

慢性閉塞性肺疾患における中枢性合併症と 薬剤有害反応との相互悪化機序

(課題番号：187205)

研究期間：平成30年7月1日～平成31年3月31日

研究代表者：松本純一

【背景】

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) は、進行性の気流制限を主徴とする肺疾患である。COPD の慢性期では、炎症症状が肺から全身に広がり、末梢臓器に留まらず、情動障害や認知機能障害など中枢性症状を併発する。また、多くの COPD 患者は、中枢性有害作用を誘発する医薬品を服用している。特に、長時間作用性抗コリン吸入薬は COPD 治療の第一選択薬として長期間にわたり使用されるが、中枢へ移行すると薬剤性認知機能障害を惹き起こす可能性がある。しかし、COPD 病態下の抗コリン薬による中枢症状への影響は明らかではない。そこで、本申請者は抗コリン薬による COPD 併発中枢症状の悪化作用を解明するため、エラスターゼ誘発 COPD モデル動物を作製しこれまでに、COPD モデル動物が血液脳関門 (BBB) 障害を発現し、抗コリン薬の中枢移行性が増大することを突き止めた。これらの結果は、COPD 病態下における BBB 機能低下とそれに伴う薬物の中枢移行量増大が予期せぬ薬剤性脳機能障害を誘発する起因となりうることを示唆した。しかし、COPD 病態下において、BBB 機能障害を「引き金」として脳高次機能障害が発現するメカニズムは不明である。

脳は、BBB により末梢循環より隔離されており、末梢の免疫機構とは異なる免疫機構を有する器官である。BBB は、末梢循環と脳実質の間に位置する多細胞構造体であり、脳内外への分子、イオン、細胞の輸送を調節している。この BBB の構造的実体は、zonula occludens-1 (ZO-1)、occludin、claudin-5 の密着結合 (tight junction: TJ) 関連タンパク質を介して密接に結合した脳微小血管内皮細胞 (BMEC) である。隣接する BMEC 間の TJ は、細胞間隙経路を透過する水溶性低分子やイオンの拡散を制限し、さらには、末梢循環から脳への神経

毒性物質や免疫細胞の侵入を防いでいる。従って、BBB のバリア機能は、脳内免疫機構の形成に寄与し、炎症病態の伝播において末梢組織と脳の免疫学的連関を結ぶ重要な役割を担っている。

急性期タンパク質の1つである serum amyloid A (SAA) は、急性炎症時に循環血中に急増する。Jang, W.Y.らは、肝臓特異的 SAA 過剰発現マウスがうつ病様行動および神経炎症を呈することを報告した。さらに最近、ヒトを対象とした臨床研究において、SAA が BBB 障害を有する被験者において増加することが示された。これらの報告は、SAA が末梢組織から脳への炎症シグナルを伝播する分子となりうることや、さらには SAA が BBB 破綻を契機とした脳機能低下をもたらす可能性を示唆する。COPD 患者においても、COPD 急性増悪期の血清中 SAA 濃度の上昇が報告され、急性増悪期の発現頻度は中枢性合併症の悪化と相関する。しかし、SAA が脳保護機構である BBB に対してどのような作用を有するかは未だに明らかではない。さらに、多くの SAA は、循環血中では HDL と結合し、SAA と HDL の相互作用は、互いの生物学的活動に影響する。HDL は、SAA による内皮細胞の炎症性サイトカインの誘導を抑制する。一方で、HDL の apoA1 が SAA に置換すると、HDL によるコレステロール排出能は低下する。従って、SAA と HDL の相互作用は、SAA および HDL の生理作用の重要な調節メカニズムである。

本研究では、SAA がラット脳内皮細胞 (RBEC) を用いて作製した in vitro BBB モデル (RBEC 単層モデル) のバリア機能に対して直接的な影響をもたらすかを検討した。さらに、HDL の非存在下または存在下において、RBEC のバリア機能に対する SAA の作用について同様の実験を行い比較検討した。

