

Neurovascular unit における脳ペリサイトの役割

—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—

A role of brain pericytes in neurovascular unit

- Crosstalk between brain pericytes and neurovascular unit cells via humoral factor -

2014

福岡大学薬学研究科薬学専攻
薬学疾患管理学教室

高橋 弘之

目次

諸言	1
第1章 脳ペリサイトによる炎症細胞の脳浸潤抑制機構		
1. 序論	4
2. 方法	6
3. 結果	15
4. 考察	26
5. 小括	29
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. 序論	31
2. 方法	33
3. 結果	39
4. 考察	48
5. 小括	50
第3章 脳ペリサイトによる視床下部神経細胞のインスリン感受性亢進		
1. 序論	52
2. 方法	54
3. 結果	61
4. 考察	68
5. 小括	71
総括	72
参考文献	74
投稿論文	80
謝辞	81

緒言

ヒトを含む多細胞生物の構造や働きは個々の細胞の持つ構造と機能の上に成立しているが、それには周囲にある細胞との相互作用が不可欠である。その機能が特に複雑である脳組織においても細胞間相互作用は常に重要と考えられており、2001年に提唱された **neurovascular units (NVU)** という概念が脳疾患の病態を包括的に理解するために用いられている。NVU は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理解されており、これらの多様な細胞間相互作用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に関与することが示されている [1]。

BBB は血液から脳や脊髄を含む中枢神経系 (**central nervous system; CNS**) への物質の輸送を厳密に制御しており、外傷や病原体から CNS を保護する機能を有する。BBB の関門機能は脳血管内皮細胞の細胞接着構造であるタイトジャンクションおよび内皮細胞に発現する種々の輸送担体から構成されている。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 [2]。

脳ペリサイトは血管の最も内腔を覆う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あり、その存在比は末梢組織・骨格筋では 1 :100 程度であるのに対し、脳・網膜では 1 :3~1 :1 程度と非常に豊富である。脳ペリサイトは血管作動因子の刺激により収縮・弛緩応答をすることで脳微小循環における血流制御を行っている。実際に、ペリサイト欠損マウスにおいて脳血流量の低下が見られ [3]、我々の過去の報告では、脳血管内皮細胞由来血管弛緩因子 **adrenomedulin** による培養脳ペリサイトの弛緩応答が認められた [4]。また、脳ペリサイト/脳血管内皮細胞共培養系では、脳血管内皮細胞単層培養系と比較して **transforming growth factor- β (TGF- β)** や **Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1** の産生が増加しており、これらの液性因子は血液脳関門機能を制御することを報告している [5, 6]。さらに我々は、脳ペリサイトは BBB 構成細胞の中で最も高い **matrix metalloproteinase (MMP-9)** 産生能を有し、脳ペリサイト由来の **MMP-9** がオートクリンに作用して、脳ペリサイトの遊走を制御することを明らかにしてきた [7]。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おり、脳ペリサイト機能異常による BBB/NVU の破綻が様々な病態進展に関与する可能性が考えられる。しかしながら、その病態進展機構は未だ十分に分かっておらず、BBB/NVU 構成細胞の液性因子産生能およびそ

れらに対する応答性・認識機構の解明が必要である。

そこで、本研究では、BBB/NVU の基幹細胞として「脳ペリサイト」を捉え、第一章において脳血管内皮細胞上の接着分子や炎症細胞の浸潤に着目し、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インスリン応答に着目し、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炎症細胞の脳浸潤抑制機構

1. 序論

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) の破綻や炎症細胞 (リンパ球やマクロファージ等) の脳実質への浸潤、中枢神経系の髄鞘 (ミエリン鞘) の脱落が認められる中枢神経系の自己免疫疾患の一つである。MS の発症原因は不明だが、感染症、過労、ストレス、出産後などの複数の環境要因、遺伝 (体質) 的要因が関与した自己免疫疾患であると考えられている。炎症による再発と寛解を繰り返す再発寛解型と、慢性的な神経変性によって、脳萎縮を伴う認知障害や運動障害、失調症状などが緩徐に進行する慢性進行型などのタイプがある。病初期に再発寛解型を示し、のちに慢性進行型を示す二次進行性と呼ばれる経過をたどる患者も多くみられる。MS の全経過中にみられる主たる症状は視力障害、複視、小脳失調、四肢の麻痺 (単麻痺、対麻痺、片麻痺)、感覚障害、膀胱直腸障害、歩行障害等であり、病変部位によって異なる。初発時あるいは再発時の急性期の治療としてステロイドのパルス療法が推奨されている。しかし今日、再発を確実に防止する方法はないが、日本で認可されている再発予防薬としてインターフェロン β (ベタフェロン[®]およびアボネックス[®]) がある。進行性の MS に対してはシクロホスファミドのパルス療法が試みられ、有効であったとの報告がある [1]。欧米においては活動性の極めて高い患者にナタリズマブを使用することがあるが、日本においてはまだ導入されていない。

ナタリズマブは分子標的薬の一つで、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン (VLA-4) に対するモノクローナル抗体である。脳実質への炎症細胞の浸潤は、1) 脳血管内皮細胞上に接着分子 (E-Selectin 等) の発現、2) ケモカイン (MCP-1, IL-8 等) による炎症細胞の活性化、3) 脳血管内皮細胞上の接着分子への接着、4) 炎症細胞のインテグリン (LFA-1, VLA-4 等) の発現、5) 炎症細胞のインテグリンと脳血管内皮細胞のインテグリンリガンド (ICAM-1, VCAM-1 等) を介した接着とその接着の強化、6) 炎症細胞の血管外への浸潤、という段階を経る。なかでも炎症細胞と脳血管内皮細胞上の接着分子の相互作用が炎症細胞の脳実質への浸潤、ひいては MS の病態を規定すると言え、ナタリズマブはこれを標的とした治療薬として期待されていたが、完全な炎症細胞の脳浸潤抑制効果を示さなかった [2]。MS 病変では T 細胞である Th1 細胞や Th17 細胞、マクロファージなどによって炎症が促進される。その中でも Th17 細胞は TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-21、IL-22 および IL-23 産生を促進し、近年、新たな神経炎症の経路として注目されている。炎症性サイトカインである TNF- α は脳血管内皮細胞上の接着分子 (E-Selectin, ICAM-1, VCAM-1) 発現量を増加させ [3]、これら炎症性サイトカインによって BBB の tight junction が破壊され炎症細胞が遊走、浸潤することが明らかになった。これらの知見をふまえて、ナタリズマブが完全に炎症細胞の脳への浸潤を抑制する効果を示さないことを考えると、炎症細胞の脳実質内への浸潤が脳血管内皮細胞と炎症細胞の接着だけでは規定されないことが言える。

BBB は脳ペリサイト、アストロサイト、脳血管内皮細胞から成り、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 [4]、CNS の環境の恒常性を高度に維持している。ペリサイトは生体内で網膜に最も存在し、続いて脳、肺の順に多く存在している。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 [5]。また、transforming growth factor- β (TGF- β) 産生を介して血液脳関門機能を制御する [6]。一方で、脳ペリサイトは免疫抑制薬 cyclosporin A の血液脳関門機能障害を増悪する [7]。炎症病態下においては、脳微小血管基底膜からのペリサイトの離脱と BBB 機能障害が相関することが明らかとなった [8]。以上のように、脳ペリサイトは BBB 機能に関与するが、その病態下での詳細な働きおよび BBB 機能制御のメカニズムは未だ解明されていない。ペリサイトと同じく、血液脳関門構成細胞のひとつであるアストロサイトは、グルタミン酸の取り込みと栄養因子の産生によりニューロンを保護し、神経線維の支持細胞としての役割を担っている。また、病原体や炎症誘発性サイトカインにより活性化されたアストロサイトから産生される NO、サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β および L-6) およびケモカイン (MCP-1) は免疫系に作用する [9, 10]。TNF- α によりアストロサイトの MCP-1 の産生が増加し、単球の脳浸潤が促進される [11]。しかし、炎症病態下において脳ペリサイトが、脳血管内皮細胞と炎症細胞の接着や炎症細胞の脳浸潤にどのような影響を及ぼしているかは不明である。そこで本研究では脳内皮細胞上の接着分子や炎症細胞の浸潤に着目し、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。

2. 方法

2-1 細胞

2-1-1 脳ペリサイト

初代培養脳血管周皮細胞ペリサイトは Hayashi らに従って単離した (Hayashi et al) 。3 週齢の Wistar 系の雄性ラットをエーテル麻酔後、断頭し大脳を摘出し、氷上のディッシュに入れた。髄膜を剥がした後に氷上のディッシュにて大脳皮質を細断し、collagenase (CLS2) (1 mg/ml; Worthington, Lakewood, NJ, USA) と deoxyribonuclease I (50 units/ml; SIGMA, St.Louis, Mo, USA) で 37℃、1 時間 15 分間振とう (200 rpm) し、酵素処理を行った。遠心分離後、得られたペレットに 20% bovine serum albumin (BSA)-DMEM を加え、1,000×g、20 分間遠心分離することでニューロンやグリア細胞を取り除いた。その後、さらに collagenase/dispase (1 mg/ml; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) と deoxyribonuclease I (50 units/ml) で 37℃、45 分間振とう (200 rpm) し、酵素処理を行った。遠心分離後、少量の DMEM で懸濁したペレットを、あらかじめ 4℃、28,000×g、1 時間で密度勾配を形成させた 33% percoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 溶液に加え、遠心分離することで脳毛細血管片を単離した。得られた脳毛細血管片をコーティングしていない 75 cm² 培養 flask を用いて 37℃、5% CO₂ / 95% 大気下で 20% fetal bovine serum、1% gentamicin 50 µg/mL、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (penicillin 10000 units/ml、streptomycin 10000 µg/ml) を含む DMEM にて培養することで脳ペリサイトを得た。培地交換は 1 日おきに行った。

2-1-2 MBEC4

BALB/c マウスの大脳皮質から脳微小血管内皮細胞を単離した後、SV40 ウイルスでトランスフェクションして不死化した (Tatsuta et al. 1992) 脳毛細血管内皮細胞株 MBEC4 細胞を、コーティングしていない 75 cm² 培養 flask を用いて 37℃、5% CO₂/95% 大気下、10% fetal bovine serum、gentamicin 50 µg/mL、1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (penicillin 10000 units/ml、streptomycin 10000 µg/ml) を含む DMEM にて、コンフルエントになるまで培養し、実験に供した。培地交換は 1 日おきに行った。

2-1-3 アストロサイト

アストロサイトは、生後1日～3日目のWistar系のラットより全脳を摘出し、実体顕微鏡下で大腦皮質のみにした。1 mL の 10 % FBS DMEM が入った 15 mL チューブの中に入れ、メスで大腦皮質を細断し、ピペッティングにより更に懸濁した。懸濁液をセルストレイナーでろ過し、8℃、800 g、6 分間遠心した。上清を取り除き、10 % FBS、penicillin-streptomycin を含む DMEM で懸濁後、75 cm² 培養フラスコに播種し、37 °C、5 %CO₂/95 % 大気下で培養した。培養液は播種 40~48 時間後に交換し、その後は 3 日毎に行った。10~14 日間培養後、培養フラスコを 180 rpm、オーバーナイトで振盪し細胞を播き直すことでアストロサイトを得た。

2-1-4 In vitro 血液脳関門モデルの作製

これらの細胞を用いて in vitro 血液脳関門モデルを作製した。Western blotting 法では、6 well plate (BD Falcon™, 353046, NJ, USA) 底面に rat pericyte および rat astrocyte (19.2×10⁴ cells/well) を播種して 3-4 日培養し、polyester membrane (0.4 μm pore size) 表面をコラーゲン I でコーティングした Transwell® インサート (6-well type, Costar, 3450, U.S.) を well に設置し、内側に MBEC4 (19.7×10⁴ cells / insert) を播種して 2-3 日培養した共培養系 (MBEC4/Pericyte co-culture および MBEC4/Astrocyte co-culture) を用いた。Migration assay には、12 well plate (Costar, 3513, U.S.) 底面に rat pericyte (7.6×10⁴ cells / well) を播種して 3-4 日培養し、polyester membrane (0.4 μm pore size) 表面をコラーゲン I でコーティングした Transwell® インサート (12-well type, Costar, 3462, U.S.) を設置し、内側に MBEC4 (4.2×10⁴ cells/insert) を播種して 2-3 日培養した共培養系 (MBEC4/Pericyte co-culture) を用いた。

また、MBEC4 単層培養系 (MBEC4 monolayer) として MBEC4 細胞のみを培養 dish および Transwell® インサート内側に播種したものをを用いた。

2-1-5 J774A.1

BALB/c マウス由来の単球・マクロファージ細胞株 J774A.1 細胞 (ECACC No.91051511, ECACC, Porton Down, Salisbury, UK)は、コーティングしていない 75cm² 培養 flask を用いて 37 °C、5% CO₂ / 95% 大気下、10% fetal bovine serum、gentamicin 50μg/mL、1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (penicillin 10000 units/ml、streptomycin 10000 μg/ml) を含む DMEM にて培養し、実験に供した。培地交換は 1 日おきに行った。

2-2 試薬

TNF- α (Tumor necrosis factor- α , R&D Systems, 510-RT-050, MN, USA)

TGF- β 1

SB203580 (TOCRIS) (DMSO, 25 mM)

BAY11-7821(TOCRIS) (DMSO, 10 mM)

2-3 試薬処理

MBEC4/Pericyte co-culture、MBEC4/Astrocyte co-culture および MBEC4 monolayer がコンフルエントになるまで培養したあと、10% fetal bovine serum、gentamicin 50 μ g/mL、1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (penicillin 10000 units/ml、streptomycin 10000 μ g/ml) を含む DMEM を除去し、血清を含まない DMEM で洗浄した後、薬液が適切な濃度になるように加え、37°C、5% CO₂/95%大気下インキュベーター内で必要時間放置した。

2-4 Western blot analysis

2-4-1 Sampling for western blot analysis (cell lysate、接着分子)

試薬処理溶液を除去した後、1×TBS (3 mL)で3回洗浄した。細胞溶解液 (200 μ L) を添加し、セルスクレイパーを用いて MBEC4 を溶解し、1.5mL コーティングチューブに移した。各サンプルをソニケーションし、25°C、15,000 rpm、15 分間で遠心分離し細胞可溶化分画 (上清) を回収後、BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Rockford, IL, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるように必要に応じて sample buffer (1×) で希釈調製した。

以下に、2-4-1 で使用した buffer の組成について示す。

Sample buffer (3 ×) の調製

1% BPB-aq を 1.5 mL、10.9% SDS を 41.25 mL、glycerol を 15 mL、0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8 を 18.75 mL を混合し、予製とした。

細胞溶解液の組成（1 mL あたり）

細胞溶解液	final conc.
Sample buffer (1×) (920 µL)	
PMSF (5 mg/mL, 10 µL)	50µg/mL
20% PIC (50 µL)	1% (v/v)
Phosphatase inhibitor cocktail 2,3 (10 µL)	1% (v/v)

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; SIGMA, P7626-1G) は 5 mg/mL になるように DMSO で溶解し、-30°C で保存したものを使用した。Protease inhibitor cocktail (PIC; SIGMA, P2714-1BTL) は 1 bottle 中の PIC 粉末を 5 mL の dH₂O で溶解し、-30°C で保存したものを使用した。

2-4-2 Sampling for western blot analysis (cell lysate、細胞内情報伝達物質)

試薬処理溶液を除去した後、1×TBS (3 mL) で 3 回洗浄した。細胞溶解液 (200 µL) を添加し、セルスクレイパーを用いて MBEC4 を溶解し、1.5 mL コーティングチューブに移した。氷上で 1 時間放置した後、25°C、15,000 rpm、15 分間で遠心分離し細胞可溶化分画（上清）を回収後、BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Rockford, IL, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるよう必要に応じて lysis buffer で希釈調製した。sample buffer (3 ×) に 2-メルカプトエタノールを 8.9 % (v/v) 加えたものを細胞溶解液の半分量加え、95°C で 5 分間加熱し、western blot 用サンプルとした。

以下に、2-4-2 で使用した buffer の組成について示す。

Lysis buffer の組成

lysis buffer	final conc.
Tris-HCl pH6.8	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	500 mM
Glycerol	10%
Triton X	1%
10% SDS	0.1%
5% sodium deoxycholate	0.5%
Napp	20 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM

NaF	1 mM
PMSF	50 µg/mL
20% protease inhibitor	1% (v/v)
Phosphatase inhibitor cocktail 1,2	1% (v/v)

2-4-3 Western blot analysis (cell lysate、接着分子)

泳動槽 (BIO RAD) にゲル (8% SDS-PAGE, 10 well) および泳動 buffer をセットし、室温に戻したサンプルを 25 µg、マーカートを 5 µL アプライし、0.03 A/ゲルで 60 分間電気泳動した。泳動中に、blot paper (BIO-RAD) は転写 buffer に 15 分間程度浸し、PVDF メンブタン (BIO-RAD) はメタノールに 1 分間さらした後転写 buffer に 15 分間程度浸した。泳動終了後ゲル板からゲルを剥がし転写 buffer に浸した。転写装置 (BIO-RAD) に陽極側から blot paper、メンブタン、ゲル、blot paper の順で密着させ 16 V、90 分間セミドライ方式で転写した。メンブタンを 0.1% tween20 TBS (以下 TBST) にさらした後、パラフィルムにはさんで適当な位置でカットした。50 mL tube にメンブタンとブロッキングワシ (Nacalai Tesque, Icn., 03953-95, Kyoto, Japan) を入れ、室温で 30 分間ブロッキングした。希釈した一次抗体をブロッキングと同様に 50 mL tube を用いて 4°C で over night 処理した。TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、希釈した二次抗体を同様に室温で 1 時間処理した。TBST で 5 分間ずつ 5 回洗浄し、目的たんぱく質を ECL advance (GE Healthcare) により発光させ、CCD イメージャー fluor chemTM (Alpha Inotech) で検出した。画像処理及び解析は Image J Launcher を用いた。

2-4-4 Western blot analysis (cell lysate、細胞内情報伝達物質)

泳動槽にゲル (8% SDS-PAGE, 10 well) および泳動 buffer をセットし、サンプルを 25 µg、マーカートを 5 µL アプライし、0.03 A/ゲルで 60 分間電気泳動した。泳動中に、blot paper は転写 buffer に 15 分間程度浸し、PVDF メンブタンはメタノールに 1 分間さらした後転写 buffer に 15 分間程度浸した。泳動終了後ゲル板からゲルを剥がし転写 buffer に浸した。転写装置に陽極側から blot paper、メンブタン、ゲル、blot paper の順で密着させ 16 V、90 分間セミドライ方式で転写した。メンブタンを TBST にさらした後、パラフィルムにはさんで適当な位置でカットした。50 mL tube にメンブタンとブロッキングワシ-P (Nacalai tesque, Icn., Kyoto, Japan) を入れ、室温で 30 分間ブロッキングした。希釈したリン酸化タンパク質用一次抗体をブロッキングと同様に 50 mL tube に入れ、4 °C で一晩処理した。TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、希釈した二次抗体を同様に室温で 1 時間処理した。TBST で 5 分間ずつ 5 回洗浄し、目的タンパク質を ECL advance により発光させ、CCD イメージャー fluor chemTM

で検出した。ストリッピング液で 15 分間ずつ 2 回洗浄して抗体をはがし、50 mL tube にメンブランとブロッキングワンを入れ、室温で 30 分間ブロッキングした。TBST で 5 分間洗浄し、希釈した total タンパク質用一次抗体をブロッキングと同様 50 mL tube に入れ、4 °C で over night 処理した。TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、希釈した二次抗体を同様に室温で 1 時間処理した。TBST で 5 分間ずつ 5 回洗浄し、目的タンパク質を ECL advance により発光させ、CCD イメージャーfluor chem™で検出した。画像処理及び解析は Image J Launcher を用いた。

各 buffer 調製方法および使用した抗体および希釈倍率について以下に示す。

8% SDS-PAGE 作成方法

初めに分離ゲル (Lower; 1.5M Tris-HCl Buffer, pH8.8 2.4 mL, dH₂O 4.7 mL, 30%アクリルアミド 2.7 mL, 10% APS 50 µL, TEMED 5 µL) を作成し、ガラスプレートに注ぎ、水飽和イソブチルアルコールを重層した後、室温で 30 分程度放置してゲルを重合させた。重層したイソブチルアルコールを捨て、精製水で良く洗浄した後、濃縮ゲル (Upper; 0.5M Tris-HCl Buffer, pH6.8 2.4 mL, dH₂O 6.1 mL, 30%アクリルアミド 1.3 mL, 10% APS 50 µL, TEMED 10 µL) を作成して、分離ゲルの上から注ぎ、重合するまで 30 分間放置した。

30% アクリルアミドの調製

アクリルアミド 29g (final concentration;29% w/v) 、N,N'-メチレンビスアクリルアミド 1.0g (final concentration;1% w/v) を精製水に溶かし、100mL にしたものをろ過し、4°Cで保存した。

泳動 buffer の調製

トリスアミノメタン 30 g (final concentration; 24.8 mM) 、グリシン 144 g (191.8 mM) 、SDS 10 g (3.47 mM) を精製水に溶かし 1 L にしたものを 4°C で保存し、用時精製水で 10 倍希釈して用いた。

転写 buffer の調製

トリスアミノメタン 58.2 g (final concentration; 48 mM) 、グリシン 29.3 g (39.3 mM) を精製水に溶かし 1 L にしたものを 4°C で保存し、100 mL にメタノール 200 mL (20% v/v) 、10% SDS 3.75 mL (1.3 mM) を加え、精製水で 1 L に用時調製した。

TBS の調製

1 M Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL (final concentration; 10 mM) 、 NaCl 79.46 g (136 mM) 、Na₃VO₄

3.68 g (2 mM) 、NaF 21 g (50 mM) を精製水に溶かし、濃塩酸で pH 7.85 に調整した後、精製水を加え 2 L にしたものを室温で保存した。使用時に精製水で 5 倍希釈し用いた。

ストリッピング液の調製

グリシン 15.1 g、10%SDS 10 mL、Tween20 10 mL を精製水に溶かし 1L にして、濃塩酸で pH 2.2 に合わせ室温で保存した。透明の液が白色に濁ったら捨てた。

一次抗体

E-Selectin...Monoclonal Anti-mouse E-Selectin Antibody (R&D Systems, MAB575, MN, USA)
1:100

