

**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—

高橋 弘之

福岡大学・薬学部・薬学疾患管理学教室 814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

**A role of brain pericytes in neurovascular unit**  
- Crosstalk between brain pericytes and neurovascular unit cells via humoral factor -

**Hiroyuki Takahashi**

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,  
Fukuoka, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

**Abstract**

Brain pericytes are located on the brain capillary wall and share a basement membrane with brain endothelial cells. Pericytes communicate with brain endothelial cells through gap and peg-and-socket junctions and/or soluble factors, leading to microvascular integrity and maintenance of the blood-brain barrier (BBB) functions. Recent evidence showed that brain pericyte deficiency induced BBB dysfunction and neurological impairments. This finding suggests a critical role of pericytes in the neurovascular unit. In the present study, we aimed to clarify the interactions between brain pericytes and the cells comprising neurovascular unit through soluble factors. We found that (1) brain pericytes block migration of the inflammatory cells across the BBB by inhibiting inflammatory cytokines-evoked expression of cell adhesion molecules in the brain endothelial cells. (2) brain pericytes act specifically as TNF- $\alpha$ -sensitive cells and as effectors of TNF- $\alpha$  through the release of proinflammatory factors, leading to microglial activation. (3) pericytes, rather than astrocytes, increase insulin sensitivity in hypothalamic neurons by releasing soluble factors. These results suggest that abnormal function of the pericytes under the pathological conditions such as inflammation would induce BBB dysfunction and consequently contribute to progression of the central nervous system diseases.

**Key words:** blood-brain barrier, neurovascular unit, brain pericyte

**【緒言/目的】**

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<sup>[1]</sup>。

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<sup>[2]</sup>。

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、ペリサイト欠損マウスにおいては脳血流量が低下し<sup>[3]</sup>、我々の研究では、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<sup>[4]</sup>。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- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 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<sup>[5,6]</sup>。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<sup>[7]</sup>。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、その病態進展機構の全貌は不明であり、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・認識機構の解明を糸口としてそれに迫る必要がある。

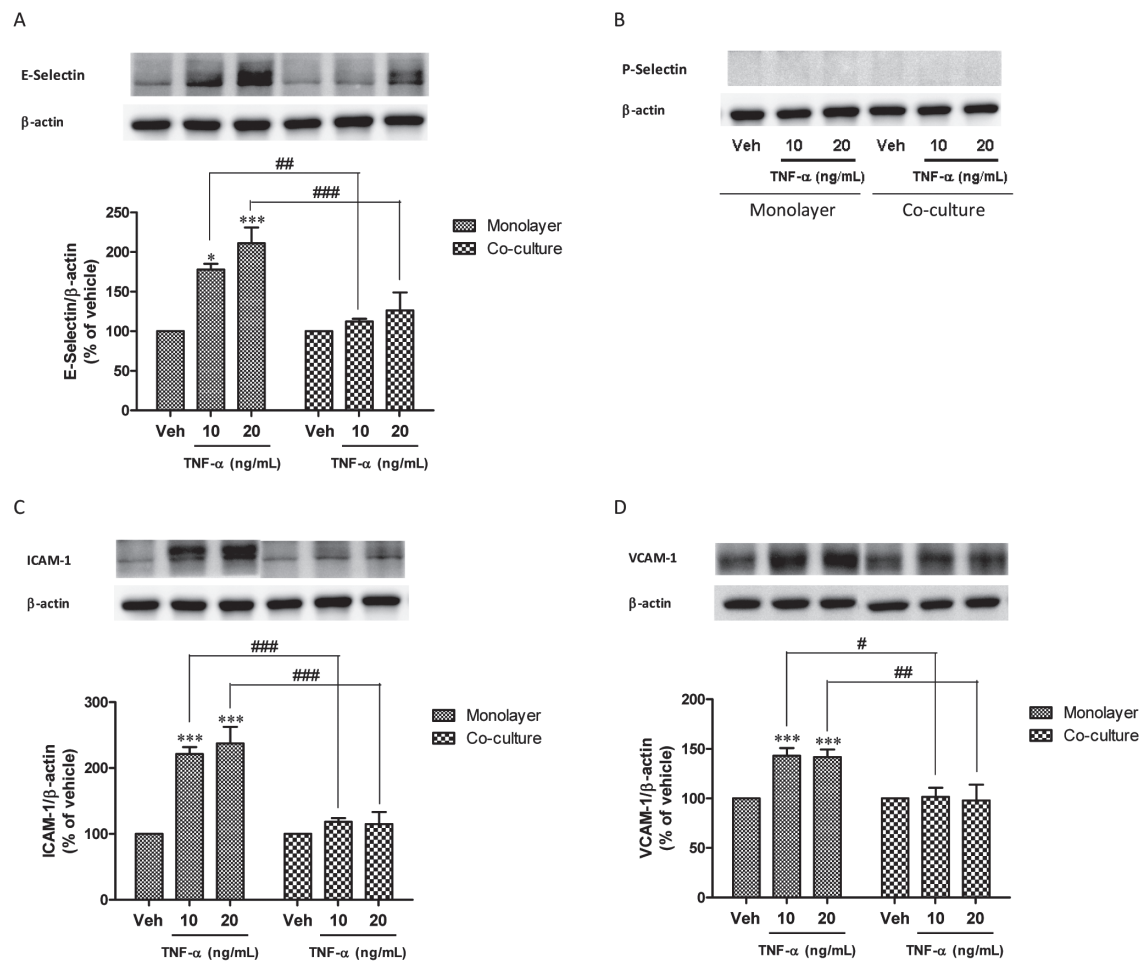
そこで、本研究では、BBB/NVUの基幹細胞として「脳ペリサイト」を捉え、第一章において脳血管内皮細胞上の接着分子や炎症細胞の浸潤に着目し、炎症状態下における脳ペリサイトの関与や役割を明らかにすることを企てた。第二章では脳ペリサイトの脳内炎症への関与を明らかとするため、サイトカイン/ケモカイン産生能およびミクログリア活性化作用を指標とし、炎症状態下における各BBB細胞との比較検討を行った。第三章にて視床下部神経細胞のインスリン応答に着目し、脳ペリサイト由来液性因子の関与について検討した。