【方法】

1. ラット脳内皮細胞の初代培養

ラット脳血管内皮細胞 (RBEC) の初代培養は、3 週齢の Wistar ラット (Kyudo Co., Ltd、佐賀) より単離、培養した。

2. In vitro BBB モデルを用いた脳内皮細胞のバリア機能の評価

In vitro BBB モデル (RBEC 単層モデル) を構築するために、RBEC (15×10^4 cells/cm²) をフィブロネクチンおよびコラーゲン IV でコーティングした Transwell™ インサート内側に播種した (直径 6.5 mm、孔径 0.4 μ m、Corning, NY)。RBEC 単層モデルがコンフルエントに達するまで、細胞を 500 nM hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO) を添加した RBEC 培地で培養した。RBEC 単層モデルの Transwell インサートの luminal 側および abluminal 側を 0.1、1、および 5 μ g/mL の Apo-SAA (N 末端メチオニンおよび 71 番目のヒスチジンのアスパラギンの置換を除く、ヒト Apo-SAA 1 α に対応するコンセンサス SAA 分子) で、24 時間処理した。HDL (Alfa, Ward Hill, MA, USA) を処理する場合は、Apo-SAA と混合し、室温で 30 分間インキュベートした後、RBEC 単層モデルに HDL と Apo-SAA の混合物を 24 時間処理した。

RBEC 単層モデルのバリア機能を確認するために、実験前および薬物処理後の各時間における経内皮電気抵抗 (TEER、 $\Omega \times \text{cm}^2$) を epithelial-volt-ohm meter および Endohm-6 chamber (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) を用いて測定した。また、RBEC 単層モデルの脳内皮細胞に対する sodium fluorescein (Na-F) 透過係数は、以下の手順で算出した。Na-F 透過性実験を開始するために、処理液を含む培地を除去し、Na-F 100 μ g/mL を含む physiological buffer (NaCl 141 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2.8 mM, MgSO₄ 1 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, d-グルコース 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4) を Transwell インサートの luminal チャンバー (100 μ L) に負荷した。サンプル (400 μ L) は、15、30、45、60 分で abluminal チャンバーから回収し、すぐに等量の physiological buffer を abluminal チャンバーに加えた。Na-F の濃度は、蛍光マルチウェルプレートリーダー (励起波長 485 nm、発光波長 530 nm, CytoFlour Series 4000; Perseptive Biosystem, Framingham, MA, USA) を用いて測定して、透過係数算出した。

3. ウェスタンブロット法

ZO-1、occludin、および claudin-5 のタンパク質発現量は、ウェスタンブロット法を用いて定量した。薬物処理 24 時間後に、1 % ホスファターゼ阻害剤カクテル 2

(Sigma, St. Louis, MO, USA)、1 % ホスファターゼ阻害剤カクテル 3 (Sigma) および 1 % プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を含む溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % グリセロール、1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.5 % デオキシコール酸ナトリウム、2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 20 mM リン酸ナトリウム 10 水和物および 50 mg/mL フッ化フェニルメチルスルホニル) を RBECs に加えて、細胞を溶解した。細胞溶解物中の総タンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量した。各サンプルから等量のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、分離したタンパク質バンドを PVDF 膜 (Wako) に転写した。その後、転写したメンブレンを Blocking One (Nacalai Tesque) でブロックした後、ZO-1 (1 : 1000、カタログ番号 61-7300; Thermo Scientific)、occludin (1 : 500 カタログ番号 33-1500; Thermo Scientific)、claudin-5 (1 : 1000、カタログ番号 35-2500; Thermo Scientific) および β -actin (1 : 10000、カタログ番号 A1978, Sigma) に対する一次抗体を使用して免疫プロットを行った。HRP 結合 2 次抗体を処理した後、免疫反応性バンドを Immnostar LD (Wako) で視覚化し、FluorChem SP イメージングシステムを用いてデジタルシグナルをキャプチャーした。その後、画像分析ソフトウェアである Image J (NIH) を使用して定量化した。

4. 統計解析

結果は平均値 \pm SEM として示した。2 群間および多群間の統計学的有意差の比較については、それぞれ、student's t 検定および一元配置分散分析 (ANOVA) 後の Tukey-Kramer 検定 (Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA)) に従った。P 値が 0.05 未満の場合、有意な差とした。

【結果】

1. RBEC 単層モデルにおける BBB 透過性に対する Apo-SAA の影響

最初に、BBB バリア機能に対する Apo-SAA の直接的な影響を検討するために、RBEC 単層モデルを hydrocortisone を含む無血清培地中で Apo-SAA (0.1、1、5 μ g/mL) に曝露した。Apo-SAA は、時間と濃度に依存して RBEC の TEER を減少させた (時間 F (2, 186) = 80.76, $p < 0.0001$; 濃度 : F (3, 186) = 80.76, $p < 0.0001$; 相互作用 F (6, 186) = 20.59, $p < 0.0001$) (Figure 1 A)。24 時間の Apo-SAA 処理後、Apo-SAA (1 および 5 μ g/mL) はそれぞれ TEER を 26.3 % および 44.4 % 減少させた (Figure 1 B)。さらに BBB 細胞間

