

氏 名・(本籍)	たか はし ひろ ゆき 高 橋 弘 之 (宮崎県)		
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)		
報 告 番 号	甲第1562号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)		
学位論文題目	Neurovascular unit における脳ペリサイトの 役割ー脳ペリサイト -Neurovascular unit構成 細胞間の液性因子を介したクロストークー		
論文審査委員	(主 査)	福岡大学	教 授 片 岡 泰 文
	(副 査)	福岡大学	教 授 三 島 健 一
		福岡大学	准教授 道 具 伸 也

内 容 の 要 旨

近年、脳疾患の病態理解を包括的に理解するために、神経細胞の単一細胞種だけでなく、脳微小血管に存在する血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の構成細胞である脳血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトおよび脳内免疫担当細胞であるミクログリアも含めた機能構造体として neurovascular units (NVU) が提唱されている。NVU を構成する多様な細胞間の相互作用 (クロストーク) の上に脳の生理的および病態生理的機能は成立する。NVU の機能不全、すなわち構成細胞の誤った情報伝達や機能障害は脳卒中のみならず、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症など多くの神経疾患における病態進展への関与が示されている。

BBB は血液と脳や脊髄を含む中枢神経系 (central nervous system; CNS) の組織液との間の物質交換を制御する機構であり、外傷や病原体から CNS を保護する機能を有する。また、神経細胞間のシナプス伝達やシナプスのリモデリング、血管新生や神経新生などに関与していると言われており、CNS の環境の恒常性を高度に維持している。脳ペリサイトは脳血管内皮細胞と基底膜を共有して BBB を構成している細胞で、細胞外マトリックスの形成を促進し、基底膜を保持することにより血管形成に大きな役割を果たしている。また、脳ペリサイトは自身が産生する液性因子 (例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF)、transforming growth factor (TGF)- β 、plasminogen activator inhibitor (PAI-1)) を介して脳血管内皮細胞へ情報伝達することで BBB 機能のアップレギュレーションをもたらす。さらに、炎症性サイトカインの中で、脳卒中などの脳障害時に産生される炎症調節因子の一つである TNF- α に特異的に反応し、matrix metalloproteinase (MMP) -9 を産生する。このように、脳ペリサイトは様々な液性因子を介したオートクリン/パラクリン作用を持つことが示されているが、NVU 構成細胞間のクロストークは十分には解明されていない。

そこで、本研究では、第一章において脳血管内皮細胞上の接着分子や免疫担当細胞の脳浸潤に着目

し、炎症状態下における脳ペリサイトの関与や役割を明らかにすることを企てた。第二章では脳ペリサイトの脳内炎症への関与を明らかとするため、サイトカイン/ケモカイン産生能およびミクログリア活性化作用を指標とし、炎症状態下における各BBB細胞との比較検討を行った。第三章にて視床下部神経細胞の摂食調節シグナルに着目し、脳ペリサイト由来液性因子の関与を検討した。

第1章 脳ペリサイトによる免疫担当細胞の脳浸潤抑制機構

(1) TNF- α による MBEC4 における接着分子発現へのペリサイトの関与

マウス脳血管内皮細胞株単独培養系 (MBEC4 monolayer) とマウス脳血管内皮細胞-ラット脳ペリサイト共培養系 (MBEC4/Pericyte co-culture) の2種類の in vitro BBB モデルを作製し、炎症性サイトカインとして TNF- α を BBB モデルの血液側に負荷した時の脳血管内皮細胞上の接着分子 (E-Selectin, ICAM-1 および VCAM-1) の発現量を比較検討した。TNF- α は、MBEC4 monolayer の ICAM-1 および VCAM-1 の発現を増加させたが、MBEC4/Pericyte co-culture において、その増加は抑制された (Fig. 1)。また、このとき MBEC4/Pericyte co-culture では単球・マクロファージ細胞株 (J774A.1) の浸潤が有意に抑制された。