P-Selectin...Monoclonal Anti-mouse P-Selectin/CD62P Antibody (R&D Systems, MAB737, MN, USA) 1:50

ICAM-1...Monoclonal Anti-mouse ICAM-1(CD54) Antibody (R&D Systems, MAB796, MN, USA) 1:200

VCAM-1...Monoclonal Anti-mouse VCAM-1/CD106 Antibody (R&D Systems, MAB6434, MN, USA) 1:10000

TNFR1...Rabbit polyclonal to TNF Receptor I (Abcam, ab19139) 1:1000

TNFR2...TNF-R2 Rabbit mAb (Cell Signaling;3727) 1:1000

β-actin...Rabbit polyclonal to beta Actin (Abcam, ab8227) 1:5000

phospho-p38...p-38 Rabbit mAb (Cell Signaling; 4668)1:2000

phospho-NF-κB...p65 Ser536 Rabbit mAb (Cell Signaling;3033)1:1000

total-p38...p-38 Rabbit mAb (Cell Signaling; 9258)1:1000

total-NF-κB...p65 Rabbit mAb (Cell Signaling;4764) 1:1000

二次抗体

Anti-rat IgG Horseradish Peroxidase Antibody (R&D Systems, HAF005, MN, USA)

1:1000 (E-Selectin,P-Selectin,ICAM-1)

1:2000 (VCAM-1)

ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-Linked Species-specific Whole antibody (from donkey) (GE Healthcare, NA934, UK)

1:10000 (β-actin)

1:15000 (phospho-p38, total-p38, total- NF-κB)

1:20000 (phosphor- NF-κB)

リン酸化特異抗体は 5%ブロッキングワシ-P/TBST 希釈し、それ以外の抗体は 5%ブロッキングワシ/TBST で希釈した。

2-5 Adhesion assay

BBB を介した循環血液中から脳実質内への炎症細胞 (単球・マクロファージ等) の浸潤過程における脳血管内皮細胞への炎症細胞の接着を評価するために adhesion assay を用いた。MBEC4 monolayer 単層培養系を用いて J774A.1 細胞の adhesion assay を行った。まず、gentamicin 50 µg/mL を含む Serum-free DMEM で MBEC4 monolayer を 3 回 wash した。そして TNF-α (20 ng/mL) を含む serum-free DMEM を処理して 37°C、5% CO₂ / 95% 大気下、24 時間インキュベーションした。Control として、同量の 0.1% BSA in PBS を含んだ DMEM を処理した。

J774A.1 細胞はセルスクレイパーで細胞をはがし、25°C、1,000×g、3 分間遠心して細胞を回収し、細胞懸濁液を得た。得られた懸濁液中の J774A.1 細胞 100×10⁴ cells / mL に対して calcein-AM (Nacalai Tesque, 06735-81, Kyoto, Japan) 10 µM になるように 10 mM の calcein-AM 溶液を加えて、37°C、5% CO₂ / 95% 大気下、45 分間インキュベーションした。インキュベート後、細胞内に取り込まれなかった calcein-AM を取り除くため、serum-free DMEM を加え、25 °C、1,000×g、3 分間遠心した後、上清を除去した。これを 3 回繰り返した。Calcein-AM で蛍光標識された J774A.1 細胞を MBEC4 monolayer 単層培養系に 10×10⁴ cells/well 加えて、37°C、5% CO₂ / 95% 大気下、1 時間インキュベーションした。インキュベート後、PBS 1 mL で 10 回 wash し、MBEC4 に接着した J774A.1 細胞の蛍光を観察した。標準タイプ Biozero 蛍光顕微鏡 BZ-8100 シリーズを用いて撮影した。

2-6 Migration assay

BBB を介した循環血液中から脳実質内への炎症細胞 (単球・マクロファージ等) の浸潤を評価するための指標として、migration assay 法を用いた。MBEC4 monolayer 単層培養系と MBEC4/Pericyte co-culture 共培養系の in vitro 血液脳関門モデルを用いて J774A.1 細胞の migration assay を行った。まず、gentamicin 50 µg/mL を含む Serum-free DMEM で MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture を 3 回 wash した。そして TNF-α (20 ng/mL) を含む serum-free DMEM を Transwell® の内側 (血管側) に処理して 37°C、5% CO₂ / 95% 大気下、24 時間インキュベーションした。Control として、同量の 0.1 % BSA in PBS を含んだ DMEM を処理した。

J774A.1 細胞はセルスクレイパーで細胞をはがし、25℃、1,000×g、3 分間遠心して細胞を回収し、細胞懸濁液を得た。得られた懸濁液中の J774A.1 細胞 100×10^4 cells / mL に対して calcein-AM (Nacalai Tesque, 06735-81, Kyoto, Japan) 10 μ M になるように 10 mM の calcein-AM 溶液を加えて、37℃、5% CO₂ / 95% 大気下、45 分間インキュベーションした。インキュベート後、細胞内に取り込まれなかった calcein-AM を取り除くため、serum-free DMEM を加え、25 °C、1,000×g、3 分間遠心した後、上清を除去した。これを 3 回繰り返した。

Calcein-AM で蛍光標識された J774A.1 細胞を MBEC4 monolayer 単層培養系と MBEC4/Pericyte co-culture 共培養系の MBEC4 側 (血管側) に 40×10^4 cells/well 加えた。その後、12 well plate の medium 内に浸潤してきた J774A.1 細胞の蛍光を 1、2 および 4 時間後に測定した。蛍光強度は蛍光マイクロプレートリーダー (Ex: 485 nm, Em: 530 nm, PerSeptive Biosystems, CytoFluor[®] Multi-Well Plate Reader Series 4000) で測定した。蛍光強度の測定は Transwell[®] インサートを取り除いて行った

2-7 統計解析

データは平均±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には t 検定を用いた。多群間の比較には one-way および two-way ANOVA で解析後、Dunnnett 法および Tukey-Kramer 法を用いた。検定は 5% 以下 ($p < 0.05$) の危険率をもって有意とした。

3. 結果

3-1 TNF- α による MBEC4 monolayer の接着分子発現量の変化

脳血管内皮細胞に TNF- α (1、5、10、20 および 50 ng/mL) を 24 時間処理した際の接着分子 (E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1、VCAM-1) の発現量の変化を Fig.1 に示した。

TNF- α 処理により E-Selectin、ICAM-1、VCAM-1 の発現量は濃度依存的に増加した。一方で、P-Selectin の発現量は変化しなかった。

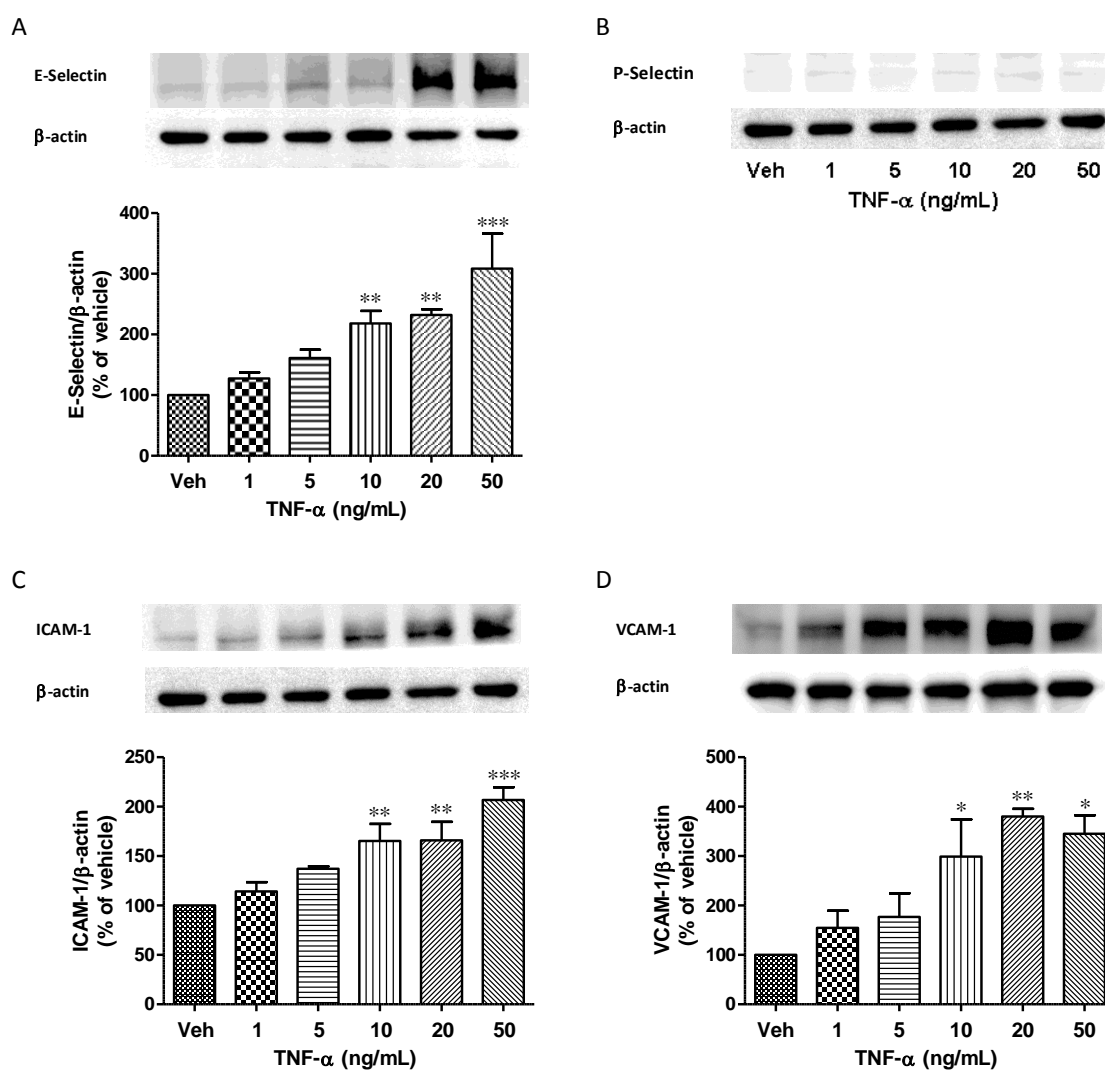


Fig. 1 Effect of TNF- α on expression of cell adhesion molecules on MBEC4 cells.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α for 24 hr. E-selectin (A), P-selectin (B), ICAM-1 (C), and VCAM-1 (D) 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.

3-2 TNF- α 処理後の MBEC4 monolayer における J774A.1 細胞の接着

MBEC4 monolayer に TNF- α (20 ng/mL) を 24 時間処理した後の単球・マクロファージ細胞株 (J774A.1 細胞) の MBEC4 への接着を調べた。結果を Fig. 2 に示した。

TNF- α 処理により MBEC4 への J774A.1 細胞の接着は有意に増加した。

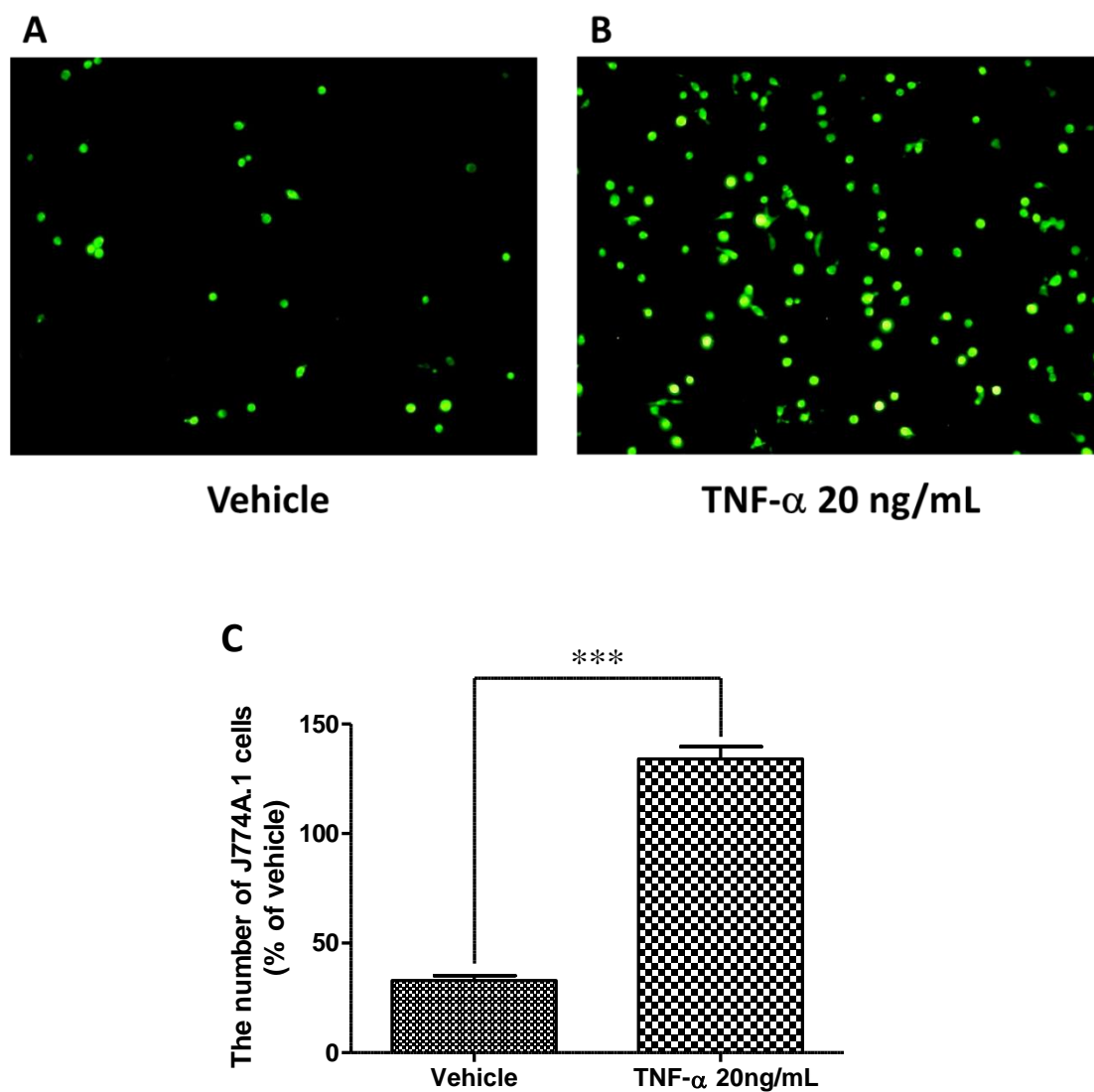


Fig. 2 Effect of TNF- α on adhesion between J774A.1 cells and MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

Adhesion assay was performed after a 24 hr-exposure of TNF- α (20 ng/mL). Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM. (n=4) ***p<0.001 vs vehicle.

3-3 TNF- α 処理後の MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における接着分子発現量の比較

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (10 および 20 ng/mL) を 24 時間処理した際の E-Selectin、P-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量の変化の比較を Fig. 3 に示した。

MBEC4/Pericyte co-culture 群では MBEC4 monolayer 群と比較して、TNF- α 処理による E-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 の発現量増加の有意な阻害が認められた。P-Selectin の発現量に変化は認められなかった。

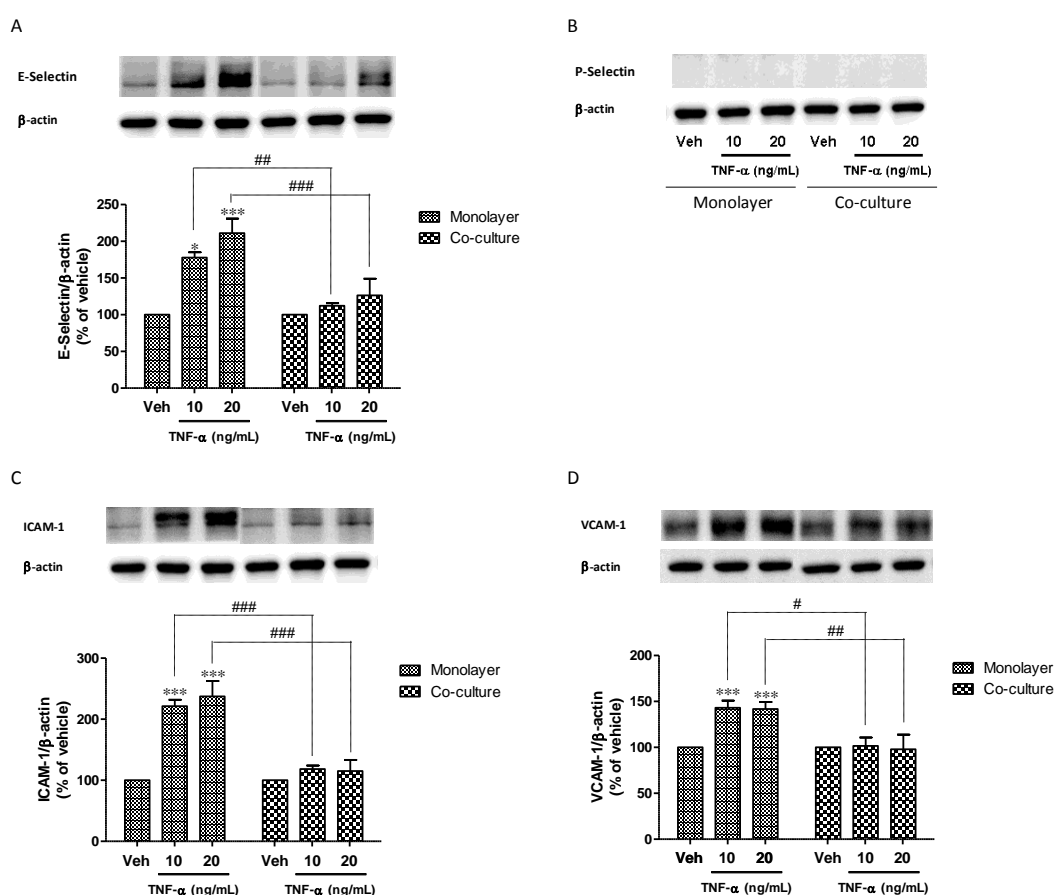


Fig. 3 Effect of TNF- α on expression of cell adhesion molecules on MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α for 24 hr. E-selectin (A), P-selectin (B), ICAM-1 (C), and VCAM-1 (D) 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.

3-4 脳ペリサイトによる接着分子発現抑制機構の探索

3-4-1 TNF- α 処理後の MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における TNFR1 および TNFR2 の発現量の比較

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (20 ng/mL) を 24 時間処理した際の TNFR1 および TNFR2 の発現量の変化の比較を Fig. 4 に示した。

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture において TNF- α 処理による TNFR1、TNFR2 発現量の変化はともに認められなかった。

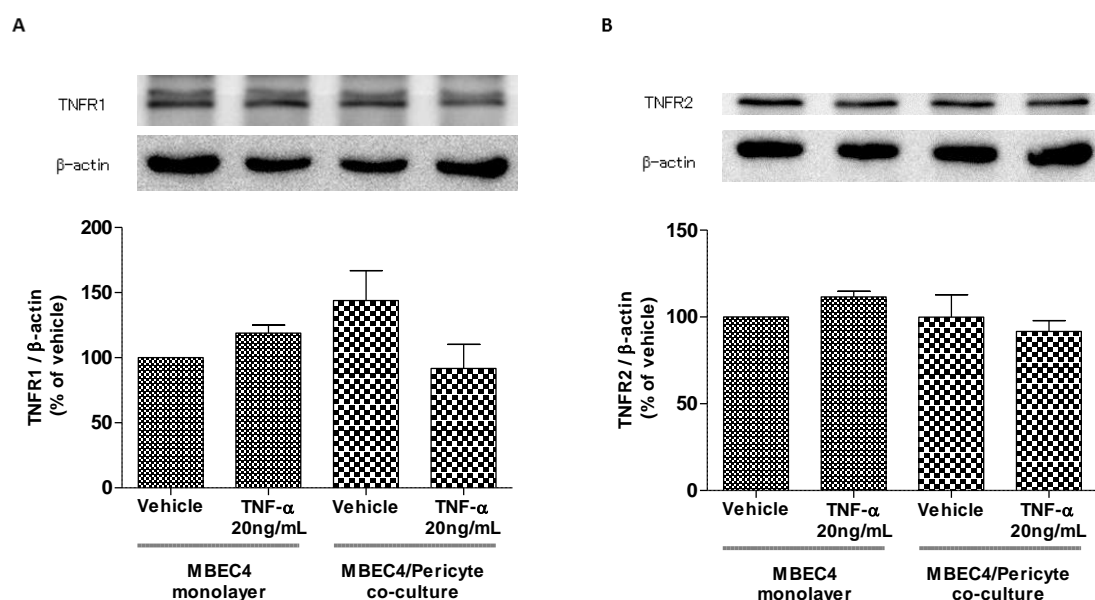


Fig. 4 Effect of TNF- α on expression of TNFR1 and TNFR2 on MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α for 24 hr. TNFR1 (A), and TNFR2 (B) were detected by western blot. Relative intensity was calculated as ratio of arbitrary densitometric units of TNFR to that of β -actin. Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM.(n=3)

3-4-2 MBEC4monolayer における TNF- α 誘導性接着分子の増加経路の検討

3-4-2-(i) TNF- α + SB203580 (p38 MAPK inhibitor) 処理による MBEC4 monolayer の接着分子発現量の変化

MBEC4 に TNF- α (20 ng/mL) と MAPKs 阻害剤 (SB203580) (1、5、10 μ M) を 24 時間処理した際の接着分子(ICAM-1、VCAM-1)の発現量の変化を Fig. 5 に示した。

TNF- α により増加した ICAM-1、VCAM-1 の発現量がともに SB203580 処理により有意に減少した。

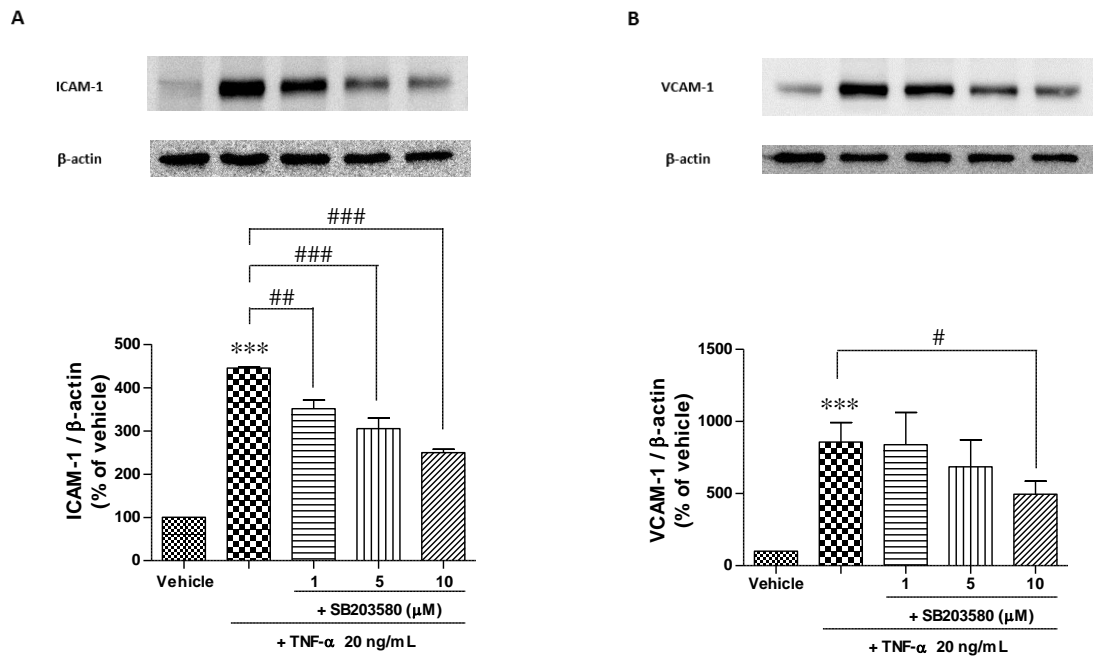


Fig. 5 Involvement of p38 MAPK in TNF- α -induced increase in expression of ICAM-1 and VCAM-1 in MBEC4 monolayer

MBEC4 cells were exposed to TNF- α and SB203580 (p38 inhibitor) 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.(n=3)
***p<0.0001 vs vehicle, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs TNF- α -treated group.