Figure 1

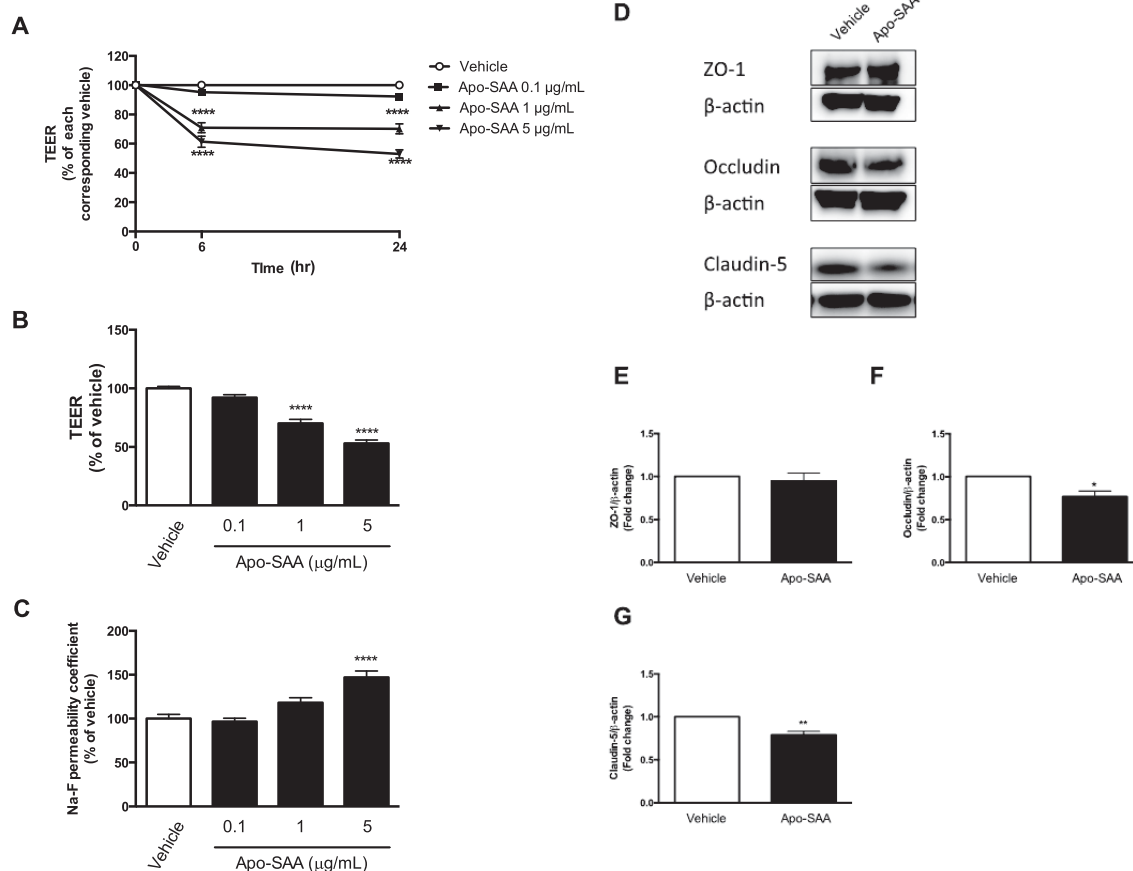


Figure 1. Apo-SAA impaired brain endothelial barrier via decreased levels of occludin and claudin-5 in RBECs.

(A) Time-course of the changes in TEER of RBECs after addition of Apo-SAA during a 24 hour period. Apo-SAA (0.1, 1 5 µg/mL) was added to both the luminal and abluminal chamber of RBEC monolayers, and then TEER of RBECs were measured just before (0), 6 and 24 hours after addition of Apo-SAA. Results were expressed as a % of the values in corresponding vehicle-treated RBEC monolayers at indicated time point (0 h: $48.0 \pm 8.4 \Omega \times \text{cm}^2$, 6 h: $50.3 \pm 8.1 \Omega \times \text{cm}^2$, 24 h: $81.2 \pm 14.1 \Omega \times \text{cm}^2$). Values are the means \pm SEM (n=16-17). ****p<0.0001 vs each corresponding vehicle.