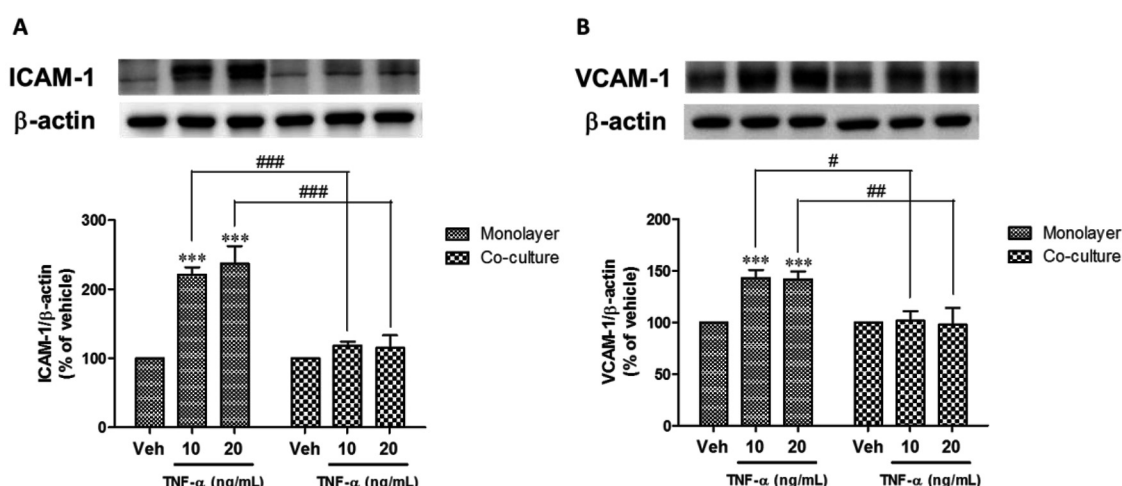


Fig. 1 Effect of TNF- α on expression of cell adhesion molecules on MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α for 24 hr. ICAM-1 (A), and VCAM-1 (B) were detected by western blot. Relative intensity was calculated as ratio of arbitrary densitometric units of adhesion molecule to that of β -actin. Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM. * p <0.05, *** p <0.001 vs vehicle. # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001 vs each corresponding TNF- α -treated group.

(2) 脳ペリサイトによる接着分子発現抑制機構の探索

MBEC4 monolayer に p 38 MAPK 阻害剤 (SB203580) および NF κ B 阻害剤 (BAY11-7821) をそれぞれ処理したところ、TNF- α による ICAM-1 および VCAM-1 発現量の増加が抑制された。実際に、MBEC4 monolayer で認められた TNF- α による脳血管内皮細胞の p38 MAPK 及び NF κ B の活性化亢進が、MBEC4/Pericyte co-culture において抑制された。さらに TGF- β 1 は、MBEC4 monolayer における TNF- α 誘発性 ICAM-1 および VCAM-1 発現量増加を抑制した。

【考察】脳ペリサイトは炎症性サイトカインによる脳血管内皮細胞の p38 MAPK および NF κ B の活性化を抑制し、それに続く脳血管内皮細胞膜の接着分子発現量の増加および免疫担当細胞の脳実質浸潤を阻止していることが示唆された。またこの抑制過程に TGF- β 1 が関与していると考えられた。

第2章 脳ペリサイトによる TNF- α 誘発性のミクログリア活性化亢進

(1) TNF- α 刺激による NVU 構成細胞からのサイトカインおよびケモカインの放出

TNF- α 刺激された初代培養した脳血管内皮細胞 (RBEC)、脳ペリサイト、アストロサイトおよびミクログリアの培養上清中の20種類のサイトカインおよびケモカインレベルを MilliplexTM MAPCytokine/Chemokine Panel (Millipore, Schwalbach, Germany) を用いて測定した。ペリサイトへの TNF- α (20 ng/mL) の24時間刺激は、MCP-1、MIP-1 α 、GRO/KC、RANTES、IP-10、IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-12p70、IL-5、IL-17、IL-13 および granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) の放出を有意に増大させた。また、他の NVU 構成細胞である RBEC、アストロサイト、ミクログリアと比較して、ペリサイトは TNF- α 刺激による MIP-1 α および IL-6 の放出レベルが最も高かった。

