

山田 成美 論文内容の要旨

主論文

Hepatocyte growth factor enhances the barrier function in primary cultures of rat brain microvascular endothelial cells

肝細胞増殖因子は初代培養ラット脳毛細血管内皮細胞のバリア機能を強化する

山田成美 中川慎介 蓬萊彰士 田中邦彦 マリア A. デリ 八橋弘 丹羽正美

Microvascular Research, in press 2014

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員：八橋 弘 教授)

緒 言

血管内皮細胞は臓器により異なる特性を持ち、局所的なシグナルで調整されている。血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を構成する脳血管内皮細胞は、血液から脳実質への物質移動において高度に特異的な機構を有しており、その機能の構築と維持には、アストロサイトやペリサイトといった周辺細胞との相互作用が重要な役割を果たしている。脳毛細血管内皮細胞間はタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションといった細胞接着分子により強く結合しており、不要な物質の脳内移行を強く制限し、脳内環境維持装置として機能している。それゆえ、このバリア機能障害は脳内環境の破綻を引き起こし、中枢神経系疾患の発生に大きく関与している。肝細胞増殖因子 (HGF) は、細胞の増殖や運動性、血管新生、神経細胞保護などの多様な生理作用を示す。しかし、内皮細胞に対する HGF の作用は相反する報告がなされており、一定した見解が得られていない。特に脳血管内皮細胞での働きは明らかでない。そこで我々は、初代培養ラット脳毛細血管内皮細胞を用いた *in vitro* BBB モデルを作製し、HGF が BBB に与える影響を検討した。同時に、末梢由来の内皮細胞として、ヒト臍胎静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト皮膚毛細血管内皮細胞 (HMVEC) を用いて同様の検討を行い、末梢と中枢由来の内皮細胞の HGF に対する反応性を比較した。

対象と方法

3 週令 Wistar ラットより脳毛細血管内皮細胞(RBEC)を分離培養した。末梢由来の内皮細胞としてHUVECと HMVEC細胞を用いた。3種類の内皮細胞を Transwell® (polyester membrane, 0.4µm pore size) に播種し単層培養モデルを作製した。HGFの内皮細胞のバリア機能に与える影響を観察するために、HGFを添加し、経時的に経内皮電気抵抗(transendothelial electrical resistance, TEER)を測定した。また、Sodium fluorescein (NaF)とEvans-blue albumin (EBA)を使用し内皮細胞の透過性を測定した。HGFの細胞接着タンパクおよび細胞骨格タンパクへの影響を検討するために、タイトジャンクションの主要な構成タンパクであるclaudin-5, occludin, ZO-1と接着結合蛋白のVE-cadherin, および細胞骨格を構成するF-アクチンをウエスタンブロット法と免疫染色法で検討した。

結 果

単層 BBB モデルにおいて、HGFはTEERを上昇させNaFとEBAの透過性を減少させた。この上昇はHGFに対する中和抗体により抑えられた。一方、末梢由来の内皮細胞であるHUVECとHMVECにおいては、HGFによりTEERが低下し、透過性も亢進するといった逆の効果を示した。免疫染色では、RBECのタイトジャンクション蛋白であるZO-1と細胞骨格のF-アクチンが、HGFでの処理後に増強することが確認された。反対にHUVEC, HMVECではHGFにより減弱がみられた。ウエスタンブロットではHGFによるclaudin-5, occludinの変化はみられなかったが、接着結合蛋白のZO-1, VE-cadherinの増加を認めた。

考 察

HGFはBBBにおいてTEERを増加させ、透過性を低下させることから、BBB強化に作用していると考えられた。この機序として、接着結合タンパクであるZO-1, VE-cadherinの増加や細胞骨格の再構成によるものが考えられた。一方、末梢由来の内皮細胞ではRBECとは反対のバリア機能低下を引き起こしたことから、同じ内皮細胞でも中枢と末梢由来の内皮細胞では性質が異なることが考えられた。BBBの破綻は脳浮腫や神経障害の原因となり中枢神経疾患を惹起するが、HGFはBBBを強化することで中枢神経に保護的に作用し、中枢神経疾患の治療に有効である可能性が示唆された。