(B), (C) Effect of Apo-SAA on TEER (B) and Na-F permeability (C) in RBEC monolayers. RBEC monolayers were treated with Apo-SAA (0.1, 1 5 µg/mL) added to both the luminal and abluminal chamber of RBEC monolayers for 24 hours. Results were expressed as a % of vehicle (vehicle: $0.086 \pm 0.012 \times 10^{-3} \text{cm/min}$). Values are the means \pm SEM (n=16-17). ****p<0.0001 vs vehicle.

(D) Representative images of Western blots showing ZO-1, occludin and claudin-5 in RBECs treated with 5 µg/mL of Apo-SAA for 24 hours. β-actin was used as a loading control.

(E)-(G) Quantitative analysis of the protein expression levels of ZO-1 (E), occludin (F) and claudin-5 (G) in the RBECs. Values are mean \pm SEM (n=4). *p<0.05, **p<0.01 vs vehicle

隙経路の指標であるNa-Fの透過係数を算出した。Apo-SAAは、RBEC単層モデルにおいて濃度依存的にRBECのNa-F透過性を増加させた(Figure 1 C)。この増加は、5 µg/mLのApo-SAAで有意な差が認められた。次に、RBECでのタイトジャンクション関連タンパク質(ZO-1、occludin、claudin-5)のタンパク質発現量に対するApo-SAAの作用を検討した。5 µg/mLのApo-SAAは、RBECのoccludinおよびclaudin-5のタンパク質発現量を有意に減少させた(Figure 1 F and 1 G)が、ZO-1のタンパク質発現量は変化が認められなかった(Figure 1 E)。

2. Apo-SAA誘発BBB障害に対するHigh-density lipoprotein (HDL)の抑制作用

RBEC単層モデルにおけるApo-SAA誘発のNa-F透過性亢進はApo-SAAを熱変性させることで抑制された(Figure 2 A)。Apo-SAAは、血液に多く存在するHDLのアポリポタンパク質であることが報告されており、HDLに結合したSAAは、解離型とは異なる生理学的特性を示す。そこで、Apo-SAAが無血清状態と同様に血清存在下でBBBのバリア機能障害作用を有するかを検討した。10%血清を含むRBEC培地中においてApo-SAAは、RBEC単層モデルのNa-F透過性に影響を与えなかった(Figure 2 B)。同様に、HDL (50µg/mL)の添加は、無血清培地中におけるApo-SAA誘導のNa-F透過性亢進作用を抑制した(Figure 2 C)。また、HDL

