

## 高血糖病態下における脳ペリサイトの中枢調節機構

糖尿病性中枢機能障害チーム（課題番号：127008）

研究期間：平成 24 年 7 月 26 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者：片岡泰文 研究員：首藤英樹

### 【研究成果】

#### 〈背景および目的〉

2型糖尿病は、膵β細胞からのインスリン分泌量低下やインスリン抵抗性に基づく作用低下による血糖値上昇を成因とする疾患である。肥満症では脂肪組織の肥大による血中TNF-αなどの産生増加に伴う末梢インスリン抵抗性の形成を経て2型糖尿病を発症する。慢性的な高血糖症状の問題点は、網膜症、腎障害、末梢神経障害への進展であり、近年、認知機能低下や痴呆症状の発症との関連性も明らかになりつつある。2型糖尿病形成および進展における中枢機能異常の関与を示唆する以下の知見がある。

- (1) 2型糖尿病動物では高インスリン血症が認められるが、脳内にインスリンを投与すると高血糖が改善された(Nature, 1979; 282:503)。骨格筋・肝臓とは異なり、脳のグルコースの取り込みはインスリン非依存的であるため、脳は2型糖尿病における標的臓器とはみなされていなかった。しかし、脳が末梢からのインスリンを受容し肝臓でのグルコース産生を抑制することが明らかにされた。この知見は、インスリンの脳移行低下を包含した「中枢性インスリン感受機構障害」が2型糖尿病形成に関与することを示す。
- (2) 薬物療法により血糖が管理されている2型糖尿病患者においても認知機能障害が認められる(Ann Neurol, 2008; 64:698)。この成績は糖尿病による認知機能障害の発症抑制に関して、末梢のインスリン分泌不良やインスリン抵抗性の改善による血糖管理だけでは不十分であることを示す。

このように、2型糖尿病では中枢での血糖調節機能障害および認知機能障害を呈しており、この改善が新たな治療標的となりうる。

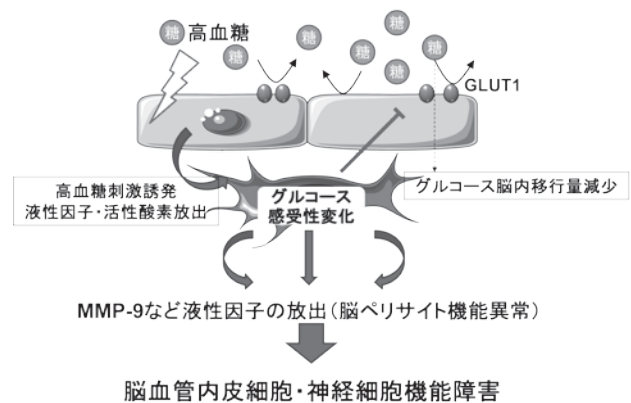


図. 脳血管内皮-ペリサイト間の高血糖病態感知機構

それでは、2型糖尿病における中枢機能障害はどのように惹起されるのか？初期過程での持続的な高血糖状態は恒常性維持機能を凌駕したエネルギー摂取の結果である。そこで、我々は糖尿病における血糖調節機構を含む中枢機能障害は高血糖に端を発すると考え、その病態感受性機構として脳血管内皮細胞-脳ペリサイトに着目した。脳血管内皮細胞と脳ペリサイトおよびアストロサイトは、循環血液と脳実質を隔てる血液脳関門(BBB)を構成し、さらに脳神経細胞を含めた高次ネットワーク機能からなる「脳神経血管機構(neurovascular unit)」を構成する。この機能障害は種々の疾患に関与する(Neuron, 2008; 57: 178)。本研究では、脳ペリサイトが高血糖状態を感知し、サイトカインやケモカインなどの液性因子放出を介して脳神経細胞機能を障害し、糖尿病進展へと導く可能性を追求する。

本研究では「脳ペリサイトは、高血糖状態を感知し、それに応答してBBB機能障害・神経細胞機能障害を誘発することにより糖尿病進展を担う疾患感受性細胞である」との仮説を提起する(上図)。これを検証するために以下の点を明らかにする。