3-4-2-(ii) TNF- α + BAY11-7821 (NF- κ B inhibitor) 処理による MBEC4 monolayer の接着分子発現量の変化

MBEC4 に TNF- α (20 ng/mL) と NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7821) (1、5、10 μ M) を 24 時間処理した際の接着分子 (ICAM-1、VCAM-1) の発現量の変化を Fig. 6 に示した。

TNF- α により増加した ICAM-1、VCAM-1 の発現量がともに BAY11-7821 処理により有意に減少した。

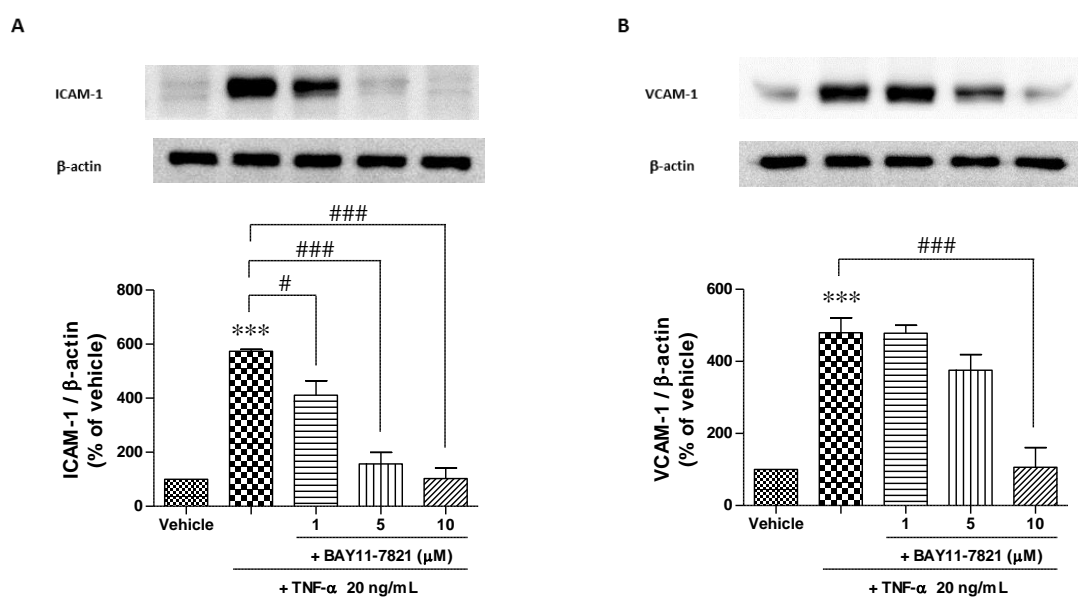


Fig. 6 Involvement of NF- κ B in TNF- α -induced increase in expression of ICAM-1 and VCAM-1 in MBEC4 monolayer

MBEC4 cells were exposed to TNF- α and BAY11-7821 (NF- κ B inhibitor) 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. (n=3) ***p<0.0001 vs vehicle, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs TNF- α -treated group.

3-4-3 MBEC4 monolayer における TNF- α による p38 MAPK および NF- κ B の活性化の経時的変化

MBEC4 に TNF- α (20 ng/mL) を 0、0.5、1、2、4、6、8 および 24 時間処理した際の p38 MAPK および NF- κ B の活性化の経時的変化を Fig. 7 に示した。

MBEC4 monolayer での p38 MAPK と NF- κ B の活性化はともに TNF- α 処理後 30 分で最大になった。

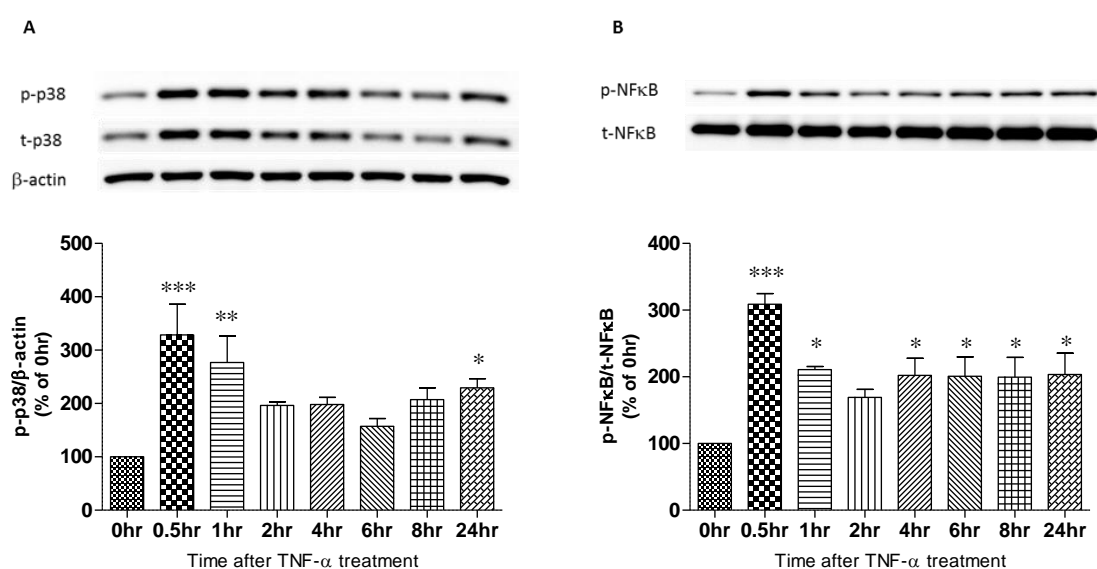


Fig. 7 Time-course of TNF- α -induced increases in activation of p38 MAPK and NF- κ B.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α (20 ng/mL) for 0, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 hr. p38 MAPK (A), and NF- κ B (B) were detected by western blot. Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM. (n=3) *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Vehicle.

3-4-4 TNF- α による p38 MAPK および NF- κ B の活性化に対する脳ペリサイトの関与

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (20 ng/mL) を処理し、30 分後の p38 MAPK および NF- κ B の活性化の変化の比較を Fig. 8 に示した。

MBEC4/Pericyte co-culture 群では MBEC4 monolayer 群に比較して、TNF- α 処理による p38 MAPK および NF- κ B の活性化の有意な抑制がみられた。

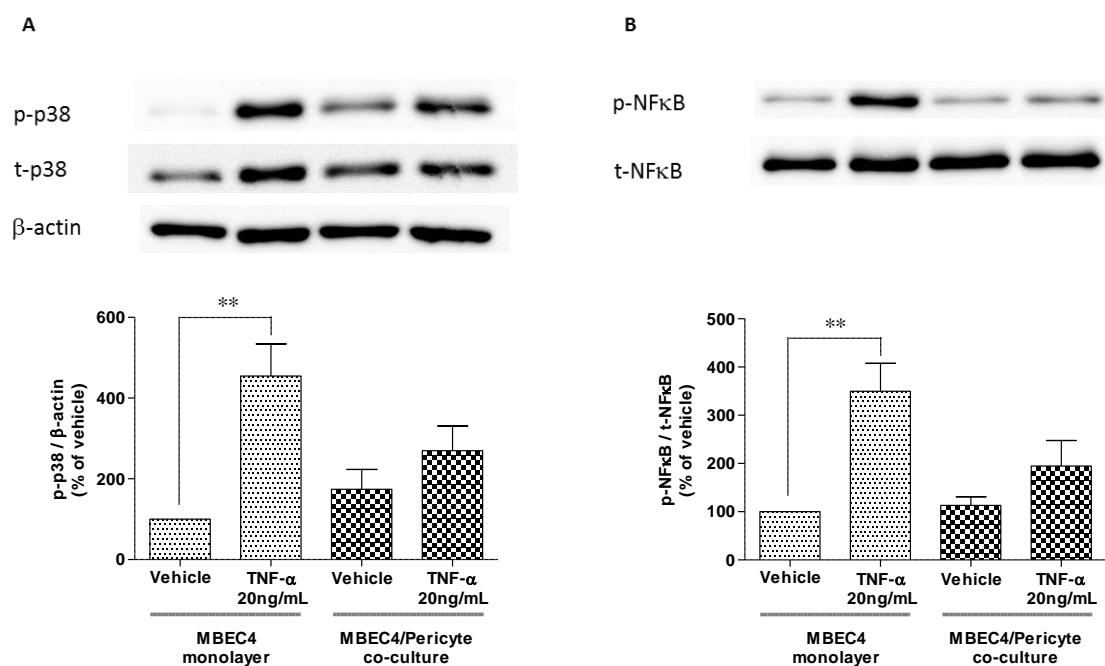


Fig. 8 Brain pericytes inhibited the TNF- α -induced activation of p38 MAPK and NF- κ B in MBEC4 cells. MBEC4 cells were exposed to TNF- α for 0.5 hr. p38 MAPK (A), NF- κ B (B) were detected by western blot. Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM.(n=3) *p<0.05, ***p<0.001 vs vehicle.

3-5 MBEC4 monolayer での TNF- α による接着分子の発現量増加に対する TGF- β 1 の作用

MBEC4 monolayer に TNF- α (20 ng/mL) と TGF- β 1 (1、10 および 50 ng/mL) を 24 時間で処理した際の接着分子 (ICAM-1、VCAM-1) の発現量の変化を Fig. 9 に示した。

TNF- α により増加した ICAM-1、VCAM-1 の発現量は TGF- β 1 処理により濃度依存的に減少した。

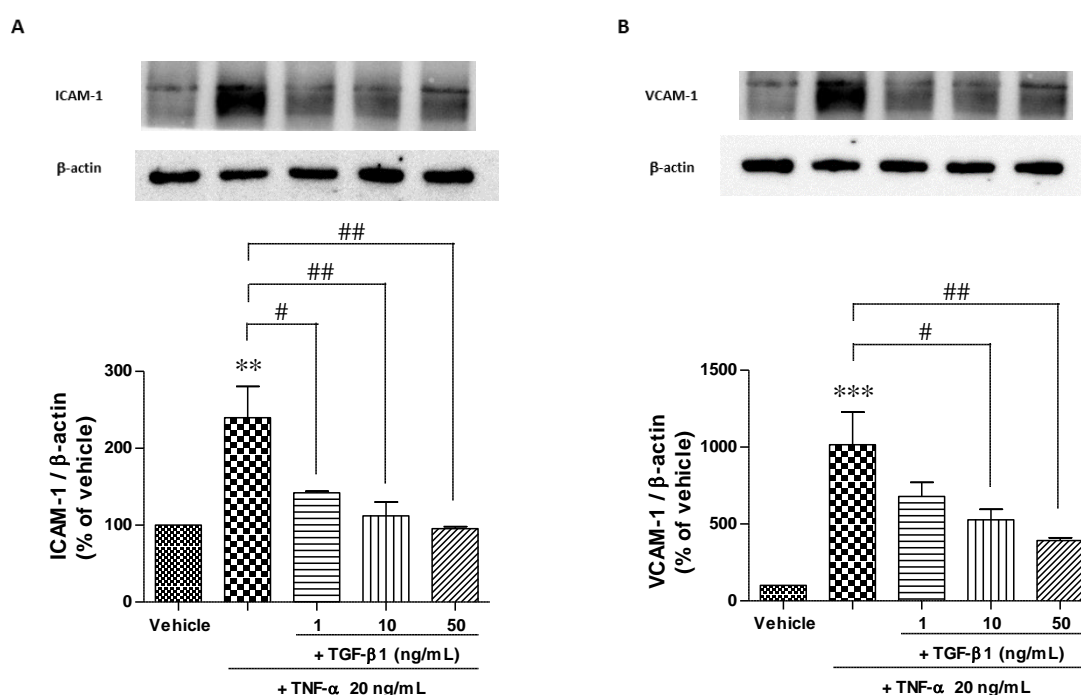


Fig. 9 Effect of TGF- β 1 on TNF- α -induced expression of cell adhesion molecules on MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

MBEC4 cells were exposed to TNF- α and TGF- β 1 for 24 hr. ICAM-1 (A), 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. (n=3) **p<0.01 vs vehicle. #p<0.05, ##p<0.01 vs each corresponding TNF- α -treated group.

3-6 TNF- α 処理後の MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture における J774A.1 細胞の浸潤

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (20 ng/mL) を 24 時間処理した後のマクロファージ細胞株(J774A.1 細胞)の脳実質側へ浸潤を比較した結果を Fig. 10 に示した。

TNF- α を処理した MBEC4/Pericyte co-culture 群では、MBEC4 monolayer 群と比較して有意にマクロファージの浸潤が抑制された。

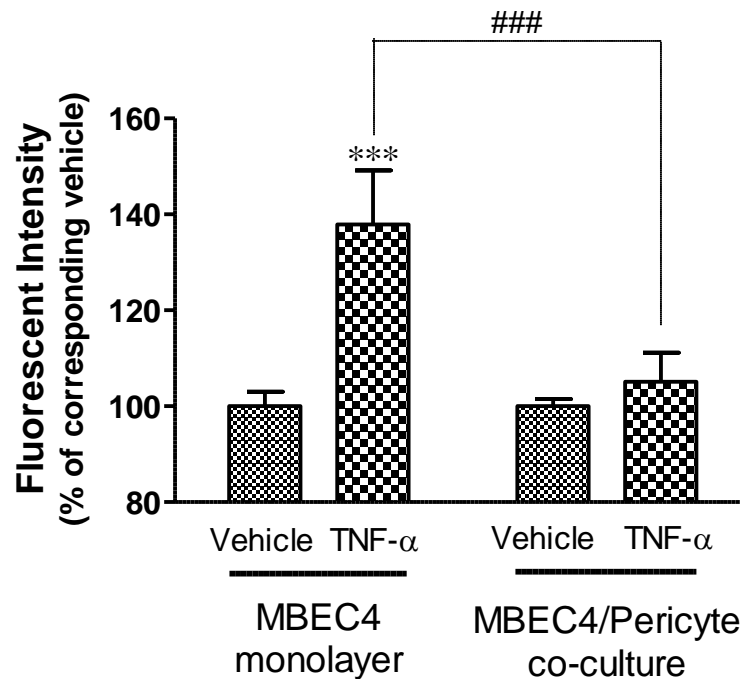


Fig. 10 Effect of TNF- α on migration of J774A.1 cells across MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

Migration assay was performed after a 24 hr-exposure of TNF- α (20 ng/mL). Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM. (n=9) ***p<0.001 vs vehicle. ###p<0.001 vs TNF- α -treated group.

3-7 MBEC4 の FITC-Albumin 透過性に対する TNF- α の作用

MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α (20 ng/mL) を 24 時間処理した後の MBEC4 の透過性を FITC-Albumin を用いて比較した結果を Fig. 11 に示した。

TNF- α を処理後の MBEC4 における FITC-Albumin の透過性は MBEC4/Pericyte co-culture 群と MBEC4 monolayer 群で変化はみられなかった。

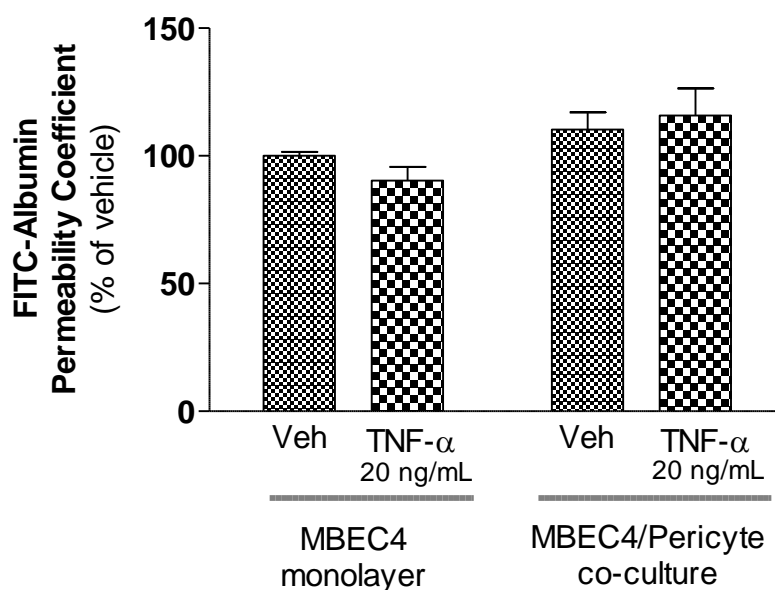


Fig. 11 Effect of TNF- α on FITC-Albmin permeability of MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.

Results are expressed as the percentage of vehicle. Values are means \pm SEM.(n=6)

4. 考察

MS に代表される自己免疫性神経疾患で認められる炎症細胞の脳浸潤は、その発症および病態の進展に寄与する。BBB 構成細胞のひとつであるアストロサイトは MCP-1 の産生を介して炎症性サイトカインによる単球やリンパ球の浸潤を促進し、内皮細胞における ICAM-1 および E-Selectin の発現が単球の浸潤に関与する [11]ことが明らかになっているが、炎症細胞の脳実質への浸潤におけるペリサイトの役割は未だ不明な点が多い。そこで本研究は、初代培養により単離・培養したラット脳ペリサイト、マウス脳毛細血管内皮細胞株、単球・マクロファージ細胞株を用いて、炎症病態下における脳血管内皮細胞上の接着分子発現や炎症細胞浸潤に着目し、それらへの脳ペリサイトの関与について検討した。

MS 患者の血清中では TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-1 β のサイトカイン濃度が増加する [12]。そこで本研究では TNF- α に注目して実験を行った。まず初めに、MBEC4 monolayer において TNF- α を処理することにより、濃度依存的およびに接着分子である E-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 発現量が増大することを確認した (Fig. 1)。その TNF- α 誘発性の接着分子の増加に伴って炎症細胞の MBEC4 への接着が増加するかを確認するために、MBEC4 monolayer に TNF- α を処理した後の単球・マクロファージ細胞株 (J774A.1 細胞) の MBEC4 への接着の変化を蛍光顕微鏡で撮影したところ、TNF- α 処理により MBEC4 上に接着する J774A.1 の細胞数が有意に増加した (Fig. 2)。以上より TNF- α による MBEC4 での接着分子の増加に伴い、炎症細胞 (マクロファージ) の MBEC4 への接着も亢進されることが明らかになった。

次に、脳ペリサイトが存在時の炎症性サイトカインである TNF α による脳血管内皮細胞膜上の接着分子 (E-Selectin、ICAM-1、VCAM-1) 発現量の変化を検討した。TNF- α を処理することにより、MBEC4 monolayer において増加した E-Selectin、ICAM-1 および VCAM-1 発現量は、MBEC4/Pericyte co-culture において抑制された (Fig. 3A, 3C, 3D)。しかし TNF- α 処理による P-Selectin 発現量の増加は見られなかった (Fig. 3B)。また、炎症性サイトカインを処理していない Vehicle 群では MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture を比較しても各接着分子の発現量に差が見られなかった。従って、脳ペリサイトは常態時では脳血管内皮細胞膜上の接着分子発現に影響を及ぼさないが、炎症病態時では接着分子の増加を抑制するように働くことが示唆される。HTSMCs においては TNF- α による VCAM-1 の発現に p42/p44 MAPK、p38、JNK および NF- κ B の活性化が関与している [13]。TNF- α によって増加した接着分子の発現は TNFR1 (TNF- α receptor 1) を介した NF- κ B の活性化が必要であると報告されている [14]。TNF- α が TNFR1 に結合すると受容体の三量体が誘導され、細胞膜下に複合体を形成し、I κ B のリン酸化を引き起こして I κ B の分解が誘導され、NF- κ B が活性する。また、MAPK p38 を活性化する経路や NADPH オキシダーゼを介した活性酸素の産生が関与していることが報告されている [15]。これらのことから脳ペリサイトによる、炎症性サイトカインによる脳血管内皮細胞膜の接着分子発現量増加の抑制や、炎症細胞の浸潤