(2) TNF- α 刺激による BV-2 の IL-1 β 、TNF- α 、iNOS mRNA 発現量比較検討

脳ペリサイト / ミクログリア細胞株 BV-2、アストロサイト / BV-2 および RBEC / BV-2 共培養モデルを作成し、TNF- α 誘発性 BBB 構成細胞によるミクログリアの活性化を比較検討した。TNF- α 刺激脳ペリサイトは、BV-2 ミクログリアの活性化の指標である iNOS および IL-1 β mRNA 発現量を有意に増加させた (Fig. 2)。脳ペリサイトによる BV-2 ミクログリアの iNOS および IL-1 β mRNA 発現量増加は、アストロサイト、RBEC による発現量増加と比較して有意に高かった。

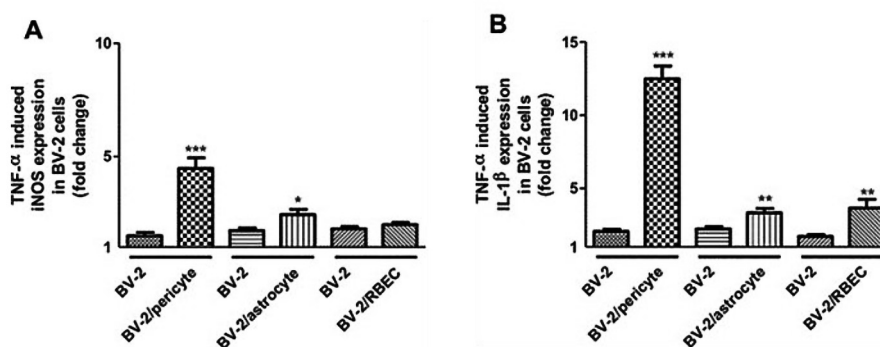


Fig. 2 TNF- α -induced expression of mRNAs for iNOS (A) and IL-1 β (B) in BV-2 cells in the absence or presence of pericytes, astrocytes and RBECs.

Three separate BV-2 monocultures were grown in the culture medium corresponding to each coculture system. Cells were exposed to TNF- α (20 ng/mL) for 24 h. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in BV-2 cells in the TNF- α -treated culture to that in BV-2 cells in cultures treated with each corresponding culture medium. Values represent the means \pm S.E.M. (N = 7-12 wells obtained from three or four independent experiments). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, significant differences from the TNF- α -treated BV-2 monoculture.

【考察】脳ペリサイトはTNF- α に応答し、ミクログリアの活性化を亢進させることが明らかとなり、BBB構成細胞内において脳ペリサイトは少なくともTNF- α 誘発性の脳内炎症進展において重要な役割を果たすことが示唆された。これらの知見は脳疾患の病態進展を回避する上で脳ペリサイトが有用な治療標的となる可能性を提起するものである。

第3章 脳ペリサイトによる視床下部神経細胞の摂食調節シグナル制御

(1) 脳ペリサイト由来液性因子の視床下部神経細胞インスリン感受性に与える影響

脳ペリサイト培養上清 (pericytesconditioned medium;PCM) を不死化マウス視床下部神経細胞株GT1-7に処理した後のインスリン誘発性Aktリン酸化の変化を比較検討した。インスリン刺激によるGT1-7細胞のAktリン酸化は、PCMの2時間および4時間処理により有意に増加した (Fig. 3A)。また、得られたPCMを原液から1/2、1/4と希釈して処理した際に、インスリン刺激時のリン酸化Aktは濃度依存的な減少が認められた (Fig. 3B)。これらの作用はアストロサイトおよび大動脈血管平滑筋細胞の培養上清をGT1-7に処理した際には観察されなかった。

