定値より、細胞を培養していないインサートの測定値を減算後、培養面積を積算して算出した。本研究では外傷性脳損傷による BBB の破綻を、衝撃圧力負荷装置を用いて再現した。図 1 に装置の概略図を示す。本装置は、液体に衝撃を伝播させることで細胞に与えるひずみを最小限にし、圧力負荷による影響を検討することが可能である。装置の仕組みは、水で満たしたシリンダーをピストンで圧縮することによって、シリンダーに接続されたチャンバー内の細胞に衝撃圧力を負荷する。

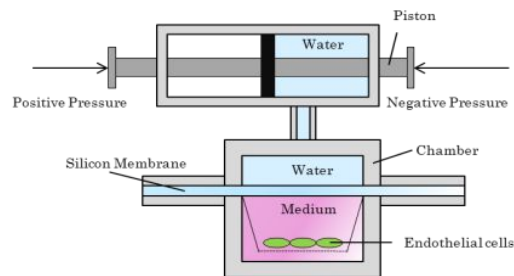
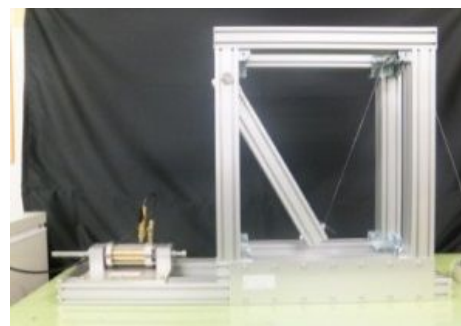


Figure 1 Diagram of pressure loading system using a pendulum (upper) and cross-section of chamber and cylinder (lower)

4. 研究成果

静置培養における TEER の測定結果を図 2 に示す。類似研究で用いられている *in vitro* BBB モデルの TEER は $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上である。本実験では、*in vitro* BBB モデルの TEER が $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上であることを確認し、培養から 5 日目に最大圧力、正圧 350 kPa、持続時間 20 ms を負荷した。TEER は負荷前、負荷直後、1 日後、2 日後に計測した。図 3 にモデルに負荷した衝撃圧力波形を示す。

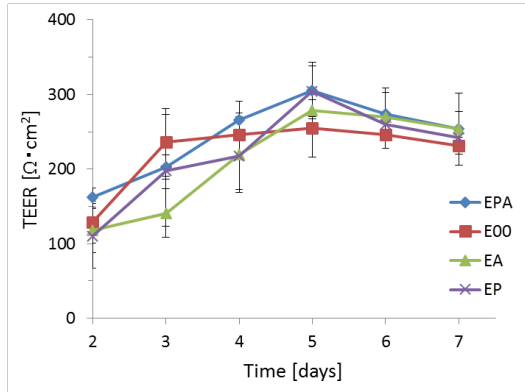


Figure 2 Time course of TEER in static culture

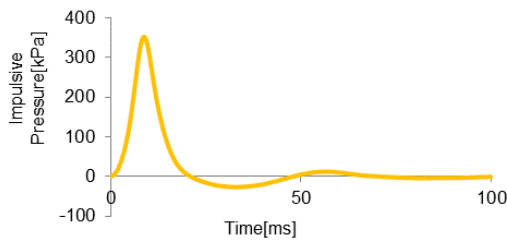
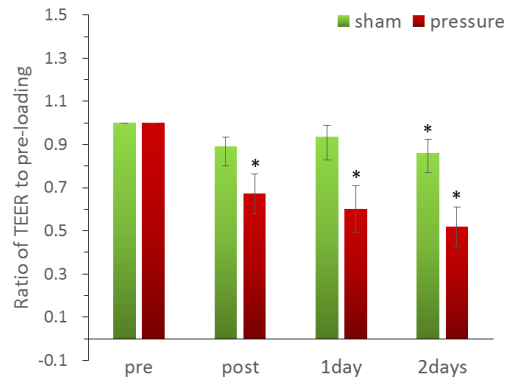


Figure 3 Waveform of Impulsive Pressure

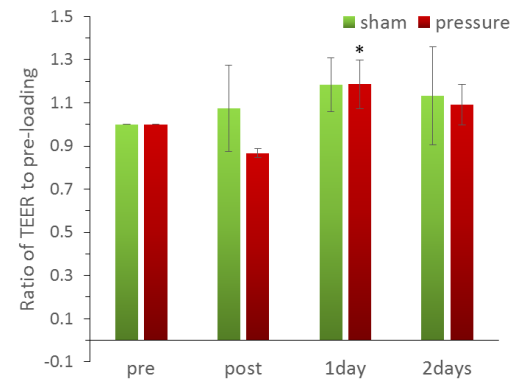
TEER の上昇を確認後、培養から 5 日目に衝撃圧力を負荷した。図 4 に実験結果を示す。単層 (E00) モデルでは、衝撃圧力負荷直後、負荷前と比べ TEER が 13% 減少した。これに対し 3 種共培養 (EPA) モデルでは負荷直後、負荷前と比較し TEER が 33% 減少した。また、2 種共培養モデルでは内皮細胞とアストロサイトの共培養 (EA) モデルの TEER が 40% 減少したが、内皮細胞とペリサイトの共培養 (EP) モデルでは TEER が 8% 減少した。3 種共培養モデルでは、2 日後まで TEER が減少し続けたが、その他のモデルでは負荷 1 日後には TEER 値が負荷前と同じ割合まで回復した。各モデルの TEER 値減少において大幅な減少を示したのは 3 種共培養モデル、内皮細胞とアストロサイトの 2 種共培養モデルである。大幅な減少を示さなかったモデルとの違いはアストロサイトの有無が挙げられる。類似研究では、ディッシュ上に培養したアストロサイトに衝撃圧力を負荷し結果、生存遺伝子の発現が増加しアポトーシス遺伝子が抑制されるという報告や、脳損傷マウスモデルで細胞間結合を構成するタンパク質 claudin-5 を阻害すると脳浮腫の生成が軽減さ