## 【結果】

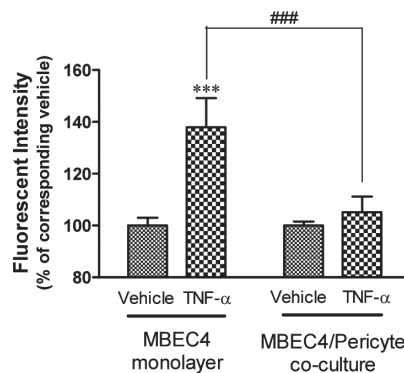
### 1 脳ペリサイトによる免疫担当細胞の脳浸潤抑制機構

#### (1) TNF- $\alpha$ 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層培養系 (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- $\alpha$ 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, P-Selectin, ICAM-1およびVCAM-1) の発現量を比較検討した。TNF- $\alpha$ 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 (J774 A.1) の浸潤が有意に抑制された (Fig. 2)。



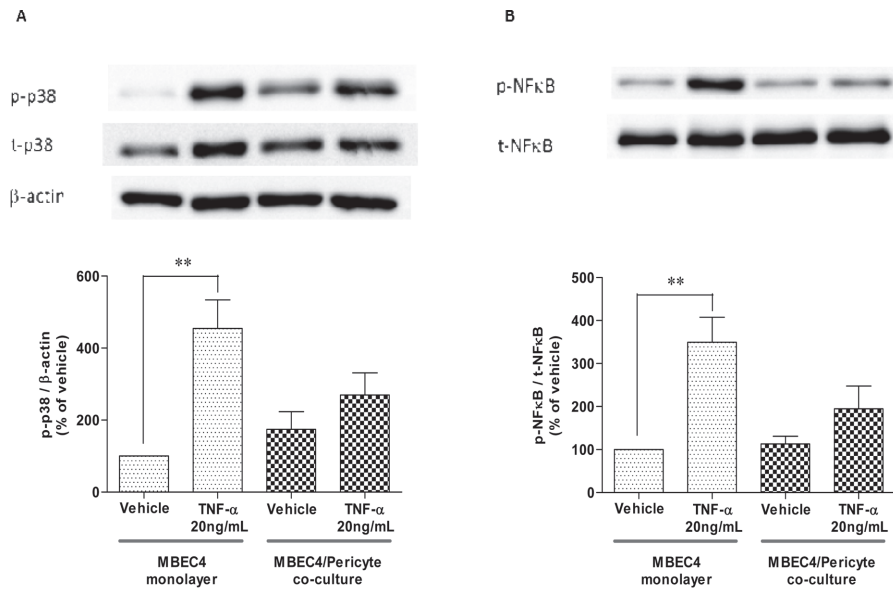
**Fig. 1 Effect of TNF- $\alpha$  on expression of cell adhesion molecules on MBEC4 cells in MBEC4 monolayer and MBEC4/Pericyte co-culture.** MBEC4 cells were exposed to TNF- $\alpha$  for 24 hr. E-selectin(A), P-selectin(B), ICAM-1(C), and VCAM-1(D) were detected by western blot. Relative intensity was calculated as ratio of arbitrary densitometric units of adhesion molecule to that of  $\beta$ -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- $\alpha$ -treated group.