の阻止はこれらの経路を抑制することにより惹き起こされていることが考えられる。そこで、まず MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α を処理した際の TNFR1 および TNFR2 の発現量の変化を検討したが、TNFR1、TNFR2 どちらも変化がみられなかった (Fig. 4A, 4B)。この結果よりペリサイトによる MBEC4 での接着分子の発現抑制が TNFR 減少による TNF- α の作用減弱ではなく、細胞内情報伝達経路の抑制を介している可能性が考えられた。TNF- α 誘発性の接着分子増加に至る細胞内伝達経路の解明のため、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) もしくは NF- κ B 阻害剤 (BAY11-7821) をそれぞれ TNF- α と併用すると、TNF- α による MBEC4 での接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) の発現量が減少した (Fig. 5, 6)。この結果より MBEC4 における接着分子の発現機序として TNF- α による p38 MAPK と NF- κ B の活性化が関与していると考えられた。次に MBEC4 monolayer における TNF- α による p38 MAPK と NF- κ B の活性化の経時的変化を調べた。TNF- α による p38 MAPK と NF- κ B の活性化はどちらも 30 分で最大となった (Fig. 7A, 7B)。さらに、ペリサイト存在下での TNF- α 負荷後 30 分における MBEC4 の p38 MAPK と NF- κ B の活性化の変化を検討した。TNF- α 処理によって MBEC4 monolayer で活性化した p38 MAPK および NF- κ B は MBEC4/Pericyte co-culture では抑制された (Fig. 8A, 8B)。以上の結果より、TNF α は p38 MAPK および NF- κ B の活性化を介して MBEC4 における接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) 発現を増加させる。脳ペリサイトはこの TNF- α による p38 MAPK および NF- κ B の活性化を抑制し、接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) の発現増加を抑制することが示唆された。

脳ペリサイトは TGF- β 産生を介して血液脳関門機能を亢進することが明らかになっている [6]ことから、MBEC4 における TNF- α による接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) 発現増加に対する TGF- β 1 の影響を検討した。TGF- β 1 併用により TNF- α によって増加した接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) の発現は抑制された (Fig. 9A, 9B)。この結果から脳ペリサイトによる TNF- α の接着分子発現増加作用の抑制に、脳ペリサイト由来液成因子である TGF- β 1 が関与していることが示唆された。しかしながら、実際に脳ペリサイトより産生された TGF- β による作用であるかを確認していないことから、TGF- β 抗体により脳ペリサイトの接着分子発現抑制作用が消失もしくは抑制されるかを確かめることは今後の検討課題である。

続いて、MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture に TNF- α を処理した後に、炎症細胞であるマクロファージの浸潤の変化を検討した。MBEC4 monolayer において、TNF- α 処理によって増加したマクロファージの脳実質側への浸潤は、MBEC4/Pericyte co-culture において抑制された (Fig. 10)。しかし、前述の通り脳ペリサイトは TGF- β 産生を介して血液脳関門機能を亢進する [6]。従って、この浸潤抑制がペリサイトによる BBB のバリア機能の変化によって起こったという可能性も否定できない。この可能性を検証するため、アルブミンを用いて TNF- α 処理後の MBEC4 透過性の変化を MBEC4 monolayer と MBEC4/Pericyte co-culture で比較したところ、変化は認められなかった (Fig. 11)。この結果からマクロファージの浸潤は BBB のバリア機能の低下により起こったわけではないこと、

また、ペリサイト存在下でのマクロファージの浸潤抑制は、ペリサイトの BBB のバリア機能の亢進ではなく、接着分子の発現の抑制に伴って起こったということが示唆された。

以上、本研究は脳ペリサイトが炎症性病態時における脳血管内皮細胞膜上の接着分子発現量の増加と、それに伴う炎症細胞の脳浸潤を阻止し、MS 治療において脳ペリサイト機能維持を目的とした新たな治療法の可能性を提起する基礎的実験証拠となると考える。

5. 小括

本章では、炎症病態時において脳ペリサイトの存在が炎症細胞の脳への浸潤を阻止することを明らかとした。この脳ペリサイトによる炎症細胞の脳浸潤抑制機構は、脳ペリサイト由来 TGF- β が関与する、脳血管内皮細胞の p38 MAPK および NF- κ B の活性化の抑制によるものと推察される。本結果は、脳ペリサイトー脳血管内皮細胞のクロストークが炎症細胞の脳浸潤に密接に関与しており、MS 治療においてペリサイトが新たな治療標的となる可能性を提示するものである。

第2章

脳ペリサイトによる $\text{TNF-}\alpha$ 誘発性のミクログリア活性化亢進

1. 序論

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、周囲の細胞も含めた機能構造体として **neurovascular units (NVU)** が提唱されている。NVU では、異なる細胞種同士の相互作用が脳機能の維持に必要とされ、NVU は、神経細胞に加え、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により構成される。NVU を構成する多様な細胞間の相互作用の上に脳の生理的および病態生理的機能は成立する。脳疾患では、これらの細胞間相互作用が異常化することで、脳バリア機能低下や障害因子の増加などが惹起され、脳内炎症が亢進して脳疾患の病態が進展すると考えられている。しかし、炎症病態時の NVU 細胞間情報伝達の仕組みは必ずしも明らかとはなっていない。

BBB は脳微小血管の解剖学的構造に由来する脳バリア機能を担う。末梢循環と中枢神経系の間における選択的な物質透過制御は、脳の重要な保護機構であり、BBB は末梢循環および脳実質間の物質移行や炎症細胞浸潤を制御する。脳卒中やアルツハイマー病、多発性硬化症などの中枢神経疾患、エイズ脳症などのウイルス性脳症では、BBB 機能障害が報告されており [1, 2]、BBB 機能障害は脳浮腫や、脳内炎症を惹起する [3, 4]。これらの脳炎症病態時においては、腫瘍壊死因子 (**Tumor Necrosis Factor- α ; TNF- α**) や **Interleukin (IL)-1 β** などの炎症性サイトカインも増加しており [5]、BBB 構成細胞の炎症応答は脳内炎症の調節において重要な役割を担う。BBB 構成細胞である脳ペリサイトは、マクロファージマーカーである **CD11b** の発現と貪食能を有することが報告されている [6]。また、Kovac らの報告では、マウス脳ペリサイトは炎症刺激に対する免疫応答を示し、サイトカイン/ケモカインを産生する [7]。これらの報告より、脳ペリサイトは脳内炎症への関与の可能性が示唆された。我々も、以前の研究において、脳ペリサイトが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、著しく **matrix metalloproteinase (MMP)-9** を産生することを報告した [8]。この結果は、脳ペリサイトが **TNF- α** が誘発する脳内炎症において重要な役割を果たす可能性を示唆する。

ミクログリアは脳内の免疫担当細胞であり、様々な刺激に応答して活性化され、脳内炎症に関与する。パーキンソン病やアルツハイマー病では、変性神経細胞の周囲に **TNF- α** や **IL-1 β** 陽性のミクログリアが認められ、活性化ミクログリアは **TNF- α** や **IL-1 β** などの炎症性サイトカイン、活性酸素種や一酸化窒素を放出し神経細胞傷害を惹起する [9]。神経変性疾患などの炎症病態下においては神経細胞障害およびミクログリアの活性化と共に、BBB 機能や脳微小循環の変化も観察される。しかし、BBB 構成細胞と活性化ミクログリアの相互作用に関する研究は少なく、脳炎症における脳ペリサイトの役割とミクログリアに対する影響は不明である。

本研究では、炎症反応時における BBB 構成細胞 (脳ペリサイト、アストロサイトおよび脳毛細血管内皮細胞) のミクログリア活性化作用の解明を目的とし、TNF- α 刺激による初代培養 NVU 構成細胞産生サイトカイン / ケモカインの解析および各 BBB 構成細胞-BV-2 ミクログリア *in vitro* 共培養モデルを用いて、TNF- α 誘発 BBB 構成細胞による BV-2 ミクログリア活性化の検討を行った。

2. 方法

2-1 細胞

2-1-1 脳ペリサイト

第一章 2-1-1 と同様に行った。

2-1-2 アストロサイト

第一章 2-1-3 と同様に行った。

2-1-3 RBEC

3 週齢のラットから全脳を摘出し、濾紙上にて硬膜、小脳、中脳、幹脳などを取り除き、大脳皮質のみを単離した。5 ml の DMEM (和光純薬工業、大阪) が入った 50 ml チューブの中に入れ、メスで大脳皮質を細断した。13 ml DMEM、2 ml collagenase type II (1 mg/ml ; Worthington, Lakewood, NJ, USA)、300 µl deoxyribonuclease I (1 mg/ml ; Sigma, St. Louis, MO, USA) を加え、ピペットで更に懸濁した。1 時間 15 分、恒温槽にて振盪後、10 ml DMEM を加え、1000 g、8 分間遠心した。上清を取り除き、25 ml 20 % BSA-DMEM を加え懸濁後、1000 g、20 分間遠心分離した。ペレットを 1.5 ml collagenase-dispase (1 mg/mL ; Roche, Basel, Stadt, Switzerland)、100 µl deoxyribonuclease I (1 mg/ml) を含む 13.5 ml DMEM に懸濁し、35 分間恒温槽にて振盪後、10 ml DMEM を加え、700 g で 6 分間遠心した。ペレットを 4℃、30000 g、1 時間遠心した 33 % パーコール溶液に重層させ、1000 g、10 分間遠心分離した。脳毛細血管片をシリンジで回収後、DMEM で 1 回洗浄した。得られた脳毛細血管片は、collagen type IV (0.1 mg/ml ; Sigma)、fibronectin (0.1 mg/ml ; Sigma) でコーティングしたディッシュに播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下で、10 % PDS、bFGF (1 ng/ml ; Roche)、heparin (10 mg/ml ; Sigma)、Insulin-transferrin-sodium selenite media supplement (ITS, Sigma)、L-glutamine (Sigma)、penicillin-streptomycin (Gibco, Carlsbad, California, USA)、puromycin (4 µg/ml ; Sigma)を含む DMEM/F12 (Sigma) 培養液で 4 日間培養後、脳毛細血管内皮細胞を得た。

2-1-4 ミクログリア

生後 1 日～3 日目のラットより全脳を摘出し、実体顕微鏡下で大脳皮質のみにした。1 ml の 10 % FBS DMEM が入った 15 ml チューブの中に入れ、メスで大脳皮質を細断し、ピペティングにより更に懸濁した。懸濁液をセルストレイナーでろ過し、8 °C、800 g、6 分間遠心した。上清を取り除き、10 % FBS、penicillin-streptomycin を含む DMEM で懸濁後、75 cm² 培養フラスコに播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下で培養した。培養液は播種 40~48 時間後に交換し、その後は 3 日毎に行った。10~14 日間培養後、培養フラスコを 180 rpm、15~20 分間振盪して浮遊した細胞を回収し、ペトリ皿に播種した。30 分、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下でインキュベーション後、PBS で 2 回洗浄し、ペトリ皿に接着しているミクログリアを回収し、実験に供した。

2-1-5 BV-2

C57BL/6 マウス由来の脳、ミクログリア細胞株 BV-2 細胞はコーティングしていない 75 cm² flask を用いて 37 °C、5 % CO₂ / 95 % 大気下、RPMI 1640、10 % fetal bovine serum、L-glutamine (5 mM) を含む DMEM 培養液にて培養し、実験に用いた。75cm² flask がコンフルエントになるまで 37 °C、5 % CO₂ / 95 % 大気下 37 °C で培養し、毎日培地交換を行った。

2-1-6 各種細胞単層培養モデルおよび 各種細胞-BV-2 共培養モデルの構築

脳ペリサイト単層培養モデル (monolayer) は、collagen type IV でコーティングした Transwell® (greiner bio-one 665630) インサートに脳ペリサイト (4.0×10⁴ cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下、20 % fetal bovine serum、L-glutamine、penicillin-streptomycin を含む DMEM 培養液にて培養した。

RBEC 単層培養モデル (monolayer) は、collagen type IV、Fibronectin でコーティングした Transwell® (greiner bio-one 665630) インサートに RBEC (10×10⁴ cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下、10 % fetal bovine serum、bFGF、heparin、ITS、L-glutamine、penicillin-streptomycin を含む DMEM/F12 培養液にて培養した。

アストロサイト単層培養モデル (monolayer) は、collagen type I、Fibronectin でコーティングした Transwell® (greiner bio-one 665630) インサートに アストロサイト (4.0×10⁴ cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下、10 % fetal bovine serum、L-glutamine、penicillin-streptomycin を含む DMEM (Hyclone) 培養液にて培養した。

また、各種細胞-BV-2 共培養モデル (coculture; 脳ペリサイト-BV-2、アストロサイト-BV-2、RBEC-BV-2) は 12 well plate (Costar 3515) に BV-2 (10×10^4 cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下、RPMI 1640、10 % fetal bovine serum、L-glutamine を含む DMEM 培養液で 3 時間インキュベーション後、各種細胞を播種した Transwell®インサートを、BV-2 を播種した 12 well plate に設置し、共培養した。

2-2 試薬処理

脳ペリサイト / BV-2、アストロサイト / BV-2、RBEC / BV-2 共培養モデルはモデル作製翌日に各 BBB 構成細胞に対応した培地で処理した。また、各共培養モデルに対応した BV-2 monoculture を用意し、各 BBB 構成細胞に対応した培地にて処理した。TNF- α は 20 ng/ml、GM6001 は 30 μ M で処理し 37 °C、5 % CO₂/95 % 大気下、24 時間恒温放置した。

2-3 試薬

TNF- α (Tumour necrosing factor- α , R&D Systems, MN, USA)

GM6001 (Calbiochem® 364205)

2-4 TNF- α 刺激による初代培養 NVU 構成細胞産生サイトカインおよびケモカインの解析

初代培養 RBEC、脳ペリサイト、アストロサイトおよびミクログリアは 30×10^4 cells / 60-mm dish で播種した。各細胞を 2 日間培養した後、0.1 % FBS を含む DMEM もしくは 0.1% FBS を含む DMEM で希釈調製した TNF- α を 24 時間処理した。TNF- α の濃度および暴露時間は予備実験を元に決定した(data not shown)。処理が終了した時点で培養上清を回収した。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は Milliplex™ MAP Cytokine/Chemokine Panel (Millipore, Schwalbach, Germany) を用いて測定した。数値は本アッセイのために得た検量線に基づいて計算し、検出限界以下もしくは検量線の範囲を超えた値についてはそれぞれ 0 もしくは 20,000 pg/mL とした。

2-5 RNA 抽出

処理を行った脳ペリサイト/BV-2、アストロサイト/BV-2、RBEC/BV-2 共培養モデルと各

BV-2 monoculture は 24 時間薬物処理後、各培地を除去した。培地除去後、セパゾール RNA I SuperG 1ml/well で細胞プレートのボトム側に加えた。セパゾール RNA I SuperG に BV-2 cell を溶かしだし、1.5mL tube に回収し、ボルテックスで攪拌した後、室温で 5 分間放置した。その後、クロロホルム 200 μ L/tube を加え、ボルテックスで 15 秒間よく混和し、室温で 2 分間放置した。12000 \times g、15 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した後、フェノール層（下層、緑色）と水層（上層）の界面を乱さないように注意しながら水層（上層）をあらかじめ 2-プロパノール 500 μ L を分注しておいた 1.5 mL tube に回収した。この際、フェノール層と水層の界面に存在する中間相を吸入しないように注意して操作した。軽くボルテックスで攪拌し、室温で 10 分間放置した。その後、12000 \times g、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した。上清を取り除き、ペレットが来ていることを確認し、75 %エタノール 1mL/tube を加えた。12000 \times g、1~2 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した後、75 %エタノールを取り除き、ペレットをよく乾燥させた。この後の作業からは氷上で行った。DEPC を適当量加え、ペレットを溶かし込んだ。溶かした RNA 溶液を 2 μ L 取り、RNA 濃度を測定した。その後、5 \times VILO Reaction Mix 4 μ L、10 \times Super Script Enzyme Mix 2 μ L と合わせて 20 μ L になるように RNA 溶液と DEPC の量を調整し、下記の条件にて RNA を逆転写し、cDNA を得た。

25 $^{\circ}$ C 10 分

42 $^{\circ}$ C 60 分

85 $^{\circ}$ C 5 分

2-6 PCR

TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 及び、 β -actin、それぞれの primer Mix を調整した。この後の作業からは氷上で行った。調整した primer Mix をボルテックスでよく混和した後、PCR 用 8 連 tube(株式会社イナ・オプティカ BIO-BIK 3135-00)に 18 μ L ずつ分注した。その後、template RNA を 2 μ L ずつ加えた。tube に蓋をし、タッピングした後、機械で測定を行った。

各 primer の設定を行うため、各 primer の検量線を求めた。Standard Sample を 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ M に希釈し、これらを鋳型として測定を行い、それぞれの濃度の Ct 値を算出する検量線を作成した。希釈した Standard Sample のうち、5~7 点を通し、検量線を作成した時の傾きから増幅効率を算出した。増幅効率が 100 に最も近いものをその primer の増幅効率とし、この作業を各 primer につき 2~3 回行った。2~3 回の平均を求め、各 primer の増幅効率を決定した。決定した各 primer の増幅効率をもとに、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて各 Sample における TNF- α 、IL-1 β 、iNOS の遺伝子発現量の定量を行った。データ解析には MxPro ソフトウェアを用いた。

PCR 法は以下の条件で行った。

2-6-1 PCR reaction Mixture の組成

2×SYBG QRT-PCR master mix	10 µL
Reference Dye	0.3 µL
template RNA	2 µL
Sense primer	1 µL
Anti Sense primer	1 µL
Autoclaved distilled water	5.7 µL
	Total 20 µL

2-6-2 RT-PCR Cycling Program

Cycle 1	95°C	3 分	×1
Cycle 2	95°C	15 秒	×45
	60°C	20 秒	
Cycle 3	95°C	1 分	×1
Cycle 4	55°C	30 秒	×81

2-6-3 プライマー

TNF- α (タカラバイオ)

Sense primer : TATGGCCCAGACCCTCACA

Anti Sense primer : GGAGTAGACAAGGTACAACCCAT

IL-1 β (QIAGEN)

iNOS (タカラバイオ)

Sense primer : CAAGCTGAACTTGAGCGAGGA

Anti Sense primer : TTTACTCAGTGCCAGAAGCTGGA

β -actin (ジーンネット)

2-6-4 使用キット名及び試薬

セパゾール RNA I SuperG (nacalai tesque)

5×VILO Reaction Mix (Invitrogen TM)
10×Super Script Enzyme Mix (Invitrogen TM)
Autoclaved distilled water (DEPC; nacalai tesque)
クロロホルム (KANTO CHEMICAL)
2-プロパノール (nacalai tesque)
エタノール (wako)
2×SYBR Green Reaction Mix (Agilent Technologies)
Reference dye (Agilent Technologies)

2-7 統計解析

データは平均±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には t 検定を用いた。多群間の比較には one-way ANOVA で解析後、Dunnett 法および Tukey-Kramer 法を用いた。検定は 5% 以下 ($p<0.05$) の危険率をもって有意とした。

3. 結果

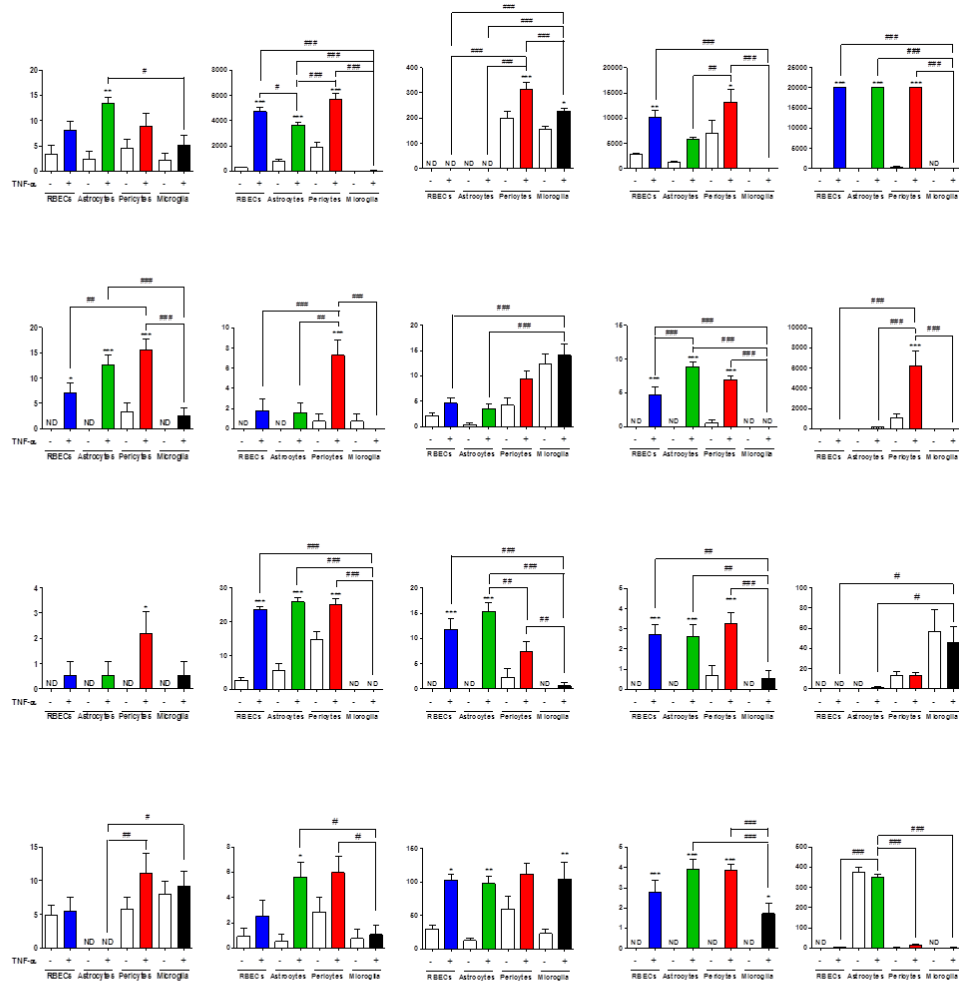
3-1 TNF- α 刺激による初代培養 NVU 構成細胞産生サイトカイン / ケモカインの放出