Figure 2

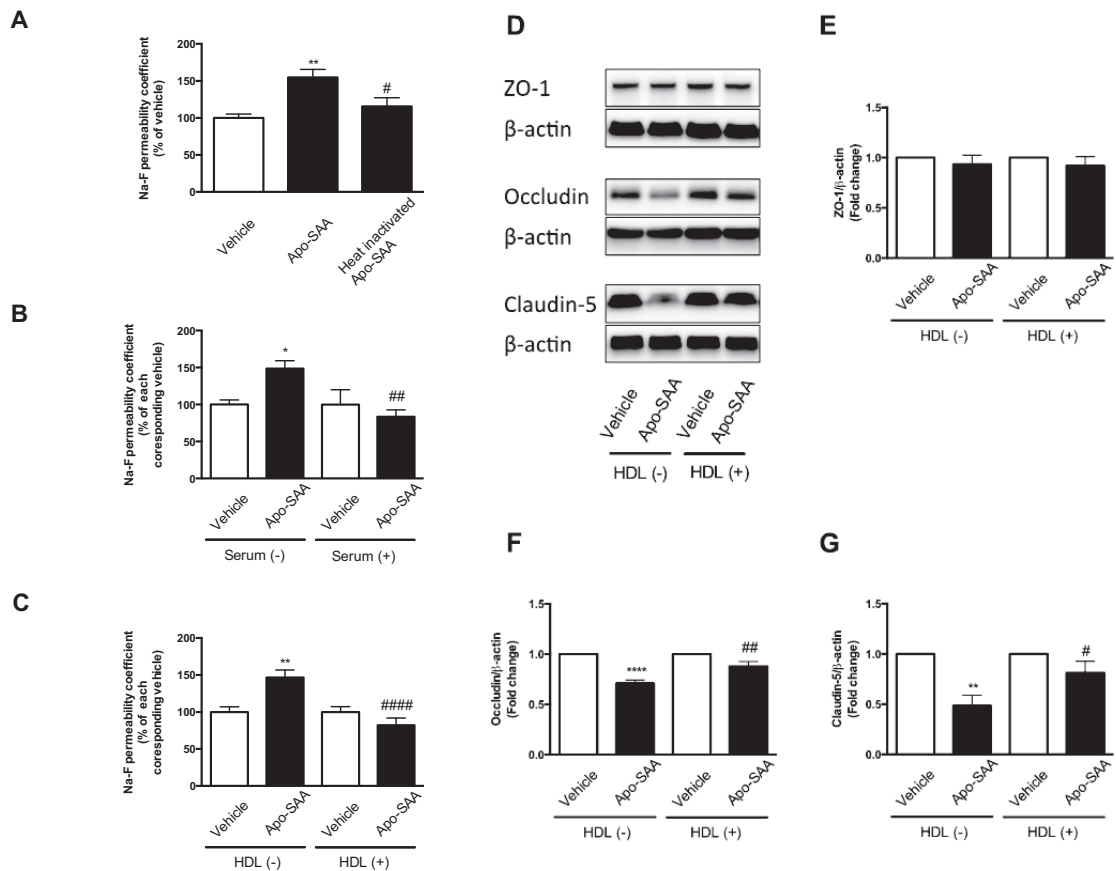


Figure 2. HDL abrogated Apo-SAA impaired brain endothelial barrier in RBECs.

(A) Na-F permeability in RBEC monolayers. RBEC monolayers were exposed to Apo-SAA (5 μ g/mL) or heat-inactivated apo-SAA in both the luminal and abluminal chamber of RBEC monolayers for 24 hours. Results were expressed as a % of vehicle. Values are the means \pm SEM (n=10-12). **p<0.01 vs vehicle, #p<0.05 vs SAA treated group

(B), (C) Non-effect of apo-SAA on the permeability of RBECs to Na-F in presence of serum or HDL. RBEC monolayers were incubated with Apo-SAA (5 μ g/mL) added to the luminal and abluminal chamber of RBEC monolayer in absent or present of serum (B) or (C) for 24 hours. Results were expressed as a % of vehicle. Values are the means \pm SEM (n=11-15).

(D) Representative images of Western blots showing ZO-1, occludin and claudin-5 in RBECs co-stimulated with Apo-SAA and HDL. RBECs were treated with 5 μ g/mL of Apo-SAA with or without 50 μ g/mL of HDL for 24 hours. β -actin was used as a loading control.

(E)-(G) Quantitative analysis of the protein expression levels of ZO-1 (E), occludin (F) and claudin-5 (G) in the RBECs. Values are mean \pm SEM (n=5). **p<0.01 vs vehicle.

は、Apo-SAA 処理による RBEC の occludin と claudin-5 のタンパク発現量の減少を回復させた (Figure 2 F and 2 G)。

【考察】

本研究における主な知見は以下の 2 点である。(1) SAA は、occludin と claudin-5 の発現を減少させることで、脳血管内皮細胞のバリア機能を障害する。(2) SAA 誘発による血管内皮細胞の透過性亢進および RBEC の occludin および claudin-5 のタンパク質発現量の減少に対して、HDL は抑制作用を示す。

TEER 値は、細胞間隙経路を透過するイオン透過性を反映する。Figure 1 A に示すように、Apo-SAA 処理

は、時間と濃度に依存して RBEC 単層モデルの TEER 値を減少させた。この結果は、SAA が RBEC 単層モデルにおいて、細胞間隙経路の透過性を亢進させる可能性を示唆する。そこで、RBEC 単層モデルにおいて、SAA 誘導の細胞間隙経路透過性の亢進を確認するために、別の細胞間隙透過性マーカーである Na-F (分子量 367) を用いた。TEER 測定と一致して、Apo-SAA は RBEC 単層モデルの Na-F 透過性を濃度依存的に増加させ (Figure 1 C)、これらの結果は、SAA が血管内皮細胞間隙経路のバリア機能を脆弱化させることを示唆した。TJ は、隣接する BMEC の間に形成され、BBB の細胞間隙を透過する低分子の単純拡散を制限する。Apo-SAA は、RBEC の TJ 関連タンパク質である occludin と claudin-5 のタンパク質発現量を低下させた (Figure 1