**Fig. 2 Effect of TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  (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- $\alpha$ -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 (SB 203580) およびNFκB 阻害剤 (BAY 11-7821) 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NFκBの活性化亢進が, MBEC4/Pericyte co-cultureにおいて抑制された (Fig. 3)。さらにTGF-β1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。



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

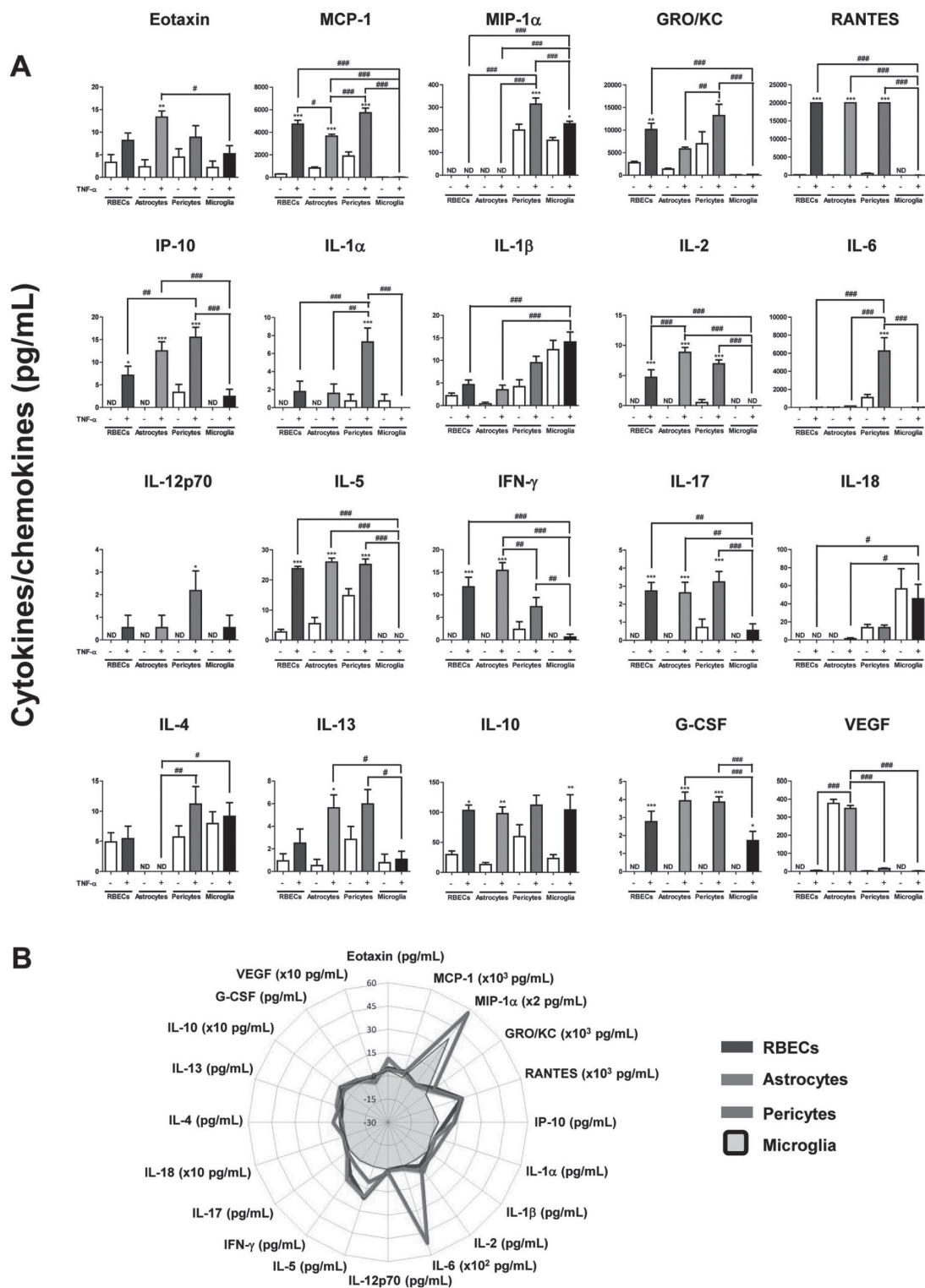
### 【考察】

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NFκBの活性化を抑制し, 炎症過程における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することが示唆された。またこの抑制過程にTGF-β1が関与していることが推測された。

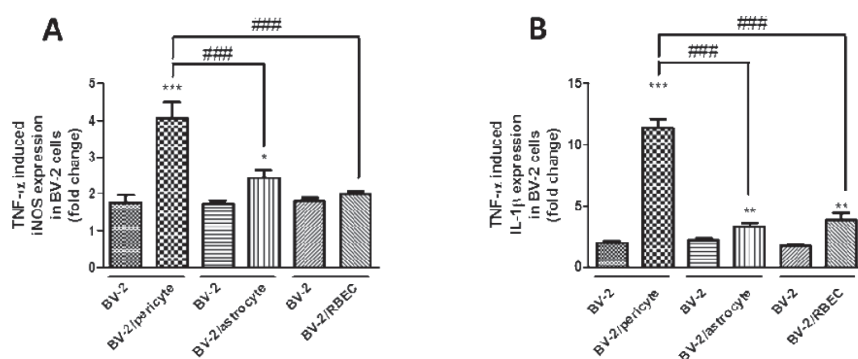
## 2 脳ペリサイトによるTNF-α誘発性のミクログリア活性化亢進

### (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Milliplex™ MAP Cytokine/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-1α, GRO/KC, RANTES, IP-10, IL-1α, 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 (Fig. 4)。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-1αおよびIL-6の放出レベルが最も高かった。



**Fig. 4 (A) Release of cytokines/chemokines from primary cultured NVU cells in the absence (vehicle) and presence of TNF- $\alpha$ .** 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- $\alpha$ -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- $\alpha$ -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.



**Fig. 5** TNF- $\alpha$ -induced expression of mRNAs for iNOS (A) and IL-1 $\beta$  (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- $\alpha$  (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- $\alpha$ -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- $\alpha$ -treated BV-2 monoculture.

## (2) TNF- $\alpha$ 刺激による BV-2 の IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\beta$  mRNA 発現量を有意に増加させた (Fig. 5)。脳ペリサイトによる BV-2 ミクログリアの iNOS および IL-1 $\beta$  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。