Fig. 1A に示すように、脳ペリサイトは自発的にエオタキシン、単球走化性タンパク質-1(monocyte chemoattractant protein (MCP)-1)、マクロファージ炎症性タンパク質-1(macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α)、growth-related oncogene (GRO/KC)、regulated on activation, T 細胞由来の好酸球走化性物質である RANTES、interferon gamma-induced protein (IP)-10、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-5、interferon (IFN)- γ 、IL-17、IL-18、IL-4、IL-13、IL-10 および vascular endothelial growth factor (VEGF) を放出した。脳ペリサイトから放出されるサイトカインおよびケモカインの中で、MCP-1、RANTES、IP-10、IL-6 および IL-5 の放出レベルは RBEC、アストロサイトおよびミクログリアと比較して有意に高かった。脳ペリサイトへの 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。TNF- α 刺激に伴って脳ペリサイトから放出された MCP-1、MIP-1 α 、GRO/KC、RANTES、IP-10、IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-5、IFN- γ 、IL-17、IL-13 および G-CSF は、TNF- α 刺激されたミクログリアからのこれらの放出量よりも多かった。また、TNF- α 刺激された脳ペリサイトと RBEC では、MIP-1 α 、IP-10、IL-1 α および IL-6 について脳ペリサイトからの放出量が有意に高かった。さらに、TNF- α 刺激された脳ペリサイトとアストロサイトにおいては、MCP-1、MIP-1 α 、GRO/KC、IL-1 α 、IL-6、IFN- γ および IL-4 の放出量が脳ペリサイトの場合で有意に高かった。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、脳ペリサイトは TNF- α 刺激による MIP-1 α 、IL-1 α および IL-6 の放出レベルが最も高かった。

Fig. 1B は各々の NVU 構成細胞から放出されたサイトカインおよびケモカインのプロファイルをレーダーチャートで表したものである。各軸は TNF- α 誘発性の特定のサイトカインもしくはケモカインの純増減を示すデルタ値を表す。得られた値で各軸間を結んだ多角形領域はサイトカインおよびケモカインの放出プロファイルを表す。脳ペリサイトのプロファイルは他の NVU 構成細胞とは大きく異なっており、脳ペリサイトのプロファイルパターンを示す赤線の多角形に示されるように、TNF- α 刺激による MIP-1 α および IL-6 の高い放出レベルが特徴的であった。アストロサイトへの TNF- α 刺激は eotaxin の放出を有意に増加させたものの、BBB 構成細胞間では TNF- α により増大した eotaxin の放出の程度に有意な差は認められなかった。また、アストロサイトのプロファイル (緑線) は RBEC のプロファイル (青線) と類似していた。黒線で囲まれた多角形領域はミクログリアのサイトカインおよびケモカインの放出プロファイルを示しており、4 種の細胞の中で最も小さかった。

A

Cytokines/chemokines (pg/mL)



B

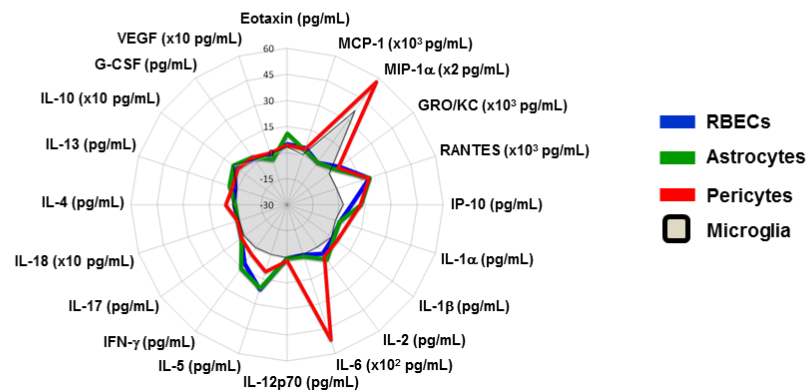


Fig. 1 (A) Release of cytokines/chemokines from primary cultured NVU cells in the absence (vehicle) and presence of TNF- α . Each bar shows the release level of the substance indicated at the top of each panel from RBECS (blue), astrocytes (green), pericytes (red) and microglia (black) in primary culture. Values represent the means \pm S.E.M. ($N = 9$ wells obtained from three independent experiments). ND, not detected. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significant differences from vehicle-treated cells, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences between TNF- α -treated cells. **(B) Cytokine/chemokine profiles on radar charts for RBECS, astrocytes, pericytes and microglia in primary culture.** Each axis indicates the delta value (change in TNF- α -induced cytokine and chemokine release from baseline). Profiles on radar charts show the net increase/decrease in the level of each substance released from RBECS, astrocytes, pericytes and microglia in primary culture. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3-2 BV-2 単層培養モデル(BV-2 monoculture) と各種共培養モデル(BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture) の各 mRNA 発現量の変化

3-2-1 脳ペリサイトーBV-2 共培養モデル (BV-2/pericyte coculture) における各 mRNA の発現量

BV-2 単層培養モデル (BV-2 monoculture) に対する脳ペリサイトーBV-2 共培養モデル (BV-2/pericyte coculture) の TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量の変化を Fig. 2A に示した (TNF- α :1.281 \pm 0.1026、IL-1 β : 0.8062 \pm 0.04252、iNOS: 1.22 \pm 0.2137)。

BV-2 monoculture と比較して、BV-2/pericyte coculture において TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現量に有意な差が認められた。iNOS mRNA 発現量においては、有意な差が認められなかった。

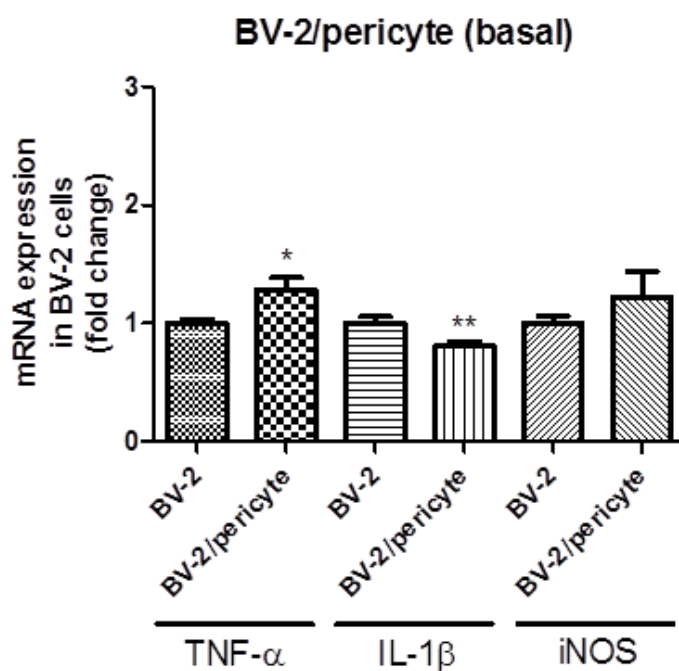


Fig. 2A Expression of mRNAs for TNF- α , IL-1 β , iNOS in BV-2 cells in the absence or presence of pericytes. BV-2 cells were grown in the absence or presence of pericytes for 24h. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in BV-2 cells to that in BV-2 cells in cultures treated with each corresponding culture medium. Values represent the means \pm S.E.M. (n = 12–15). * p <0.05, ** p <0.01 vs BV-2 monoculture.

3-2-2 アストロサイト-BV-2 共培養モデル (BV-2/astrocyte coculture) における各 mRNA の発現量

BV-2 単独培養モデル (BV-2 monoculture) に対するアストロサイト-BV-2 共培養モデル (BV-2/astrocyte coculture) の TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量の変化を Fig. 2B に示した (TNF- α :1.026 \pm 0.04714、IL-1 β : 0.8102 \pm 0.08263、iNOS:1.284 \pm 0.112)。

BV-2 monoculture と比較して、BV-2/astrocyte coculture において TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現量の有意な差が認められなかった。iNOS mRNA 発現量においては、有意な差が認められた。

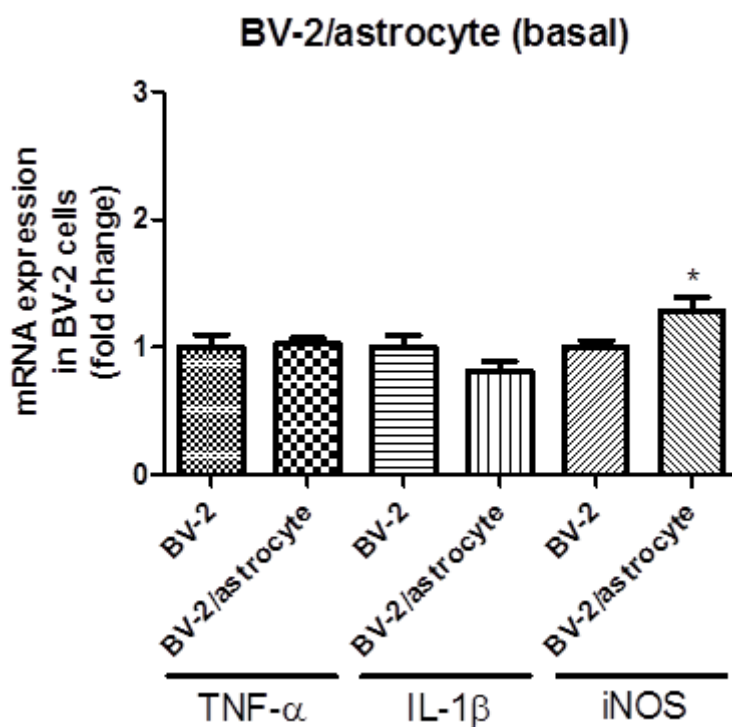


Fig. 2B Expression of mRNAs for TNF- α , IL-1 β , iNOS in BV-2 cells in the absence or presence of astrocytes. BV-2 cells were grown in the absence or presence of astrocytes for 24h. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in BV-2 cells to that in BV-2 cells in cultures treated with each corresponding culture medium. Values represent the means \pm S.E.M. (n = 9–12). * p <0.05 vs BV-2 monoculture.

3-2-3 RBEC-BV-2 共培養モデル (BV-2/RBEC coculture) における各 mRNA の発現量

BV-2 単独培養モデル (BV-2 monoculture) に対する RBEC-BV-2 共培養モデル (BV-2/RBEC coculture) の TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量の変化を Fig. 2C に示した (TNF- α : 1.45 ± 0.1648 、IL-1 β : 0.8537 ± 0.08322 、iNOS: 1.602 ± 0.1024)。

BV-2 monoculture と比較して BV-2/RBEC coculture において TNF- α 、iNOS mRNA 発現量の有意な差が認められた。IL-1 β mRNA 発現量においては、有意な差が認められなかった。

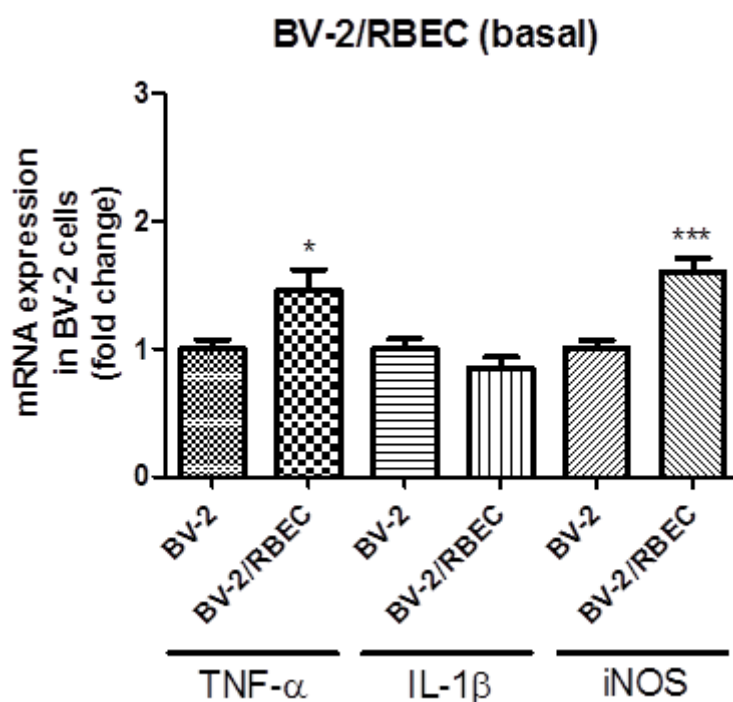


Fig. 2C Expression of mRNAs for TNF- α , IL-1 β , iNOS in BV-2 cells in the absence or presence of RBEC.

BV-2 cells were grown in the absence or presence of RBEC for 24h. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in BV-2 cells to that in BV-2 cells in cultures treated with each corresponding culture medium. Values represent the means \pm S.E.M. (n =8-9). * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs BV-2 monoculture.

3-3 TNF- α 刺激活性化 BV-2 存在下における各種共培養モデル (BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture) の各 mRNA 発現量の変化

3-3-1 TNF- α の mRNA 発現量

TNF- α 負荷により、BV-2 を活性化した際の各共培養モデル (BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture) の TNF- α mRNA 発現量の変化を Fig. 3A に示した (BV-2/pericyte: 4.593 ± 0.3214 、BV-2/astrocyte: 4.676 ± 0.3504 、BV-2/RBEC: 3.132 ± 0.5962)。TNF- α mRNA 発現量は BV-2/astrocyte coculture においてのみ有意な増加が認められた。しかし、BV-2/pericyte coculture と比較すると共培養モデル間において有意な差であるとは考えられない。

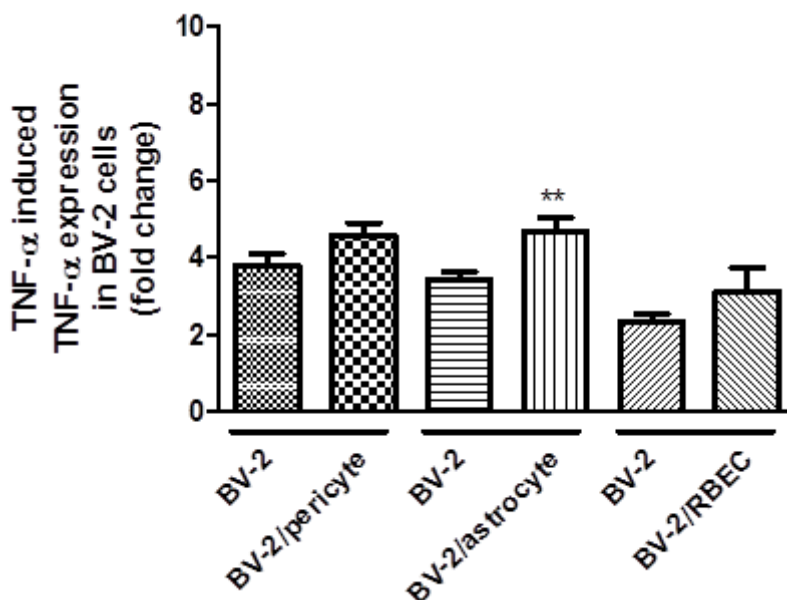


Fig. 3A TNF- α -induced expression of mRNAs for TNF- α in BV-2 cells in the absence or presence of pericytes, astrocytes and RBECs.

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. ($N = 8-12$ wells obtained from three or four independent experiments). ** $p < 0.01$ vs BV-2 monoculture.

3-3-2 IL-1 β の mRNA 発現量

TNF- α 負荷により、BV-2 を活性化した際の各共培養モデル (BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture) の IL-1 β mRNA 発現量の変化を Fig. 3B に示した (BV-2/pericyte: 11.35 ± 0.7562 、BV-2/astrocyte: 3.33 ± 0.3025 、BV-2/RBEC: 3.814 ± 0.5596)。IL-1 β mRNA 発現量は全ての共培養モデル (BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture)において有意な増加が認められた。特に、BV-2/pericyte coculture における IL-1 β mRNA の発現においては、他の共培養モデル (BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture)と比較して有意な差が認められた。

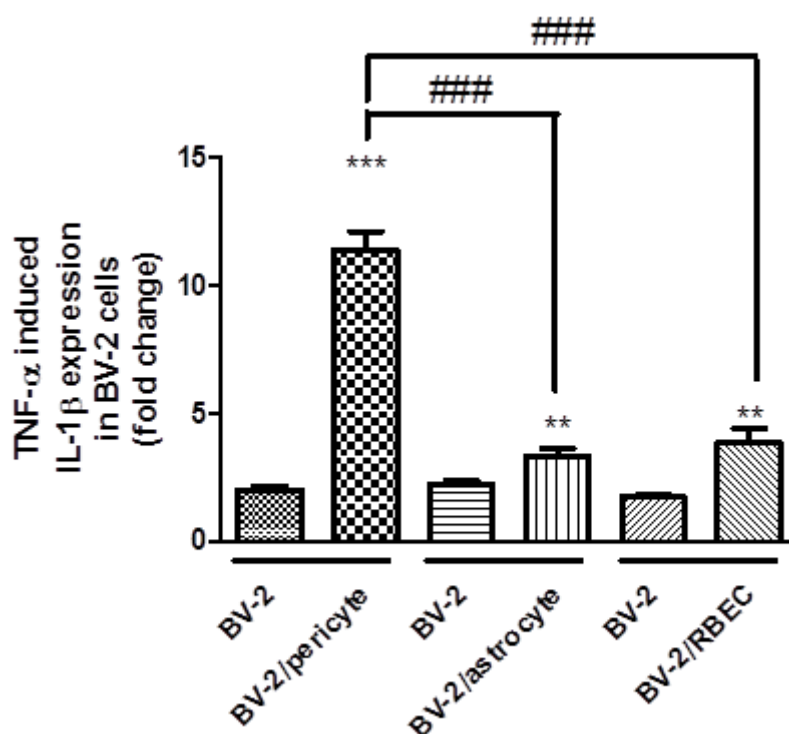


Fig. 3B TNF- α -induced expression of mRNAs for IL-1 β in BV-2 cells in the absence or presence of pericytes, astrocytes and RBECs.

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). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs BV-2 monoculture, ### $p < 0.001$ vs BV-2/pericyte coculture, significant differences from the TNF- α -treated BV-2 monoculture.

3-3-3 iNOS の mRNA 発現量

TNF- α 負荷により、BV-2 を活性化した際の各共培養モデル (BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture) における iNOS mRNA 発現量の変化を Fig. 3C に示した (BV-2/pericyte: 4.064 ± 0.4349 、BV-2/astrocyte: 2.452 ± 0.1949 、BV-2/RBEC: 2.012 ± 0.07731)。iNOS mRNA 発現量は BV-2/pericyte, BV-2/astrocyte coculture において有意な増加が認められた。BV-2/pericyte coculture は BV-2/astrocyte, BV-2/RBEC coculture と比較しても有意な差が認められた。

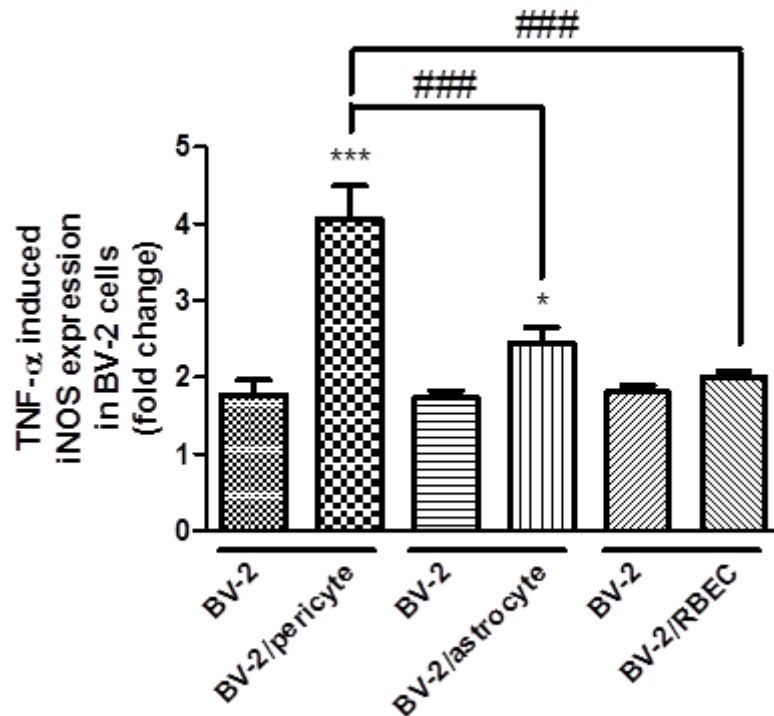


Fig. 3C TNF- α -induced expression of mRNAs for iNOS in BV-2 cells in the absence or presence of pericytes, astrocytes and RBECs.

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). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs BV-2 monoculture, ### $p < 0.001$ vs BV-2/pericyte coculture, significant differences from the TNF- α -treated BV-2 monoculture.

3-4 TNF- α 刺激活性化 BV-2 存在下における脳ペリサイトーBV-2 共培養モデル (BV-2/pericyte coculture) に対し、GM6001 を処理したときの各 mRNA 発現量の変化

TNF- α 負荷により、BV-2 を活性化した際の BV-2/pericyte coculture と同モデルに対し MMP-9 の阻害剤である GM6001 を負荷したときの TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量の変化を Fig. 4 に示した (TNF- α : 2.752 ± 0.2068 、IL-1 β : 7.292 ± 1.487 、iNOS: 2.889 ± 0.3119)。TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量においては、有意な差が認められなかった。

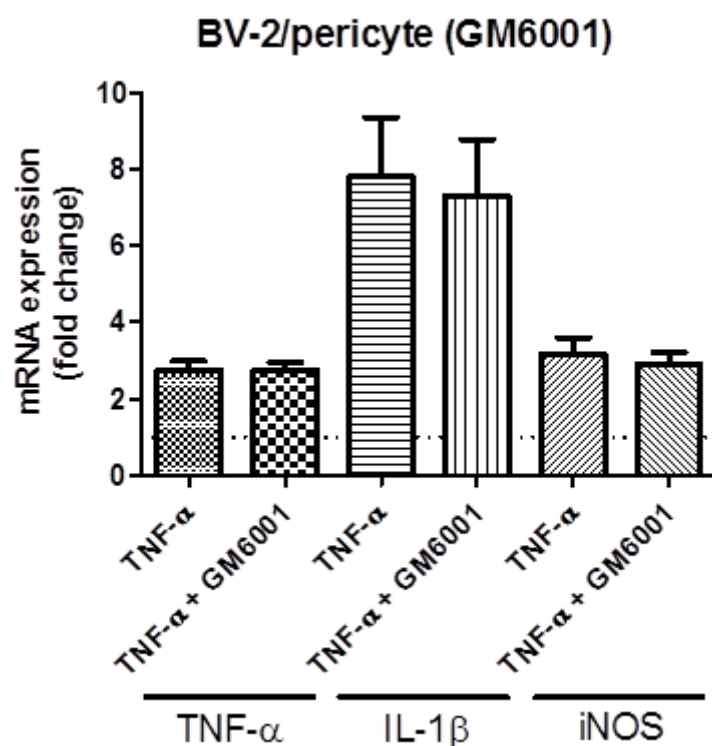


Fig. 4 Involvement of MMP9 in increase in TNF- α induced expression of mRNAs for IL-1 β and iNOS in BV-2 cells in the presence of pericytes.