- (1) 高血糖病態下における血液脳関門機能障害
- (2) 脳内グルコース濃度変化に应答した脳ペリサイト由来液性因子の発現量変化
- (3) 高血糖病態下における脳ペリサイト由来液性因子による視床下部摂食神経機能の制御

## 〈方法〉

### (1) 肥満高血糖モデル動物の作製

ICR雄性マウスに高脂肪食を与え、肥満高血糖モデルを作製した。8週間、高脂肪食を摂取させると、体重、空腹時血糖および糖負荷後の血中濃度曲線下面積の著しい増加が認められた。

### (2) グルコース脳移行性の測定

上記で作製した動物に<sup>3</sup>Hで標識したグルコースを投与し、脳移行性を測定した。脳移行性は脳中濃度-血清中濃度比を算出し、評価した。

### (3) グルコーストランスポーター GLUT1 mRNA発現量の測定

上記で作製した動物の脳から全RNAを採取し、real-time RT-PCR法でGLUT1 mRNA発現量を測定した。

### (4) 脳ペリサイトのMMP-9産生

ラット大脳皮質から単離・培養した脳ペリサイトにTNF- $\alpha$  (20 ng/mL)およびグルコースを添加し、24時間後の培養上清中のMMP-9量をwestern blot法で測定した。また、細胞を可溶化した後、試料中の全RNAおよびタンパク質を抽出し、それぞれPCR法およびwestern blot法により測定した。P-gp阻害剤はTNF- $\alpha$ と同時に処理した。

### (5) 視床下部神経のインスリン感受性の評価

マウス視床下部神経細胞株GT1-7に脳ペリサイト培養液を処理した後、インスリン(1 $\mu$ g/mL)を添加して10 min後に細胞を可溶化し、タンパク質を抽出した。インスリン感受性の指標として、リン酸化Akt発現量の変動をwestern blot法で測定した。

## 〈結果および考察〉

### (1) 糖尿病病態下における血液脳関門機能変化とグルコース脳内取り込み量の変化

High fat dietを負荷した2型糖尿病マウスにおい

て、正常マウスと比較してグルコースのBBB透過量が減少することが明らかになった。グルコーストランスポーター GLUT1の発現量に変化は認められなかった。一方、sodium fluoresceinの透過性が正常マウスと比較して亢進したことから、血液脳関門のバリア機能が障害されていることが明らかになった。

### (2) TNF- $\alpha$ 刺激による細胞外基質分解酵素MMP-9放出に対するP-gp(P-glycoprotein)の関与

Western blot法を用いて脳血管内皮細胞および脳ペリサイトのP-gp発現を調べた。脳血管内皮細胞と比較して発現量は低いものの、脳ペリサイトにもP-gpが発現していることが明らかになった。また、脳ペリサイトのTNF- $\alpha$  誘発性MMP-9放出は、P-gp阻害剤であるcyclosporin A, tacrolimus併用によって濃度依存的に減少した。またカルシニューリン阻害作用を有さないP-gp阻害剤であるverapamilおよびPSC833の併用でも同様の結果が得られた。従って、これらの結果は、カルシニューリン阻害作用に依存しないことが判った。また、脳ペリサイトからのMMP-9放出機構においてP-gpが促進的に働いていることが示唆された。

### (3) 脳ペリサイトMMP-9産生に対する高血糖の影響

TNF- $\alpha$  による脳ペリサイトからのMMP-9産生は、high glucose負荷により増加した。血液脳関門構成細胞の中で、脳ペリサイトのみが高血糖感受性のMMP-9産生機構を有する可能性が示唆された。

### (4) 視床下部神経のインスリン感受性に対する脳ペリサイト由来液性因子の影響

インスリン感受性は、視床下部神経細胞にインスリンを負荷し、細胞内情報伝達物質Aktの活性化を指標に評価した。脳ペリサイト培養上清をGT1-7細胞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、脳ペリサイト培養上清の2時間および4時間処理により有意に増加した。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細胞に処理した際には観察されなかった。さらに、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、脳ペリサイト培養上清により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検討した。しかし、脳ペリサイト培養上清処理による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。また、脳ペリサイト培養上清は脂質ラフトのマーカーである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 $\beta$ リン酸化は脳ペ