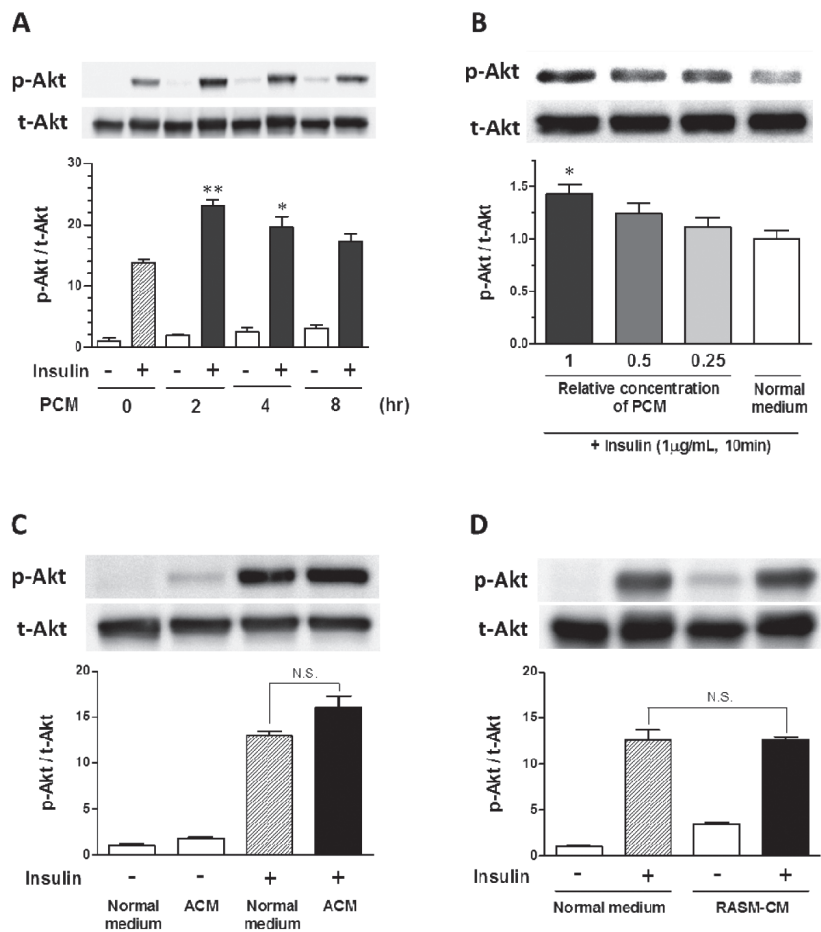
### 【考察】

脳ペリサイトは TNF- $\alpha$  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 TNF- $\alpha$  が起因となる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。

## 3 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

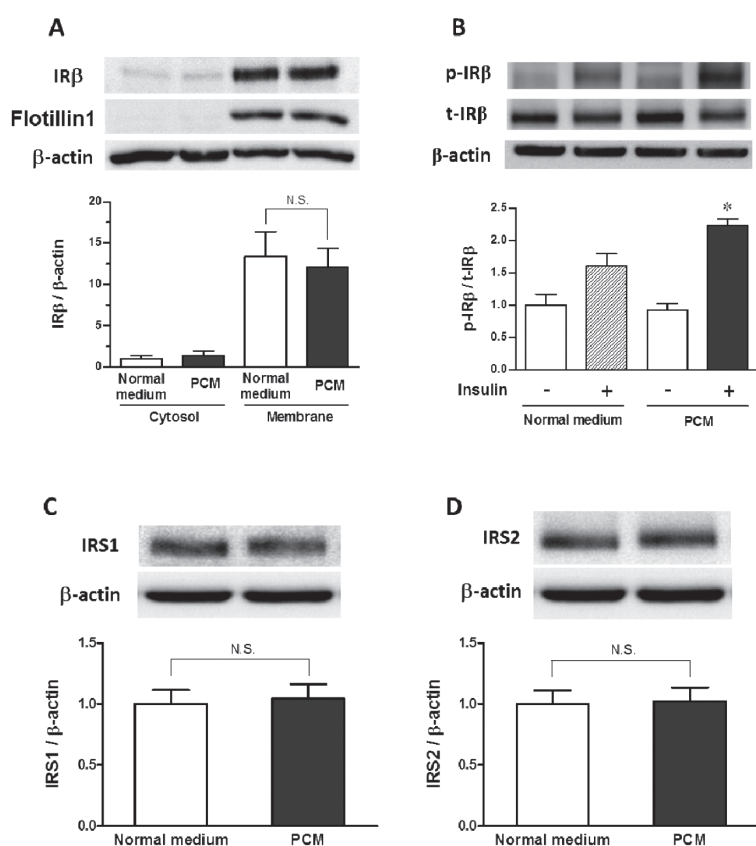
脳ペリサイト培養上清 (pericytes conditioned medium; PCM) を不死化マウス視床下部神経細胞株 GT1-7 に処理した後のインスリン誘発性 Akt リン酸化の変化を比較検討した。インスリン刺激による GT1-7 細胞の Akt リン酸化は, PCM の 2 時間および 4 時間処理により有意に増加した (Fig. 6A)。また, 得られた PCM を原液から 1/2, 1/4 と希釈して処理した際に, インスリン刺激時のリン酸化 Akt は濃度依存的な減少が認められた (Fig. 6B)。これらの作用はアストロサイトおよび大動脈血管平滑筋細胞の培養上清を GT1-7 に処理した際には観察されなかった (Fig. 6C, 6D)。