D-1 G)。Occludin と claudin-5 の共抑制は、BBB を透過する低分子（分子量 3 kDa）の透過性を亢進することが報告されている。したがって、SAA による RBEC のバリア機能障害は、occludin および claudin-5 のタンパク質発現量の低下によるものと推察される。SAA の多面的機能は、formyl peptide receptor 2 (FPR 2)、Toll-like receptor 4 (TLR 4)、TLR 2、CD36、P2X receptor 7、RAGE など含むいくつかの受容体によって媒介され、phosphatidylinositol-3 kinase (PI 3 K)/Akt、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、および nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cell (NFκB) などの細胞内シグナル情報伝達経路の活性化を誘発する。PI 3 K/Akt 経路は、BBB バリア機能の調節に重要な役割を果たし、PI 3 K/Akt シグナル伝達の活性化は occludin および claudin-5 発現を低下させる。また、FPR 2 の遺伝子サイレンシングは、SAA 刺激ケラチノサイトの PI 3 K/Akt 経路の活性化を阻害することで、ケラチノサイトの増殖およびサイトカイン放出を抑制する。ウエスタンブロット法を用いて、RBEC における FPR 2 タンパク質の発現を確認した (data not shown)。過去の研究と併せて本研究結果を考察すると、SAA は FPR 2/PI 3 k/Akt 経路を介して occludin および claudin-5 のタンパク質発現量を減少させ、脳内皮細胞のバリア機能を障害させる可能性がある。FPR 2 に加えて、他の受容体も様々なメディエーターに反応して TJ 関連タンパク質を調節することが報告されている。Apo-SAA の熱不活性化が、RBEC 単層モデルにおける SAA 誘導の Na-F 透過性亢進を減衰させることを確認したが (Figure 2 A)、どの SAA 受容体が SAA による BBB 機能障害のメカニズムに関与するかは不明である。SAA による脳血管内皮細胞のバリア機能障害の詳細な分子メカニズムの解明は、今後の検討課題である。

10%血清を含む培地に Apo-SAA を添加した場合、RBEC 単層モデルにおける Apo-SAA の脳血管内皮細胞の透過性亢進作用は観察されなかった (Figure 2 B)。SAA は主に肝臓で産生され、循環血中に放出される (通常、SAA の血清レベルは 20–50 μg/mL)。ほとんどの SAA は血液中で HDL と結合しており、ヒト血漿中の SAA のごく一部 (約 50 ng/mL) が解離型として存在している。HDL に結合した SAA は、解離型とは異なる生理学的特性を示すことが知られているため、血清中の HDL が RBEC 単層モデルにおける SAA 誘発の脳血管内皮細胞の透過性亢進作用を阻害する可能性が考えられる。そこで、HDL の非存在下または存在下の無血清培地中を用いて、RBEC 単層モデルにおける Na-F 透過性に対する Apo-SAA の効果を比較した。HDL を含む無血清培地では BBB バリア機能 (脳血管内皮細胞の透過性亢進および TJ 関連タンパク質の減少) に対する Apo-SAA の作用が減弱した (Figure 2 C-2 G)。これらの

結果は、HDL が BBB バリア機能に対する SAA 障害作用に対して抑制作用を有することを示唆した。急性炎症時、血中 SAA 濃度は 1000 倍以上に増加する一方で、血中 HDL 濃度は敗血症性ショックの急性期で劇的に減少することが報告されている。また、末梢性慢性炎症疾患である糖尿病においても、HDL の減少と SAA の増加が病態進展に関与する。すなわち、SAA と HDL の機能的不均衡は、急性および慢性炎症で生じる可能性が十分に考えられる。さらに、SAA と HDL の機能的不均衡は BBB 障害を契機とした中枢神経障害や脳疾患の進展に寄与するかもしれない。

本研究では、in vitro において SAA が脳血管内皮細胞のバリア機能を障害することを報告した。さらに、HDL は SAA による脳血管内皮細胞のバリア機能障害を抑制した。

今後、COPD 病態下における脳機能の低下、SAA および HDL 発現量の変動および BBB 機能障害の関連についてモデル動物を用いて追究するとともに、COPD 治療薬の能移行性や薬物有害作用発現に与える影響を検討していく。