BV-2 cells were grown with pericytes in the absence or presence of GM6001 for 24h. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in BV-2 cells to that in BV-2 cells in cultures treated with each corresponding culture medium. Values represent the means \pm S.E.M. (n =9-12).

4. 考察

本研究では、(1) TNF- α 刺激に伴う脳ペリサイト由来のサイトカインおよびケモカインの放出プロファイルは他の NVU 構成細胞 (RBEC、アストロサイト、ミクログリア) と異なっており、特に MIP-1 α と IL-6 放出の著しい増加が認められることおよび (2) TNF- α 刺激時に、BBB 構成細胞の中で脳ペリサイトとの共培養系において BV-2 ミクログリアの活性化の指標である iNOS と IL-1 β mRNA が最も多く発現することを明らかとした。

CNS の血管と神経領域間の構造的または機能的なリンクを表している NVU という概念は CNS の生理学および病理学の進展にとって非常に重要である [10]。NVU 内で近接する細胞からの過剰なサイトカインや他の炎症性分子の産生が脳内の炎症を引き起こし、その炎症は神経障害を与え得る [11]。TNF- α は炎症反応において他のサイトカイン/ケモカインカスケードの活性化を惹起する強力な炎症性サイトカインである [12]。以前の我々の研究において、脳ペリサイトは BBB 構成細胞内で TNF- α 誘発性の MMP9 産生能が最も高く、MMP9 の産生は自身の遊走へ関与していることを報告している。Pieper らはペリサイトが、特定の刺激物質、それらの濃度、インキュベーション時間および曝露のタイミングを含む種々の条件に応じて異なる免疫反応性を示すことを報告しており [13]、ペリサイトが IL-1 β 、IFN- γ および TNF- α のような刺激物質を介した自然免疫と適応免疫応答へと繋がる炎症カスケードに関与することを示唆している。Fig. 1A に示したように、他の NVU 構成細胞と比較して、TNF- α 応答によるペリサイトからの MIP-1 α と IL-6 の放出レベルは著しく増大し、また IL-1 α の放出レベルも有意に増大した。炎症の増幅器としての機能を持つ IL-6 を含むサイトカインと MIP-1 α のようなケモカインは脳内で免疫細胞をリクルートする役割を持つ [11, 14]。in vitro 実験系では、TNF- α 刺激されたペリサイトが好中球の BBB 通過による血管外遊走を促進させることが分かっている [15]。したがって、ペリサイトは TNF- α による MIP-1 α と IL-6 を主とするサイトカインおよびケモカインの放出を介して免疫細胞をリクルートすることにより脳の炎症を誘発する可能性が考えられる。

続いて、いかにしてサイトカインおよびケモカインが脳内の炎症の各段階においてペリサイトのセンサーもしくはエフェクターとしての挙動を制御しているのかを明確にするため、ミクログリアの活性化に着目した。TNF- α 刺激により脳ペリサイトが放出する MIP-1 α および IL-6 はミクログリアの増殖や活性化を含む神経炎症を引き起こし [14, 16]、そのミクログリアの活性化は NO、ROS および炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) のような炎症性メディエーターによって神経機能の障害を引き起こす [11]。本研究において、BV-2/pericyte coculture では、TNF- α 刺激により BV-2 ミクログリアの iNOS、IL-1 β の mRNA 発現量が、BV-2 monoculture と比較して有意に増加した (Fig. 3B, 3C)。つまり、TNF- α 刺激脳ペリサイトが、BV-2 ミクログリアの活性化を促進することを示唆した。さらに、脳ペリサイトによる BV-2 ミクログリア活性化促進作用は、他の BBB 構成細胞 (アストロサイト、脳血管内皮細胞) と比較して有意に高いとの結果を得た。

我々は、以前脳ペリサイトがアストロサイトおよび脳血管内皮細胞と比較して高い MMP-9 産生能を示すことを報告した。MMP-9 は組織の再構築や骨代謝などの過程において重要な生理学的機能を果たす [17-19]。多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) においては、MMP-9 が BBB 透過性の亢進や白血球の湿潤を増加させ、神経細胞障害を引き起こす [20]。また、MS では、ミクログリア活性化も観察され、炎症促進性のサイトカイン、ケモカインおよび活性酸素種を放出する [20-23]。従って、MMP-9 は炎症組織の損傷を伴う多くの疾患における組織障害・再構築にとっての重要なメディエーターであるといえる。そこで、TNF- α 刺激脳ペリサイト存在下における BV-2 ミクログリア *in vitro* 共培養モデル (BV-2/pericyte coculture) に対し MMP-9 の阻害剤である GM6001 を負荷したときの TNF- α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現量を測定した。GM6001 は、TNF- α 刺激による BV-2 ミクログリアの IL-1 β および iNOS mRNA 発現量の増加を抑制しなかった (Fig. 4)。我々の今回の実験結果から、脳ペリサイトが BV-2 ミクログリアを活性化する物質は MMP-9 ではないことが明らかとなった。つまり、脳ペリサイトから放出され、ミクログリアを活性化させる MMP-9 以外の液性因子の存在を示唆する。今後の研究においては、脳ペリサイト由来のミクログリア活性化を促進する因子の同定が必要とされる。

本研究において、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。

5. 小括

本章では、炎症性病態時において脳ペリサイトが他の NVU 構成細胞である脳血管内皮細胞、アストロサイトおよびミクログリアと比較して最も高い **MIP-1 α** 、**IL6** 産生能およびミクログリア活性化の亢進作用を持つことを明らかにした。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. 序論

視床下部は間脳に位置し、自律機能の調節を行うことで摂食行動、生殖行動、体温調節、概日リズム、免疫機能など多岐にわたる基本的な生命活動を担っている。近年、摂食行動を調節するインスリンやレプチンに代表されるホルモン、さらにこれらのホルモンにより制御される Akt、AMPK、Stat3 等のシグナル分子および神経ペプチドの役割が注目されている。

中枢におけるインスリンの活動はグルコースとエネルギー恒常性維持に重要である。身体の脂肪過多に比例して膵島から分泌されるインスリンは、飽和性の輸送機構を介して血液脳関門 (BBB) を通過し [1]、視床下部に作用することで血中グルコース及び摂食を調節する [2]。インスリン受容体は脳全体に分布しており、視床下部においてその発現量は特に多い [3]。脳特異的インスリン受容体欠損マウス (NIRKO マウス) では摂食量および体脂肪が増加し、肥満を呈した [4]。これらの結果は、視床下部におけるインスリン作用が摂食調節に必須であることを示唆している [5]。さらに、視床下部神経の炎症に伴うインスリン抵抗性が肥満の促進と密接に関連するという報告もいくつかある [6, 7]。

視床下部には摂食行動を調節する神経回路網が形成されている。その中でも、摂食促進神経ペプチド agouti-related protein (AgRP) と neuropeptide Y (NPY) と摂食抑制神経ペプチド alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) は、摂食行動を相反的に調節する機構として解析の進んでいる神経回路である [5]。インスリンやレプチンなどの摂食行動を抑制するシグナルは、視床下部において NPY / AgRP ニューロンの活動を減少させることで摂食抑制を引き起こす。近年、この摂食抑制効果は STAT3 や “metabolic sensor” として知られる AMPK などのシグナル分子により制御されていることが分かってきた [8, 9]。

Neurovascular unit (NVU) は神経の発達や維持そして再生に必要な、脳と血管を含む統合的ネットワークである [10]。多くの神経疾患は NVU 構成細胞間の情報伝達障害や機能障害に起因すると考えられている [11]。NVU は脳血管内皮細胞 (BMECs)、微小血管に存在するペリサイトおよび動脈における血管平滑筋細胞 (VSMCs)、アストロサイト、ミクログリアそして神経細胞から成る。神経細胞と他の NVU 構成細胞との相互作用に関する研究の多くはグリア細胞—神経細胞間の相互作用に焦点が当てられ、グリア細胞の神経細胞増殖、代謝および三者間シナプスへの影響が解明されてきた [12]。また、摂食に関与する視床下部神経細胞へのシナプス入力にもアストロサイトが関与することが明らかとなった [13]。脳ペリサイトは血管壁の外側に密着して存在し、血管の最も内腔を覆う BMECs と基底膜を共有しており、アストロサイトのエンドフィートとも直接接触している [14]。脳ペリサイトは、脳血管内皮細胞、アストロサイトとともに BBB を形成する。脳ペリサイトが産生する液性因子を介して BMECs へ情報伝達することで BBB 機能を亢進する [15-17]。最近の Bell らの報告によると、加齢に伴いペリサイトを欠損するマウスでは、神経退行性変化、学習や記憶障害、および神経炎症反応に先行した脳血管障害が生じることが分かった [18]。これらの知

見を鑑みると、脳ペリサイトは神経細胞と直接もしくは自身が産生する生理活性物質などの液性因子を介して密接にコミュニケーションをとっている可能性が考えられる。しかしながら、視床下部インスリン感受性を含む、視床下部神経の摂食調節能に対してペリサイトがどのように関わるかは不明なままである。

そこで本研究では、脳ペリサイトが産生・放出する液性因子が、視床下部神経細胞におけるインスリン感受性およびその他の摂食調節シグナルに影響を与えるかを明らかにするため、初代培養ラット脳ペリサイトから得られたコンディショニングメディウムを用いて不死化視床下部細胞株、GT1-7 細胞のインスリンシグナル伝達経路および摂食調節シグナル分子への影響を検討した。

2. 方法

2-1 細胞

2-1-1 脳ペリサイト

第一章 2-1-1 と同様に行った。

2-1-2 アストロサイト

第一章 2-1-3 と同様に行った。

2-1-3 ラット大動脈血管平滑筋細胞 (Rat aortic smooth muscle, RASMs)

RASMs は 6-8 週齢、雄性の Sprague Dawley ラットより以前の報告に従い単離した[19]。細胞は、37°C、5% CO₂ / 95% 大気下、10% FBS、penicillin 100 units/mL、streptomycin 100 µg/mL および L-glutamine 2mM を含む DMEM にて培養した。

2-1-4 GT1-7 細胞

マウス脳視床下部由来の不死化神経培養細胞である GT1-7 細胞を培養フラスコにて継代維持し実験に用いた。細胞は、37°C、5%、CO₂ / 95% 大気下、10% FBS、penicillin 100 units/mL および streptomycin 100 µg/mL を含む DMEM にて培養した。

2-2 試薬処理

GT1-7 細胞はコンフルエントになるまで培養した後、fetal bovine serum 10 % および penicillin 100 units/mL、streptomycin 100 µg/mL を含む DMEM を除去し、serum-free DMEM (without gentamicin) を用いて 2 回洗浄し、serum-free DMEM (without gentamicin) で 6 時間前処理した。続いて、薬液が適切な濃度になるように加え、37 °C、5% CO₂ インキュベータ下で必要時間放置した。

2-3 試薬

Insulin (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)

2-4 実験手順

2-4-1 Immunohistochemistry

実験動物は8週齢のICR系雄性マウス (kyudo, Tosu, Japan) を用いた。固形資料および水は自由に摂取できるようにした。飼育環境は室温 22 ± 2 °C および明暗 12 時間周期 (明記 AM7:00—PM7:00) とした。実験動物の取り扱いについては、福岡大学実験動物委員会 (Laboratory Animal Care and Use Committee of Fukuoka University) に準じた。

マウスは4%パラホルムアルデヒド・0.1M リン酸緩衝液で心臓経由にて全身を灌流固定した。灌流固定後、30 分間水中にて放置し、その後脳組織を取り出した。脳組織は一晩 (4°C) 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、さらに一晩 (4 °C) 20%スクロースで置換した。脳組織は OCT (Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) を用いて包埋し、-80 °C にて保存した。視床下部の冠状切片 (10 μ m) はクリオスタット (Leica CM1850, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) を用いて作成した。bregma -1.82 to -2.18 mm (Franklin and Paxinos mouse brain atlas) の範囲の切片を蛍光免疫染色の試料とした。試料を水道水、TritonX-100-Tris Buffer Saline (T-TBS) でそれぞれ 5 分間、3 回洗浄し、賦活化のために 1 mM EDTA 処理を 15 分 (95 °C、水浴中) 行い、室温に戻した後 T-TBS で洗浄した。その後 blocking one Histo (Nacalai Tesque) による処理を 1 時間 (室温) 行った。一次抗体反応は一晩 (4 °C) 行った。一次抗体反応後、T-TBS で 5 分間、3 回洗浄した試料に、二次抗体を一晩 (4 °C、遮光) 反応させ、再び T-TBS を用いて 15 分間、4 回洗浄した。最後に、蛍光染色を施した試料は、DAPI 含有の VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA) を用いて核染色・封入した。観察は蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710, KEYENCE Corporation, Osaka, Japan) を用いて行った。ネガティブコントロールとして、一次抗体の代わりに T-TBS を処理したものを使用した。二重免疫染色では一次抗体、二次抗体ともに抗体を混合し処理した。使用した抗体は以下のとおりである。

一次抗体

Mouse PDGFR beta Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG (R&D Systems, AF1042) 1:100

Anti-Laminin antibody produced in rabbit (Sigma, St. Louis, MO, L9393) 1:25

二次抗体

Donkey Anti-Goat IgG(H+L)-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 1:200

一次抗体は上記の濃度となるよう T-TBS で希釈した。

二次抗体は上記の濃度となり、かつ Blocking One 10% となるよう T-TBS で希釈した。

10×TBS の調製

1 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane Purity (pH 8.0) (Nacalai Tesque) 242.28 g (final concentration 100 mM)、NaCl 175.32 g (136 mM)を精製水に溶かし、濃塩酸で pH 7.6 に合わせ、2 L にしたものを 4 °C で保存した。

0.2% T-TBS の調製

10×TBS 200 mL、tritonX-100 4 mL を精製水に溶かし、2 L にしたものを 4°C で保存した。

0.4% T-TBS の調製

10×TBS 200 mL、tritonX-100 8 mL を精製水に溶かし、2 L にしたものを 4°C で保存した。

2-4-2 培養上清の回収

単離した各初代培養細胞（脳ペリサイト、アストロサイト、RASM）をコンフルエントになるまで培養し、serum-free DMEM (without gentamicin) を用いて 2 回洗浄し、12 ml serum-freeDMEM (without gentamicin) で 12 時間前処理した。その後 12 mL serum-free DMEM (without gentamicin) の環境下で 24 時間インキュベートした培養上清を回収し、pericyte conditioned medium (PCM)、astrocyte conditioned medium (ACM)、RASM conditioned medium (RASM-CM) として実験に用いた。

2-4-3 Sampling for western blot analysis (cell lysate)

試薬処理溶液を除去した後、1×TBS (3 mL)で 3 回洗浄した。細胞溶解液 (80 µL)を添加し、セルスクレイパーを用いて GT1-7 細胞を溶解し、1.5 mL コーティングチューブに移した。氷上で 1 時間放置した後、25°C、15,000 rpm、15 分間で遠心分離し細胞可溶化分画（上清）を回収後、BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Rockford, IL, USA)を用いてタンパク質濃度を測定した。各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるよう必要に応じて lysis buffer で希

積調製した。sample buffer (3 ×)に 2-メルカプトエタノールを 8.9 % (v/v) 加えたものを細胞溶解液の半分量加え、95°C で 5 分間加熱し、western blot 用サンプルとした。

各 buffer の組成および調製は第一章 2-4-2 と同様に行った。

2-4-4 Sampling for western blot analysis (Preparation of Membrane and Cytosol Fractions)

試薬処理溶液を除去した後、1×TBS (10 mL)で 3 回洗浄した。PBS (4 mL)を添加し、セルスクレイパーを用いて GT1-7 細胞を回収し、懸濁液を、4°C、1000 g、5 分間で遠心分離した。上澄み液を捨て、細胞質抽出液 (100 μL) を添加、懸濁し、1.5 mL コーティングチューブに移した。氷上で各サンプルをソニケーションした後、25°C、15,000 rpm、15 分間で遠心分離し細胞質画分(上清)として回収した。続いて、細胞質可溶化分画回収後のペレットに細胞溶解液 (70 μL)を添加し、ソニケーション後に、4°C、60 分間振盪した。溶解液を 5°C、15,000 rpm、15 分間で遠心分離し上清を細胞膜画分として回収した。BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Rockford, IL, USA)を用いて各上清のタンパク質濃度を測定した。各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるよう必要に応じて用いた細胞質抽出液もしくは細胞溶解液で希釈調製した。sample buffer (3 ×)に 2-メルカプトエタノールを 8.9 % (v/v) 加えたものを細胞溶解液の半分量加え、western blot 用サンプルとした。

2-4-5 Western blot analysis (cell lysate)

泳動槽 (BIO RAD)にゲル (8% SDS-PAGE, 10 well)および泳動 buffer をセットし、室温に戻したサンプルを 25 μg、マーカーを 5 μL アプライし、0.03 A/ゲルで 60 分間電気泳動した。泳動中に、blot paper (BIO-RAD)は転写 buffer に 15 分間程度浸し、PVDF メンブラン (BIO-RAD)はメタノールに 1 分間さらした後転写 buffer に 15 分間程度浸した。泳動終了後ゲル板からゲルを剥がし転写 buffer に浸した。転写装置 (BIO-RAD)に陽極側から blot paper、メンブラン、ゲル、blot paper の順で密着させ 16 V、90 分間セミドライ方式で転写した。メンブランを 0.1% tween20 TBS (以下 TBST) にさらした後、パラフィルムにはさんで適当な位置でカットした。50 mL tube にメンブランとブロッキングワン (Nacalai Tesque, Inc., 03953-95, Kyoto, Japan)を入れ、室温で 30 分間ブロッキングした。希釈した一次抗体をブロッキングと同様に 50 mL tube を用いて 4°Cで over night 処理した。TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、希釈した二次抗体を同様に室温で 1 時間処理した。TBST で 5 分間ずつ 5 回洗浄し、目的たんぱく質を ECL advance (GE Healthcare)により発光させ、CCD イメージャー fluor chemTM (Alpha Inotech)で検出した。画像処理及び解析は Image J Launcher を用いた。

一次抗体

Phospho-Akt...Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) Rabbit mAb (Cell Signaling, #2965) 1 : 1000

Akt...Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (Cell Signaling, #4691) 1 : 1000

IR β ...Insulin Receptor β (4B8) Rabbit mAb (Cell Signaling, #3025) 1 : 1000

Phospho-IR β ...p-insulin R β Antibody (Tyr 1162/1163) (Santa Cruz, sc-25103-R) 1 : 200

Flotillin-1...Flotillin-1 Antibody (Cell Signaling, #3253) 1 : 1000

IRS1...IRS-1 (D23G12) Rabbit mAb (Cell Signaling, #3407) 1 : 500

IRS2...IRS-2 Antibody (Cell Signaling, #4502) 1 : 500

β -actin...Rabbit polyclonal to beta Actin (Abcam, ab8227) 1 : 5000

二次抗体

ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase-Linked Species-specific Whole antibody (from donkey) (GE Healthcare, NA934, UK)

1:10000(phospho-Akt, Akt, IR β , phospho-IR β , flotillin-1, IRS-1, IRS-2, β -actin)

リン酸化特異抗体は 5%ブロッキングワシ-P/T-TBS 希釈し、それ以外の抗体は 5%ブロッキングワシ/T-TBS で希釈した。

2-4-6 RNA 抽出

GT1-7 細胞は脳ペリサイト培養上清処理したものを用いた。培養上清を除去後、1×TBS で 2 回洗浄し、セパゾール RNA I SuperG 1ml/well で細胞プレートに加えた。セパゾール RNA I SuperG に GT1-7 細胞を溶かしだし、1.5mL tube に回収し、ボルテックスで攪拌した後、室温で 5 分間放置した。その後、クロロホルム 200 μ L/tube を加え、ボルテックスで 15 秒間よく混和し、室温で 2 分間放置した。12000×g、15 分、4 °C で遠心した後、フェノール層（下層、緑色）と水層（上層）の界面を乱さないように注意しながら水層（上層）をあらかじめ 2-プロパノール 500 μ L を分注しておいた 1.5 mL tube に回収した。この際、フェノール層と水層の界面に存在する中間相を吸入しないように注意して操作した。軽くボルテックスで攪拌し、室温で 10 分間放置した。その後、12000×g、10 分、4 °C で遠心した。上清を取り除き、ペレットが出来ていることを確認し、75 %エタノール 1mL/tube を加えた。12000×g、1～2 分、4°C で遠心した後、75 %エタノールを取り除き、ペレットをよく乾燥させた。この後の作業からは氷上で行った。DEPC を適量加え、ペレットを溶かし込んだ。溶かした RNA 溶液を 2 μ L 取り、RNA 濃度を測定した。その後、5×VILO Reaction Mix 4 μ L、10×Super Script Enzyme Mix 2 μ L と合わせて 20 μ L になるように RNA 溶液と DEPC の量を調整し、RNA を逆転写した。

25°C 10 分

42°C 60 分

85°C 5 分

2-4-7 PCR

AgRP および β -actin、それぞれの primer Mix を調整した。この後の作業からは氷上で行った。調整した primer Mix をボルテックスでよく混和した後、PCR 用 8 連 tube (株式会社イナ・オプティカ BIO-BIK 3135-00) に 18 μ L ずつ分注した。その後、template RNA を 2 μ L ずつ加えた。tube に蓋をし、タッピングした後、機械で測定を行った。

各 primer の設定を行うため、各 primer の検量線を求めた。Standard Sample を 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625 μ M に希釈し、これらを鋳型として測定を行い、それぞれの濃度の Ct 値を算出する検量線を作成した。希釈した Standard Sample のうち、5~7 点を通し、検量線を作成した時の傾きから増幅効率を算出した。増幅効率が 100 に最も近いものをその primer の増幅効率とし、この作業を各 primer につき 2~3 回行った。2~3 回の平均を求め、各 primer の増幅効率を決定した。決定した各 primer の増幅効率をもとに、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて各 Sample における TNF- α 、IL-1 β 、iNOS の遺伝子発現量の定量を行った。データ解析には MxPro ソフトウェアを用いた。