リサイト培養上清処理により有意に増大した。従って、このインスリン感受性の亢進はインスリン受容体発現量の増加とは異なる経路を介して起こると考えられる。

(5) 脳ペリサイト由来液性因子による視床下部神経の摂食および血糖調節シグナルの活性化

脳ペリサイトによる視床下部神経制御のさらなる解明に焦点を当て、脳ペリサイト由来液性因子について、摂食および血糖調節に関わる視床下部神経への作用を調べた。脳ペリサイトの摂食調節分子レプチンおよび血糖調節分子インスリンの発現量をPCR法およびELISA法で測定したところ、これらは殆ど発現しないことが判った。しかし、脳ペリサイト培養上清中で不死化マウス視床下部神経細胞株GT1-7を培養すると、GT1-7細胞のAMPKリン酸化が減少し、STAT3のリン酸化が亢進していた。また、GT1-7細胞のAktのリン酸化が亢進した。これらの結果は、それぞれレプチンおよびインスリンを視床下部神経細胞に直接負荷した場合の結果と一致する。従って、脳ペリサイトがレプチン様およびインスリン様物質を産生・分泌し、視床下部神経機能を調節する可能性が推測される。

以上、本実験成績は、脳ペリサイト由来液性因子を介した血液脳関門・視床下部神経機能の制御機構が存在することを示唆する。高血糖状態では、脳ペリサイトが産生するMMP-9によってこれらの制御機構が異常化し、血液脳関門機能障害および視床下部インスリン抵抗性や摂食調節異常が惹き起こされ、その結果、肥満など2型糖尿病の基礎疾患の形成・進展が誘導・加速化される可能性が考えられる。

〈謝辞〉

本研究の一部は福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。(課題番号:127008)

〈研究業績〉

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):532-7.
2. Yasutaka Y, Watanabe T, Nakashima A, Matsumoto J, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces beta-amyloid accumulation primarily by lowering cellular prion protein levels in a brain endothelial cell line. *FEBS Lett*. 2015;589(2):263-8.

3. Koga M, Kanaoka Y, Ohkido Y, Kubo N, Ohishi K, Sugiyama K, Yamauchi A, Kataoka Y. Varenicline aggravates plaque formation through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in ApoE KO mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455(3-4):194-7.
4. Tóth AE, Tóth A, Walter FR, Kiss L, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás LG, Heimesaat MM, Dohgu S, Kataoka Y, Rákhely G, Deli MA.  
Compounds blocking methylglyoxal-induced protein modification and brain endothelial injury. *Arch Med Res*. 2014;45(8):753-64.
5. Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud PO, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA.  
Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e100152.
6. Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M, Futagami K, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y.  
Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett*. 2014;578:133-8.
7. Koga M, Yamauchi A, Kanaoka Y, Jige R, Tsukamoto A, Teshima N, Nishioku T, Kataoka Y.  
BMP4 is increased in the aortas of diabetic ApoE knockout mice and enhances uptake of oxidized low density lipoprotein into peritoneal macrophages. *J Inflamm (Lond)*. 2013;10(1):32.
8. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Machida T, Kaneshima S, Matsuo M, Sakaguchi S, Takeshige Y, Yamauchi A, Kataoka Y.  
Metformin induces up-regulation of blood-brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular

endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2013;433 (4):586-90.

9. Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y.  
Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4.  
Biol Pharm Bull. 2013;36(3):492-5.
10. Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Matsumoto J, Machida T, Fujishita K, Shibata K, Shinozaki Y, Sato K, Kataoka Y, Koizumi S.  
In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from neonatal and adult rats retain age-related barrier properties.  
PLoS One. 2013 8(1):e55166.
11. 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):45-8.
12. Nishioku T, Dohgu S, Koga M, Machida T, Watanabe T, Miura T, Tsumagari K, Terasawa M, Yamauchi A, Kataoka Y. Cyclophilin A secreted from fibroblast-like synoviocytes is involved in the induction of CD147 expression in macrophages of mice with collagen-induced arthritis.  
J Inflamm (Lond). 2012 20;9(1):44.
13. Watanabe T, Yasutaka Y, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y.  
Atorvastatin stimulates neuroblastoma cells to induce neurite outgrowth by increasing cellular prion protein expression.  
Neurosci Lett. 2012 531 (2):114-9.