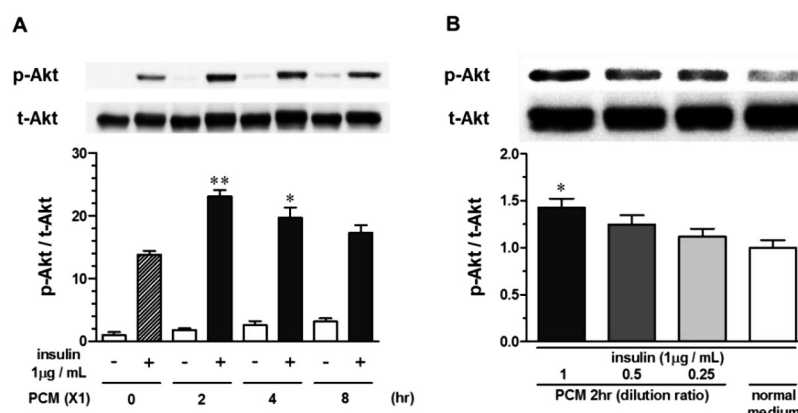


Fig. 3 Effect of PCM on insulin-induced phosphorylation of Akt in GT1-7 cells. Representative Western blots (top panel) and bar graphs (bottom panel) of phosphorylation levels of Akt. (A) GT1-7 cells were treated with PCM for indicated time periods followed by insulin (1 μ g/mL) for 10 min. (B) GT1-7 cells were treated with insulin (1 μ g/mL) for 10 min followed by PCM prepared at indicated dilution ratio (0.25 -1). Band intensities were quantified by scanning densitometry and results shown are relative to corresponding control protein levels (set to 1.0). Phospho-protein is normalized to total protein. Values are means \pm SEM (n = 3). **p < 0.01, *p < 0.05.

(2) 脳ペリサイト由来液性因子による視床下部神経細胞のインスリン感受性亢進機序の探索

インスリン誘発性Akt活性化亢進の機序を明らかにするため、PCMにより insulin receptor β (IR β) の発現量及び局在が変化するかをGT1-7細胞の細胞膜分画および細胞質分画を用いて調査した。しかしながら、PCM処理によるGT1-7細胞質と細胞膜のIR β 発現量および局在に変化は認められなかった。また、PCMは脂質ラフトのマーカーである flotillin-1の細胞膜分画における発現量にも影響を与えなかった。一方で、GT1-7細胞のインスリン誘発性のIR β リン酸化はPCM処理により有意に増大した。

(3) 脳ペリサイト由来液性因子による視床下部神経細胞の摂食調節機構に与える影響

脳ペリサイト培養上清 (PCM) をGT1-7細胞に処理した際の摂食調節シグナル伝達物質のリン酸化の

変化を比較検討した。AMPK のリン酸化は、PCM を2時間および8時間処理した際に有意に抑制された。また、STAT3のリン酸化は、PCM を4時間および8時間処理した際に有意に増加し、4時間で最大となった。さらに、PCM により摂食関連ペプチドである AgRP の mRNA 発現量は有意に減少した。

【考察】脳ペリサイト由来液性因子は視床下部神経細胞のインスリンによる IR β のリン酸化および Akt のリン酸化を増強することでインスリン感受性を亢進させることを明らかにした。さらに、脳ペリサイト由来液性因子は視床下部神経細胞の摂食調節シグナル分子の活性化を制御し、摂食亢進ペプチドの発現を抑制した。従って、脳ペリサイトは液性因子を介して視床下部神経細胞に作用することで、インスリン感受性および摂食行動の制御の一端を担う可能性が示された。