PCR 法は以下の条件で行った。

PCR reaction Mixture の組成

2 \times SYBG QRT-PCR master mix	10 μ L
Reference Dye	0.3 μ L
template RNA	2 μ L
Sense primer	1 μ L
Anti Sense primer	1 μ L
Autoclaved distilled water	5.7 μ L
	Total 20 μ L

RT-PCR Cycling Program

Cycle 1 95°C 3 分 \times 1

Cycle 2 95°C 15 秒 \times 45

	60°C	20 秒	
Cycle 3	95°C	1 分	×1
Cycle 4	55°C	30 秒	×81

プライマー

AgRP

Sense primer : CCGCGAGTCTCGTTCTCCGC

Anti Sense primer : GGTTTCGTGGCCGTACCCAGC

使用キット名及び試薬

セパゾール RNA I SuperG (nacalai tesque)

5×VILO Reaction Mix (Invitrogen TM)

10×Super Script Enzyme Mix (Invitrogen TM)

Autoclaved distilled water (DEPC; nacalai tesque)

クロロホルム (KANTO CHEMICAL)

2-プロパノール (nacalai tesque)

エタノール (wako)

2×SYBR Green Reaction Mix (Agilent Technologies)

Reference dye (Agilent Technologies)

2-5 統計解析

データは平均±標準誤差で表した。2 群間の平均値の比較には t 検定を用いた。多群間の比較には one-way および two-way ANOVA で解析後、Dunnnett 法および Tukey-Kramer 法を用いた。検定は 5%以下 ($p<0.05$) の危険率をもって有意とした。

3. 結果

3-1 視床下部における脳ペリサイトおよび基底膜の分布

蛍光免疫組織化学染色を用いて、視床下部における PDGFR β (ペリサイトのマーカー) 及び ラミニン (基底膜のマーカー) の発現を観察した (Fig. 1A, 1B)。PDGFR β 陽性ペリサイトの多くは、ラミニン陽性基底膜層に覆われていた (Fig. 1D, 1E)。

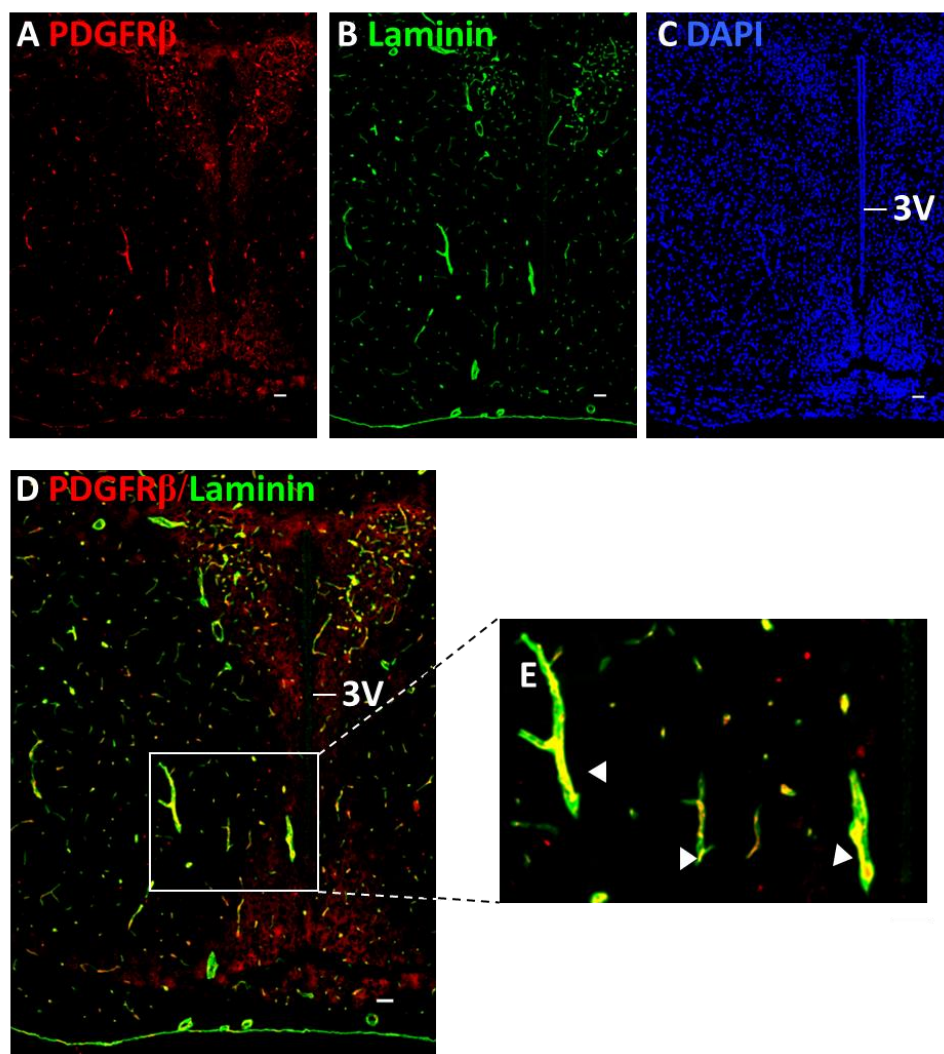


Fig. 1 The distribution of PDGFR β -immunoreactive pericytes and laminin-immunoreactive basal lamina in the hypothalamus.

Double immunofluorescence staining of PDGFR β (red) (A) and laminin (green) (B) in the hypothalamus. Nuclei in the cells were stained with DAPI (blue) (C). The merged images (D) (E) showing PDGFR β -immunoreactive pericytes covered with laminin-immunoreactive basal lamina (arrowheads). The enlarged photograph (E) represent the area indicated in the merged image (D). Scale bars = 50 μ m.

3-2 GT1-7 細胞におけるインスリン誘発性 Akt リン酸化に対する脳ペリサイト、アストロサイトおよび大動脈血管平滑筋細胞 (RASM) 培養上清の影響

GT1-7 細胞にペリサイト培養上清 (PCM) を 2、4、8 時間処理した後に、インスリン (1 $\mu\text{g/mL}$) を 10 分間刺激したときの GT1-7 細胞の Akt リン酸化の変化を Fig. 2A に示した。インスリン誘発性の Akt リン酸化は、PCM を 2 時間および 4 時間前処理した際において有意に増加した (Fig. 2A)。その増加は 2 時間の前処理で最大となり、4 時間、8 時間では減少した。インスリンを処理していない群においては有意な増加はみられなかった。また、2 倍および 4 倍に希釈した PCM は、インスリン誘発性 Akt リン酸化を濃度依存的に減少させた (Fig. 2B)。また、アストロサイトおよび大動脈平滑筋細胞由来の液性因子にも PCM と同様の作用があるかを検討した。インスリン刺激による GT1-7 細胞内の Akt リン酸化は、アストロサイト培養上清 (ACM) および RASM 培養上清 (RASM-CM) を前処理しても、有意な変化は認められなかった (Fig. 2C, 2D)。

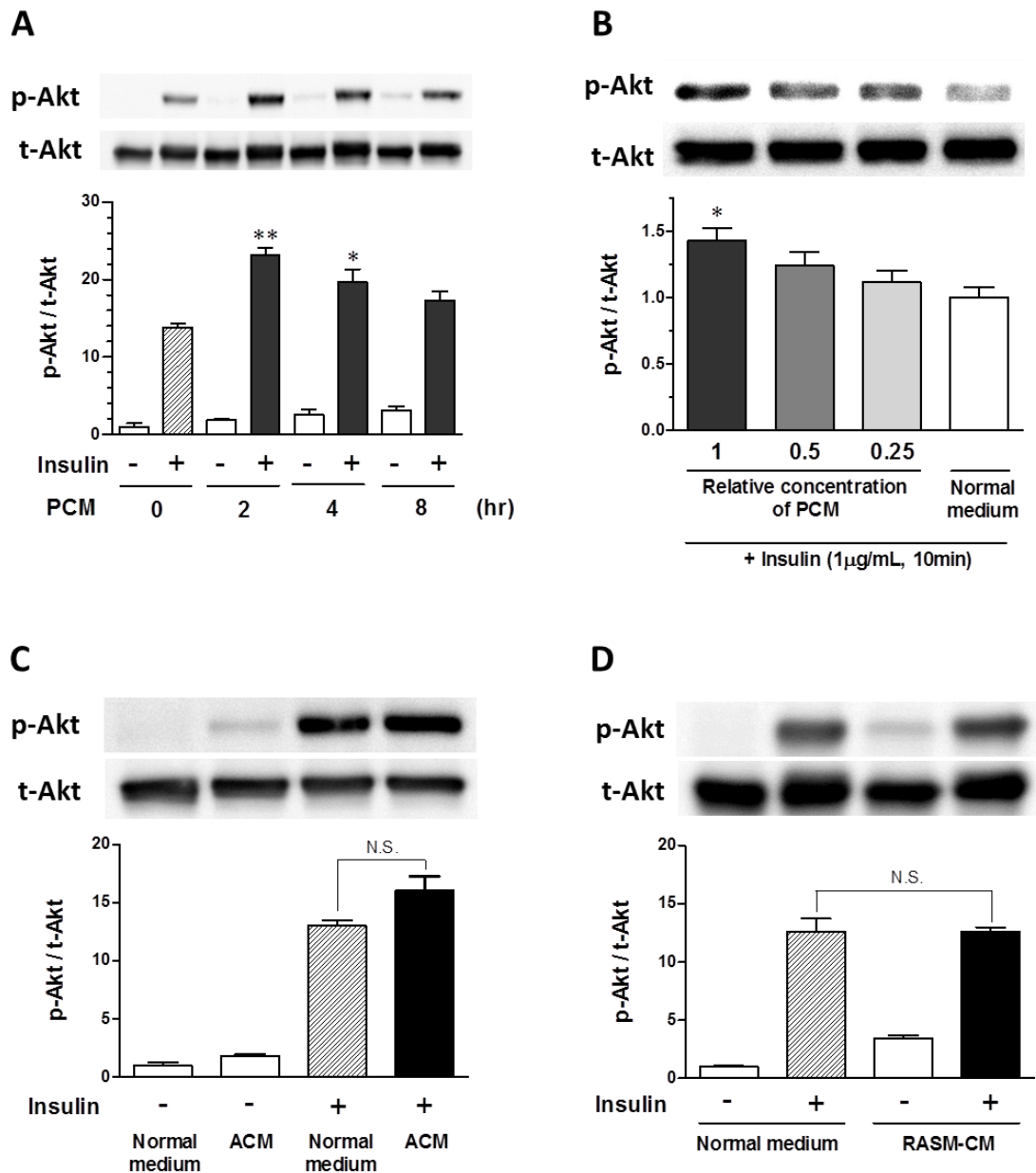


Fig. 2 Effects of conditioned media obtained from primary culture of pericytes, astrocytes and RASMs on the insulin-induced phosphorylation of Akt at Thr308 in GT1-7 cells.

In each figure, representative images show Western blots of phosphorelated Akt (p-Akt) and total Akt (t-Akt) at the top and the bar graphs show quantitative analysis of Western blots at the bottom. (A) GT1-7 cells were treated with PCM for the indicated time periods followed by insulin treatment (1 μg/mL) for 10 min. (B) GT1-7 cells were treated with insulin (1 μg/mL) for 10 min following 2-hr exposure of PCM prepared at the indicated relative concentrations (0.25 - 1). (C) (D) GT1-7 cells were treated with ACM (C) or RASM-CM (D) for 2 h followed by insulin treatment (1 μg/mL) for 10 min. Band intensities were quantified by scanning densitometry. Expression levels of p-Akt were normalized to total levels and results are expressed relative to corresponding control levels (set to 1.0). Values are means ± SEM (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.01.

3-3 GT1-7 細胞におけるインスリンシグナル伝達分子に与える PCM の影響

Akt の上流に位置するインスリンシグナル伝達分子への PCM の影響を明らかにするため、PCM が IR β の発現量及び局在を変化させるかを検討した。PCM を 2 時間処理した後の GT1-7 細胞は前述の方法に従い、細胞膜画分と細胞質画分に分画した。細胞膜マイクロドメインのマーカである flotillin1 は細胞膜画分において検出され、細胞質画分では検出されなかった (Fig. 3A)。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 (Fig. 3A)。一方で、GT1-7 細胞のインスリン誘発性の IR β の Tyr1162/1163 リン酸化は PCM 処理により有意に増大した (Fig. 3B)。

続いて、GT1-7 細胞における Insulin receptor substrate (IRS) の発現量を測定した。PCM を 2 時間処理した群における IRS-1 および IRS-2 の総タンパク質量に変化は認められなかった (Fig. 3C, 3D)。

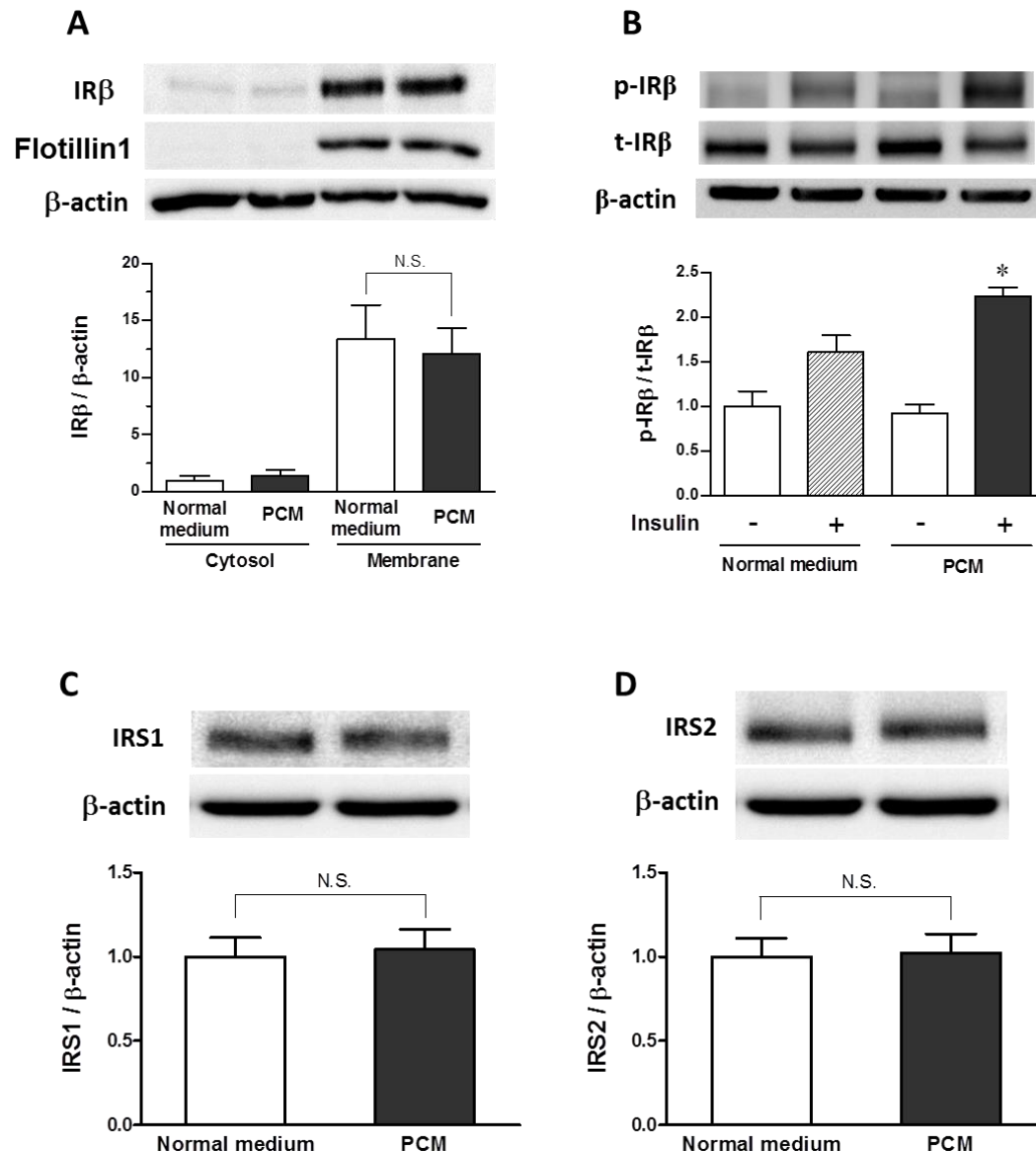


Fig. 3 Effects of PCM on the insulin signaling molecules in GT1-7 cells.

GT1-7 cells were treated with or without PCM for 2 hr. In each figure, representative images show Western blots at the top and the bar graphs show quantitative analysis of Western blots at the bottom. (A) Expression and localization of IRβ in GT1-7 cells. Membrane and cytosolic proteins were extracted as described in the Methods. (B) Insulin-induced phosphorylation of IRβ at Tyr1162/1163 in GT1-7 cells. GT1-7 cells were treated with insulin (1μg/mL) for 10 min following 2-hr exposure of PCM. (C) (D) Expression levels of IRS-1 (C) and IRS-2 (D) in GT1-7 cells. Band intensities were quantified by scanning densitometry and results were expressed relative to the corresponding control levels (set to 1.0). Expression level of p-IRβ was normalized to total IRβ level. IRβ, IRS-1 and IRS-2 were normalized to β-actin. Values are means ±SEM (n = 3-4). *p < 0.05.

3-4 GT1-7 細胞における摂食調節に関与するシグナル伝達分子に与える PCM の影響

GT1-7 細胞にペリサイト培養上清 (PCM) を 2、4、8 時間処理した際の GT1-7 細胞の AMPK および STAT3 のリン酸化の変化を Fig. 4 に示した。AMPK のリン酸化は、PCM を 2 時間および 8 時間処理した際において有意に抑制された (Fig. 4A)。また、STAT3 のリン酸化は、PCM を 2 時間および 4 時間処理した際に有意に増加し、4 時間で最大となった (Fig. 4B)。

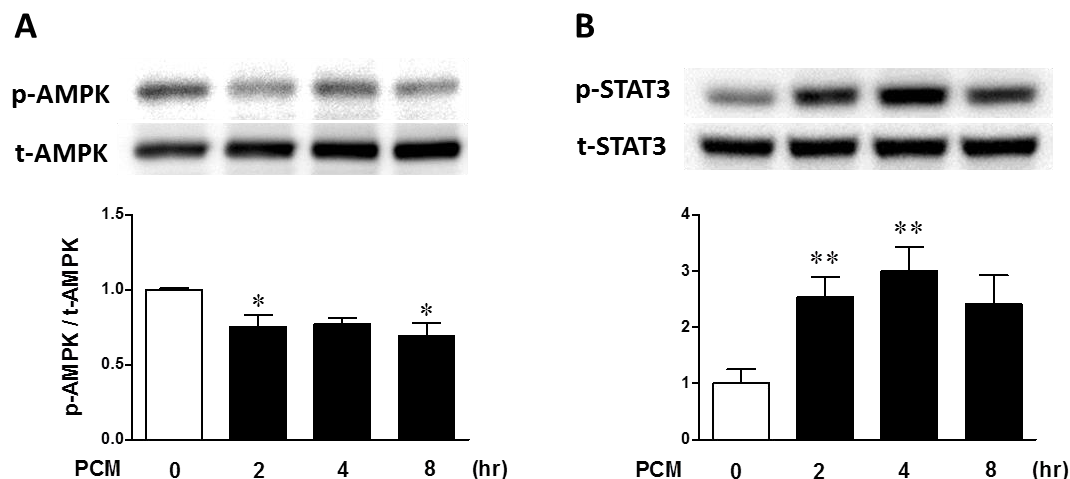


Fig. 4 Effects of PCM on anorexigenic and orexigenic signaling molecules in GT1-7 cells.

GT1-7 cells were treated with PCM for the indicated time periods. In each figure, representative images show Western blots at the top and the bar graphs show quantitative analysis of Western blots at the bottom. Phosphorylation of AMPK α at Thr172 (A) and phosphorylation of STAT3 (B) at Tyr705 in GT1-7 cells. GT1-7 cells were treated with PCM. Band intensities were quantified by scanning densitometry and results were expressed relative to the corresponding control levels (set to 1.0). Expression level of p-AMPK was normalized to total AMPK level. P-STAT3 were normalized to total STAT3. Values are means \pm SEM (n = 3-4). *p < 0.05, **p < 0.01

3-5 GT1-7 細胞における AgRP の mRNA 発現量に与える PCM の影響

GT1-7 細胞にペリサイト培養上清 (PCM) を 2、4、8 時間処理した際の GT1-7 細胞の AgRP の mRNA 発現量の変化を Fig. 5 に示した。AgRP の mRNA 発現量は、PCM 処理時間依存的に減少し、PCM を 8 時間処理において統計学的に有意な減少が認められた (Fig. 5)。

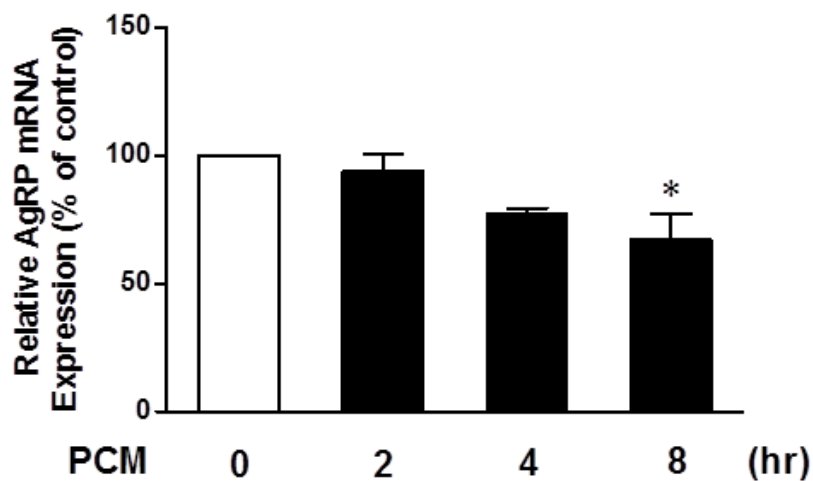


Fig. 5 Effects of PCM on expression of mRNA for AgRP in GT1-7 cells.

GT1-7 cells were treated with PCM for the indicated time periods. Results are expressed as the ratio (fold change) of the mRNA expression level in GT1-7. Values are means \pm SEM (n = 3). *p < 0.05.