れるという報告がある。以上からアストロサイトを含む共培養モデルにおいて、衝撃圧力の影響を受けた内皮細胞に対しアストロサイトが活性化され、細胞間接着タンパク質の発現を変化させた可能性が考えられる。

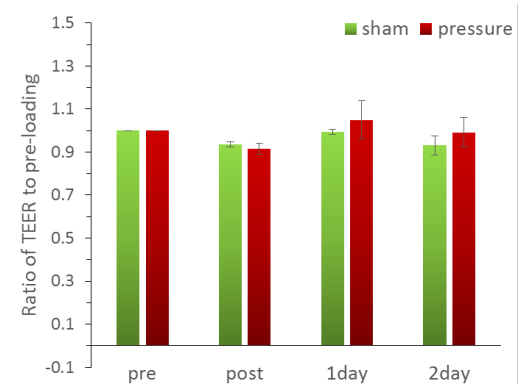
本研究は、脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトの組み合わせが異なる 4 種の *in vitro* BBB モデルに衝撃圧力を負荷し、アストロサイトが存在するモデルにおいて TEER 値が有意に減少した。本結果より、頭部外傷により頭蓋内に発生する衝撃圧力が脳毛細血管の内皮細胞間接着結合を低下させ、内皮透過性が亢進することで、BBB を破綻させる可能性を示した。



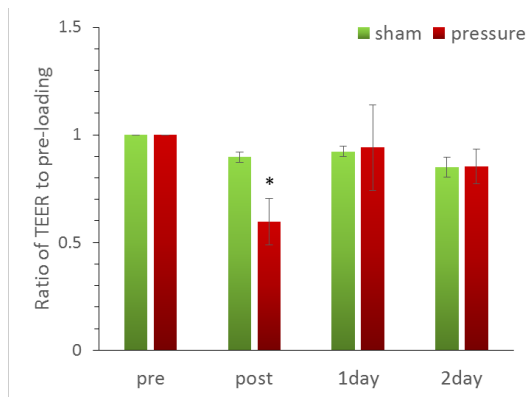
(a) Co-culture model of endothelial cells, pericytes and astrocytes (EPA model)



(b) Monolayer model of endothelial cells (E00 model)



(c) Co-culture model of endothelial cells and pericytes (EP model)



(d) Co-culture model of endothelial cells and astrocytes (EA model)

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 8 件)

秋山剛, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 10msec 超短時間負圧発生装置の設計・製作と血管内皮細胞への衝撃負荷実験, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月, 東京.

大津英理子, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃圧力を受ける血液脳関門の耐性評価による血管原生浮腫のメカニズムの解明, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月, 東京.

中楯浩康, 大津英理子, 青村茂, 角田陽, 衝撃圧力負荷による毛細血管様構造の崩壊と血管内皮透過性の亢進, 日本機械学会 2015 年度年次大会, 2015 年 9 月, 北海道.

Eriko OTSU, Risa KAWAMATA, Hiromichi NAKADATE, Shigeru AOMURA, Akira KAKUTA, Caroline DECK, Remy WILLINGER, Evaluation of increased endothelial permeability by exposure to impulsive pressure with in vitro blood brain barrier model, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, September 2015, Hokkaido, Japan.

秋山剛, 山田昂, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 頭部外傷研究のための超短時間負圧発生装置の開発, 日本機械学会関東学生会第 54 回学生員卒業研究発表講演会, 2015 年 3 月, 横浜.

川股理沙, 大津英理子, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた衝撃圧力負荷による血管内皮透過

性亢進の評価, 日本機械学会第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 2015 年 1 月, 新潟.

大津英理子, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃圧力がラット脳毛細血管の内皮細胞間接着に与える影響, 日本機械学会第 25 回バイオフィロンティア講演会, 2014 年 10 月, 鳥取.

山田昂, 秋山剛, 青木崇将, 中楯浩康, 青村茂, 超短時間の負圧を発生させる実験装置の開発, 日本機械学会第 25 回バイオフィロンティア講演会, 2014 年 10 月, 鳥取.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青村 茂 (AOMURA, Shigeru)
首都大学東京・システムデザイン研究科・教授

研究者番号: 20281248

(2) 研究分担者

角田 陽 (KAKUTA, Akira)
東京工業高等専門学校・機械工学・准教授
研究者番号: 60224359

中楯 浩康 (NAKADATE, Hiromichi)
首都大学東京・システムデザイン研究科・助教
研究者番号: 22604991