【総括】以上、脳ペリサイトは各NVU構成細胞と相互作用することでNVUの恒常性維持、あるいは機能不全の誘発に関与する可能性を提起した。

NVU の概念に基づくこれまでの研究で脳虚血のみならず多くの神経疾患の病態が次々と明らかになりつつある。しかしながら、いまだに基礎的メカニズムの解明には至っていない。本研究において脳ペリサイト由来因子のNVU構成細胞への影響は多岐に亘っており、ゆえに脳ペリサイトがNVUにおける基幹細胞としての役割を担っている可能性が示された。産生される液性因子の同定やNVU内における他の細胞間相互作用の解明を含む更なる研究は、ペリサイト機能維持など中枢神経系疾患の新たな治療戦略の開発に繋がることが期待され、本研究はその基盤となる実験証拠を提示した点で意義深いと考える。

審査の結果の要旨

近年、脳疾患の病態理解を包括的に理解するために、神経細胞の単一細胞種だけでなく、脳微小血管に存在する血液脳関門 (BBB) の構成細胞である脳血管内皮細胞、脳ペリサイト、アストロサイトおよび脳内免疫担当細胞であるミクログリアも含めた機能構造体として neurovascular units (NVU) が提唱されている。NVU を構成する多様な細胞間の相互作用 (クロストーク) により脳の生理および病態生理が形成されている。

BBB は血液と脳や脊髄を含む中枢神経系 (CNS) の組織液との間の物質交換を制御する機構であり、CNS の環境の恒常性を高度に維持している。一方、脳ペリサイトは脳血管内皮細胞と基底膜を共有する BBB 構成細胞であり、自身が産生する液性因子を介して脳血管内皮細胞へ情報を伝達することにより BBB 機能を維持する。さらに、炎症性サイトカインの中で、脳卒中などの脳障害時に産生される炎症調節因子の一つである TNF- α に特異的に反応する。しかし、脳ペリサイトと NVU 構成細胞間のクロストークについては十分には解明されていない。

本論文では、第一章において脳血管内皮細胞上の接着分子や免疫担当細胞の脳浸潤に着目し、炎症状態下における脳ペリサイトの関与や役割について検討した。第二章では脳ペリサイトの脳内炎症への関与を明らかにするため、サイトカイン/ケモカイン産生能およびミクログリア活性化作用を指標とし、炎症状態下における各BBB細胞との比較検討を行った。第三章にて視床下部神経細胞の摂食調節シグナルに着目し、脳ペリサイト由来液性因子の関与を検討した。

第一章では、脳ペリサイトが炎症性サイトカインによる脳血管内皮細胞の p38 MAPK および NF κ B の活性化を抑制し、それに続く脳血管内皮細胞膜の接着分子発現量の増加および免疫担当細胞の脳実質

浸潤を阻止していること、また、この抑制過程に TGF- β 1 が関与することを明らかにした。これらの成果は、脳ペリサイトの炎症防御機構に関する新知見として高く評価できる。

第二章では、脳ペリサイトが TNF- α に応答し、ミクログリアの活性化を亢進させることを突き止め、BBB 構成細胞内において脳ペリサイトは少なくとも TNF- α 誘発性の脳内炎症進展において重要な役割を果たすことを示した。これらの成果は、脳疾患の病態進展を回避する上で脳ペリサイトが有用な治療標的となる可能性を提示する優れたものであると評価された。

第三章では、脳ペリサイトが、液性因子を介して視床下部神経細胞に作用することにより、インスリン感受性および摂食行動の制御の一端を担う可能性が示された。本知見は、脳ペリサイト・神経細胞間クロストークの解明の一翼を担うものとして高く評価できる。

以上、本論文は脳ペリサイトが各 NVU 構成細胞と相互作用することにより NVU の恒常性維持あるいは機能不全の誘発を担うことを明らかにした点で意義深い。本成果はペリサイト機能維持など中枢神経系疾患の新たな治療戦略の開発に繋がるものである。以上を総合し、本論文は学位論文として適格かつ高質であると判定した。

また、公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。