**Fig. 6** 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 $\mu$ g/mL) for 10 min. (B) GT1-7 cells were treated with insulin (1 $\mu$ g/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 $\mu$ g/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  $\pm$ SEM (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

## (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 $\beta$  (IR $\beta$ ) の発現量及び局在が変化するかをGT1-7細胞の細胞膜画分および細胞質画分を用いて調査した。しかしながら、PCM処理によるGT1-7細胞質と細胞膜のIR $\beta$ 発現量および局在に変化は認められなかった (Fig. 7A)。また、PCMは脂質ラフトのマーカである flotillin-1の細胞膜画分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 $\beta$ リン酸化はPCM処理により有意に増大した (Fig. 7B)。



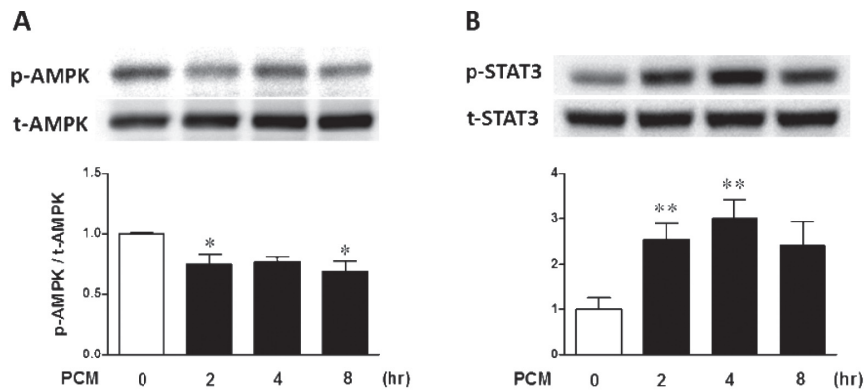
**Fig. 7 Effects of PCM on the insulin signaling molecules in GT1-7 cells.** GT1-7 cells were treated with or without PCM for 2 hr. In each figure, representative omages show Western blots at the top and the bar graphs show quantitative analysis of Western blots at the bottom. (A) Expression and localization of IR $\beta$  in GT1-7 cells. Membrane and cytosolic proteins were extracted as described in the Methods. (B) Insulin-induced phosphorylation of IR $\beta$  at Tyr1162/1163 in GT1-7 cells. GT1-7 cells were treated with insulin (1 $\mu$ g/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-IR $\beta$  was normalized to total IR $\beta$  level. IR $\beta$ , IRS-1 and IRS-2 were normalized to  $\beta$ -actin. Values are means  $\pm$ SEM (n = 3-4). \*p < 0.05.

### (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

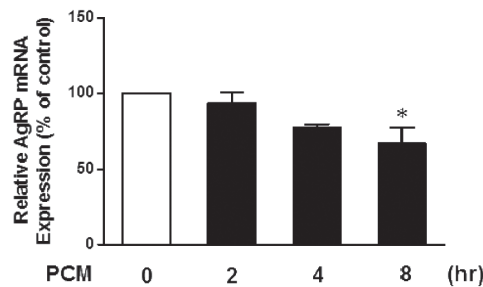
脳ペリサイト培養上清 (PCM) を GT1-7 細胞に処理した際の摂食調節シグナル伝達物質のリン酸化の変化を比較検討した。AMPK のリン酸化は、PCM を 2 時間および 8 時間処理した際において有意に抑制された (Fig. 8A)。また、STAT3 のリン酸化は、PCM を 4 時間および 8 時間処理した際に有意に増加し、4 時間で最大となった (Fig. 8B)。

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 (Fig. 9)。





**Fig. 8 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 $\alpha$  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



**Fig. 9 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.

### 【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 $\beta$ のリン酸化およびAktのリン酸化を増強することによりインスリン感受性を亢進させることを明らかとした。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

本研究では、脳ペリサイトが各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参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、未だにその基礎となるNVU病態機構の解明には至っていない。本研究では、脳ペリサイトがその放出因子を介してNVU構成細胞を制御し、NVUにおける基幹細胞として機能している可能性が示唆された。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、ペリサイト機能制御を介する中枢神経系疾患治療の新たな戦略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】

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- $\alpha$ , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 106.