4. 考察

本研究では、脳ペリサイト由来の液性因子が不死化視床下部細胞株 GT1-7 細胞におけるインスリンシグナル伝達物質である IR β 、IRS、Akt の発現量を変化させずに、インスリン誘発性の IR β および Akt のリン酸化を促進することを明らかにした。一方で、アストロサイト及び大動脈平滑筋細胞由来の液性因子はインスリン感受性を亢進させなかった。さらに脳ペリサイト由来液性因子は、GT1-7 細胞における AMPK のリン酸化を抑制し、STAT3 のリン酸化を促進させ、AgRP mRNA 発現量を減少させた。これらの結果は、視床下部におけるインスリン感受性および摂食調節に脳ペリサイトが関与することを示唆する。

蛍光免疫組織染色を用いた過去の報告では、ペリサイトマーカーとして NG2 が用いられ、ラット視床下部内側基底部において NG2 陽性細胞が確認されている [20]。しかしながら、NG2 陽性細胞は発達期および成熟期の CNS に見られ、オリゴデンドロサイトやアストロサイトへ分化することも知られている [21]。近年、Winkler らは PRGFR β が CNS に存在する細胞の中で脳ペリサイトのみに発現していることを見出し [22]、*in vivo* においては PDGFR β が NG2 よりもペリサイト特異的なマーカーであると結論している。我々は以前の報告で、海馬の脳微小血管においてペリサイトが基底膜に覆われて存在することを示した [23]。そこで本研究では、PDGFR β および基底膜構成成分であるラミニンの両方のマーカーに陽性反応を示す細胞を観察することでペリサイトの存在を確認した。ペリサイトは視床下部のいくつかの領域で多数観察され (Fig. 1)、NVU 内において脳ペリサイトと視床下部神経細胞が相互作用している可能性が示唆された。

視床下部神経には IR が高度に発現しており [24]、視床下部神経はインスリンに応答してエネルギー恒常性を制御している [25]。インスリンによる IR の刺激は、IR β の自己リン酸化および内在するチロシンキナーゼの活性化を介した IRS チロシン残基のリン酸化を誘導し、さらに下流に位置する phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) および Akt のリン酸化を引き起こす。本研究において、GT1-7 細胞のインスリン誘発性 Akt リン酸化は control 群と比較して PCM 処理群において濃度依存的に増強されることが分かった (Fig. 2B)。次に、この Akt リン酸化の増強がペリサイト由来因子によるものかを確かめるため、アストロサイトおよび RASM の二種の細胞から得られた培養上清を用いた。アストロサイトは神経との相互作用を介してシナプス可塑性を制御しており、RASM は脳ペリサイトと同様に収縮性蛋白である α SMA を発現していることがわかっている。アストロサイトおよび RASM 由来の液性因子は GT1-7 細胞のインスリンシグナル伝達に影響を与えなかったことから (Fig. 2C, 2D)、ペリサイトはインスリンシグナル伝達を増強する特異的な液性因子を産生する可能性が示唆される。我々は、ペリサイトからの自発的な MCP-1、MIP-1 α および IL-6 の放出量が他の BBB 構成細胞と比較して最も多いことをすでに報告しており [26]、これらの因子がこのインスリン感受性亢進に関与することが推察される。運動後の視床下部におけるインスリン感受性亢進には IL-6 が関与することが報告されているが [27]、GT1-7 細胞のインスリン感

受性を増強させるペリサイト由来の液性因子を同定することは今後の研究の課題である。

続いて、インスリン誘発性の GT1-7 細胞内 Akt リン酸化亢進のメカニズム解明のため、IR β および IRS に着目した。IR とチロシンキナーゼは神経細胞膜の脂質ラフトに集中していることが分かっており [28]、SH-SY5Y 神経芽腫細胞の IR 活性の減弱に脂質ラフトの崩壊が関与する可能性が報告されている [29]。PCM を処理した GT1-7 細胞ではインスリン刺激による IR β の 1162/1163 番目のチロシン残基のリン酸化が増強されたが (Fig. 3B)、細胞質および細胞膜の各画分における発現量および局在の変化は認められなかった (Fig. 3A)。また、PCM は脂質ラフトの構成成分である膜内在性タンパク質の flotillin-1 の発現量にも影響しなかった (Fig. 3A)。さらに、ペリサイト由来の液性因子が IR β のチロシンリン酸化によりリクルートされる IRS に影響を与えるか比較検討した。しかしながら、PCM は GT1-7 細胞の IRS1 および IRS2 の発現量に影響を与えなかった (Fig. 3C, 3D)。従って、PCM は IR β のチロシンリン酸化亢進を介してインスリン誘発性 Akt リン酸化を増大させると考えられる。さらに、PCM 中の液性因子同定のため、常態において他の NVU 構成細胞と比較して脳ペリサイトから有意に産生されることが分かっている IL-6 および MIP-1 α による GT1-7 細胞のインスリン感受性亢進作用を検討した。しかしながら、これらの生理活性物質は PCM と同様の作用を示さなかった (data not shown)。肥満のげっ歯類における視床下部神経インスリン抵抗性の成因には IDE および PTP1B の増加が関与することが知られている [30, 31]。従って、PCM がインスリン分解酵素 (IDE) によるインスリンクリアランスもしくは protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) による IR β の脱リン酸化を阻害する可能性も推察される。また、IRS の下流である PI3K および PIP3 に対する PCM の直接的な影響や、視床下部神経細胞におけるインスリン誘発性の IR β リン酸化を亢進する PCM 中の標的分子を解明するためにさらなる研究が必要である。

AMPK はほとんどの真核細胞に発現し、細胞内のエネルギー低下時に活性化して ATP レベルを回復させる。一方で、メトホルミンなどの糖尿病治療薬、運動、レプチンやアディポネクチンなどのホルモン、自律神経によってもその活性が亢進し、末梢組織での糖・脂質代謝を調節することが明らかとなっている。さらに近年の研究により、視床下部の AMPK がインスリン、レプチン、グルコース、グレリンなど多くの摂食調節物質の下流シグナル分子として摂食行動を調節することが報告された。また、レプチンによる摂食抑制効果は JAK-STAT3 経路を介することも知られており、転写因子である STAT3 は摂食抑制神経ペプチド α -MSH の前駆体である POMC の発現に寄与することが分かっている [8]。本研究において、PCM は GT1-7 細胞の AMPK リン酸化の減少および STAT3 リン酸化の増大を引き起こした (Fig. 4A, 4B)。ラットの弓状核において、AMPK 阻害剤の投与により摂食促進神経ペプチドである AgRP の mRNA 発現量は低下することが報告されている [32]。PCM 処理された GT1-7 細胞においても AgRP mRNA 発現の低下が見られ (Fig. 5)、脳ペリサイト由来液性因子は AMPK のリン酸化減弱と AgRP 発現量の低下を惹起することで、摂食抑制に関与している可能性が示唆された。PCM に含まれている摂食調節シグナルを制御する液性因子

を考える上で、PCM のみでは有意な IR β および Akt の活性化が見られなかったことからインスリンが含まれていることは除外できる (Fig.2A)。また、脳ペリサイトからのレプチン産生がほとんど見られないことも分かっている (data not shown)。今後、PCM 中の液性因子を同定するために、PCM の遠心式フィルターユニット等を用いた分子量による分画や、熱処理による標的分子の絞り込みを行った後に、各試料による作用発現を確かめ、さらにその試料中の生理活性物質を質量分析により解析することは今後の課題であると考えます。今後、POMC ニューロンの活動性変化を含む、摂食調節神経ペプチドに与える PCM の影響および PCM 中の標的分子を明らかとしていくことは、脳ペリサイトが視床下部神経細胞と関連して摂食行動を調節する可能性を証明する上で重要である。

以上、脳ペリサイト由来液性因子が視床下部神経細胞のインスリン誘発性の IR β リン酸化および Akt 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において摂食調節を担うシグナル伝達分子のリン酸化に影響すること、および、摂食抑制神経ペプチドの発現を抑制する可能性を示した。これらの結果を鑑みると、脳ペリサイトは視床下部神経細胞の摂食調節シグナルを抑制方向に調節する可能性が考えられ、脳ペリサイトの機能異常時にはⅡ型糖尿病において重要な要因である肥満の悪化に関与することが推察される。以上、本研究結果は脳ペリサイトが視床下部神経細胞におけるインスリン感受性を調節し、かつ摂食調節能を補完する可能性を提示し、未だ不明な点が多い脳ペリサイトー神経細胞間の相互作用を解明する「手掛かり」となるものである。

5. 小括

本章では、脳ペリサイト由来液性因子が視床下部神経細胞のインスリン誘発性の $IR\beta$ のリン酸化およびインスリンシグナル伝達の下流である Akt 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において AMPK のリン酸化抑制および STAT3 のリン酸化亢進を惹起し、また、AgRP の mRNA 発現量を減少させた。従って、視床下部の脳ペリサイトは液性因子を介して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

本論文では脳ペリサイトと NVU 構成細胞の相互作用の解明を目指して、脳血管内皮細胞、ミクログリア、神経細胞に対する脳ペリサイト由来因子の影響を検討した。

第 1 章では、マウス脳毛細血管内皮細胞株 (MBEC4 細胞) の単層培養および MBEC4 細胞 / ラット脳ペリサイト共培養による *in vitro* 血液脳関門モデルを作成し、各培養系における MBEC4 細胞上の接着分子発現や炎症細胞浸潤について比較検討した。脳ペリサイトを共培養した *in vitro* 血液脳関門モデルにおいて、TNF- α によるマクロファージの脳実質側への浸潤は抑制されることを明らかにした。この脳ペリサイトによる炎症細胞の脳浸潤抑制機構は、脳ペリサイト由来 TGF- β が関与すること、脳血管内皮細胞の p38 MAPK および NF- κ B の活性化の抑制によることが示唆された。

第 2 章では、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を TNF- α で刺激し、回収した培養上清中のサイトカインおよびケモカインレベルを比較検討した。脳ペリサイトは、他の NVU 構成細胞と比較して MIP-1 α 、IL-1 α および IL-6 の放出量が顕著に高かった。さらに、脳ペリサイト / マウス脳ミクログリア細胞株 (BV-2) 共培養系におけるミクログリアの活性化の比較検討では、TNF- α 刺激された脳ペリサイト / BV-2 共培養系は BV-2 単独培養系、アストロサイト / BV-2 および脳血管内皮細胞 / BV-2 共培養系と比較して、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。従って、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。

第 3 章では、マウス視床下部神経細胞株 (GT1-7 細胞) を用いて、摂食調節シグナルに着目し、視床下部神経に対する脳ペリサイト培養上清 (PCM) の作用を検討した。PCM は GT1-7 細胞におけるインスリン誘発性の IR β リン酸化を増強させ、その下流である Akt リン酸化を増加させたことから、インスリン感受性を亢進させることが明らかとなった。さらに、PCM は GT1-7 細胞において AMPK のリン酸化抑制および STAT3 のリン酸化亢進を惹起し、また、AgRP の mRNA 発現量を減少させた。本章では、脳ペリサイトが視床下部神経細胞におけるインスリン感受性を調節し、かつ摂食調節能を補完する可能性を提示した。

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。本研究では、脳ペリサイトの液性因子を介した NVU 構成細胞への影響は多岐に亘ること、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を示した。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・強化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。

参考文献

緒言

1. Maki, T., et al., *Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS diseases*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013. 12(3): p. 302-15.
2. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. 57(2): p. 178-201.
3. Bell, R.D., et al., *Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging*. Neuron, 2010. 68(3): p. 409-27.
4. Takata, F., et al., *Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway*. Neurosci Lett, 2009. 449(1): p. 71-5.
5. Dohgu, S., et al., *Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production*. Brain Res, 2005. 1038(2): p. 208-15.
6. Dohgu, S., et al., *Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1*. Microvasc Res, 2011. 81(1): p. 103-7.
7. Takata, F., et al., *Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro*. J Neuroinflammation, 2011. 8: p. 106.

第 1 章

1. Lassmann, H., *Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts*. Brain Pathol, 2005. 15(3): p. 217-22.
2. Lee, B.P. and B.A. Imhof, *Lymphocyte transmigration in the brain: a new way of thinking*. Nat Immunol, 2008. 9(2): p. 117-8.
3. Jin, D., et al., *Adrenomedullin reduces expression of adhesion molecules on lymphatic endothelial cells*. Regul Pept, 2011. 166(1-3): p. 21-7.
4. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. 57(2): p. 178-201.
5. Korn, J., B. Christ, and H. Kurz, *Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells*. J Comp Neurol, 2002. 442(1): p. 78-88.
6. Dohgu, S., et al., *Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production*. Brain Res, 2005. 1038(2): p. 208-15.
7. Takata, F., et al., *Inhibition of transforming growth factor-beta production in brain pericytes*

- contributes to cyclosporin A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. Cell Mol Neurobiol*, 2007. **27**(3): p. 317-28.
8. Nishioku, T., et al., *Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. Cell Mol Neurobiol*, 2009. **29**(3): p. 309-16.
 9. Dong, Y. and E.N. Benveniste, *Immune function of astrocytes. Glia*, 2001. **36**(2): p. 180-90.
 10. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol*, 2007. **28**(3): p. 138-45.
 11. Weiss, J.M., et al., *Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. J Immunol*, 1998. **161**(12): p. 6896-903.
 12. Odinak, M.M., et al., *[Immunogenetic cytokine restriction in multiple sclerosis]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2001. **101**(9): p. 39-44.
 13. Wang, C.C., et al., *Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **288**(2): p. L227-37.
 14. Zhou, Z., M.C. Connell, and D.J. MacEwan, *TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. Cell Signal*, 2007. **19**(6): p. 1238-48.
 15. Tummala, P.E., X.L. Chen, and R.M. Medford, *NF- kappa B independent suppression of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 gene expression by inhibition of flavin binding proteins and superoxide production. J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(8): p. 1499-508.

第 2 章

1. Michalski, D., et al., *Autonomic reactions and peri-interventional alterations in body weight as potential supplementary outcome parameters for thromboembolic stroke in rats. Exp Transl Stroke Med*, 2012. **4**(1): p. 7.
2. Sengillo, J.D., et al., *Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. Brain Pathol*, 2013. **23**(3): p. 303-10.
3. Rosenberg, G.A. and Y. Yang, *Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. Neurosurg Focus*, 2007. **22**(5): p. E4.
4. Zehendner, C.M., et al., *A neurovascular blood-brain barrier in vitro model. Methods Mol Biol*, 2014. **1135**: p. 403-13.
5. Zhu, H.T., et al., *Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in experimental traumatic brain injury. J*

- Neuroinflammation, 2014. 11: p. 59.
6. Balabanov, R., et al., *CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2*. Microvasc Res, 1996. 52(2): p. 127-42.
 7. Kovac, A., M.A. Erickson, and W.A. Banks, *Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide*. J Neuroinflammation, 2011. 8: p. 139.
 8. Takata, F., et al., *Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro*. J Neuroinflammation, 2011. 8: p. 106.
 9. Selvakumar, G.P., et al., *Escin attenuates behavioral impairments, oxidative stress and inflammation in a chronic MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease*. Brain Res, 2014. 1585: p. 23-36.
 10. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. 57(2): p. 178-201.
 11. Glass, C.K., et al., *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration*. Cell, 2010. 140(6): p. 918-34.
 12. Leung, L. and C.M. Cahill, *TNF- α and neuropathic pain--a review*. J Neuroinflammation, 2010. 7: p. 27.
 13. Pieper, C., et al., *Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro*. Brain Res, 2014. 1550: p. 1-8.
 14. Louboutin, J.P., et al., *Role of CCR5 and its ligands in the control of vascular inflammation and leukocyte recruitment required for acute excitotoxic seizure induction and neural damage*. FASEB J, 2011. 25(2): p. 737-53.
 15. Pieper, C., P. Pieloch, and H.J. Galla, *Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier*. Brain Res, 2013. 1524: p. 1-11.
 16. Cardenas, H. and L.M. Bolin, *Compromised reactive microgliosis in MPTP-lesioned IL-6 KO mice*. Brain Res, 2003. 985(1): p. 89-97.
 17. Corbel, M., E. Boichot, and V. Lagente, *Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury*. Braz J Med Biol Res, 2000. 33(7): p. 749-54.
 18. Delaissé, J.M., et al., *Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles*. Clin Chim Acta, 2000. 291(2): p. 223-34.
 19. Logar, D.B., et al., *Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis*. J Bone Miner Metab, 2007. 25(4): p. 219-25.
 20. Muroski, M.E., et al., *Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of*

- chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis*. Curr Pharm Biotechnol, 2008. 9(1): p. 34-46.
21. Carpentier, I., B. Coornaert, and R. Beyaert, *Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2*. Curr Med Chem, 2004. 11(16): p. 2205-12.
 22. Atreya, R., et al., *Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14⁺ macrophages*. Gastroenterology, 2011. 141(6): p. 2026-38.
 23. Ponomarev, E.D., et al., *MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway*. Nat Med, 2011. 17(1): p. 64-70.

第 3 章

1. Baura, G.D., et al., *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain*. J Clin Invest, 1993. 92(4): p. 1824-30.
2. McGowan, M.K., K.M. Andrews, and S.P. Grossman, *Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat*. Physiol Behav, 1992. 51(4): p. 753-66.
3. Baskin, D.G., et al., *Regional concentrations of insulin in the rat brain*. Endocrinology, 1983. 112(3): p. 898-903.
4. Brüning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction*. Science, 2000. 289(5487): p. 2122-5.
5. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. 404(6778): p. 661-71.
6. De Souza, C.T., et al., *Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus*. Endocrinology, 2005. 146(10): p. 4192-9.
7. Posey, K.A., et al., *Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. 296(5): p. E1003-12.
8. Xu, A.W., et al., *Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding*. Endocrinology, 2007. 148(1): p. 72-80.
9. Claret, M., et al., *AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons*. J Clin Invest, 2007. 117(8): p. 2325-36.
10. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease*. Pharmacol Rev, 2005. 57(2): p. 173-85.
11. Maki, T., et al., *Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS*

- diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013. 12(3): p. 302-15.
12. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. *Trends Neurosci*, 2009. 32(8): p. 421-31.
 13. Kim, J.G., et al., *Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding*. *Nat Neurosci*, 2014. 17(7): p. 908-10.
 14. Weiss, N., et al., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1788(4): p. 842-57.
 15. Dohgu, S., et al., *Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production*. *Brain Res*, 2005. 1038(2): p. 208-15.
 16. Dohgu, S., et al., *Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1*. *Microvasc Res*, 2011. 81(1): p. 103-7.
 17. Hori, S., et al., *A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro*. *J Neurochem*, 2004. 89(2): p. 503-13.
 18. Bell, R.D., et al., *Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging*. *Neuron*, 2010. 68(3): p. 409-27.
 19. Engberding, N., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor expression masks the antiinflammatory and glucose uptake capacity of insulin in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(3): p. 408-15.
 20. Norsted, E., B. Gömüç, and B. Meister, *Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus*. *J Chem Neuroanat*, 2008. 36(2): p. 107-21.
 21. Trotter, J., K. Karram, and A. Nishiyama, *NG2 cells: Properties, progeny and origin*. *Brain Res Rev*, 2010. 63(1-2): p. 72-82.
 22. Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic, *Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling*. *Mol Neurodegener*, 2010. 5: p. 32.
 23. Nishioku, T., et al., *Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice*. *Cell Mol Neurobiol*, 2009. 29(3): p. 309-16.
 24. Werther, G.A., et al., *Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry*. *Endocrinology*, 1987. 121(4): p. 1562-70.
 25. Gerozissis, K., *Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies*. *Eur J Pharmacol*, 2008. 585(1): p. 38-49.
 26. Matsumoto, J., et al., *Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique*

- cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. Neurosci Lett*, 2014. 578: p. 133-8.
27. Flores, M.B., et al., *Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. Diabetes*, 2006. 55(9): p. 2554-61.
 28. Wu, C., et al., *Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. J Biol Chem*, 1997. 272(6): p. 3554-9.
 29. Sánchez-Wandelmer, J., et al., *Haloperidol disrupts lipid rafts and impairs insulin signaling in SH-SY5Y cells. Neuroscience*, 2010. 167(1): p. 143-53.
 30. Chiarreotto-Ropelle, E.C., et al., *Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. 305(5): p. E649-59.
 31. Brandimarti, P., et al., *Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. J Endocrinol*, 2013. 219(2): p. 173-82.
 32. Shimizu, H., et al., *Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. Endocrinology*, 2008. 149(9): p. 4544-53.

投稿論文

1. Takahashi H, Takata F, Matsumoto J, Machida T, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y: Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 457(4):532-537.
2. Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M, Futagami K, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y: Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett* 2014, 578:133-138.
3. Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Sumi N, Machida T, Takahashi H, Yamauchi A, Kataoka Y: Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 2012, 524(1):45-48.
4. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa T, Harada E, Miyaji H, Koga M, Nishioku T et al: Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation* 2011, 8:106.
5. Takata F, Dohgu S, Nishioku T, Takahashi H, Harada E, Makino I, Nakashima M, Yamauchi A, Kataoka Y: Adrenomedullin-induced relaxation of rat brain pericytes is related to the reduced phosphorylation of myosin light chain through the cAMP/PKA signaling pathway. *Neurosci Lett* 2009, 449(1):71-75.

謝辞

本研究の機会を与えられ、終始懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 片岡 泰文 教授に心より深甚なる謝意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学生体機能制御学教室 三島 健一 教授に謹んで感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始有益な御助言と御指導、御助力、御校閲を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 道具 伸也 准教授に感謝し、お礼申し上げます。

本研究に対して、多大なる御協力と御助言を賜りました福岡大学薬学疾患管理学教室 首藤 英樹 准教授、山内 淳史 准教授、今給黎 修 准教授、富永 宏治 准教授、古賀 允久 助教、高田 芙友子 助教、渡辺 拓也 助教、松本 純一 助教、町田 崇 助教に謹んで感謝の意を表します。

大学院進学の機会を与えてくださった有限会社オダファーマシー 代表取締役 小田 真稔 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行に多大なるご協力を賜りました一木 奈津子 修士、関 菜摘子 学士、副島 由貴 学士、高木 麻衣 学士、岩尾 卓朗 学士、船越 美帆 学士、吉見 幸那 学士、古瀬 由奈 学士、徳野 潤一郎 学士、吉田 愛 学士に心から感謝いたします。また、本研究にご協力を賜りました福岡大学薬学疾患管理学教室の皆さんをはじめ、これまで私を支えてくれた多くの方々に厚くお礼申し上げます。