# 本田　優　論文内容の要旨

## 主　　論　　文

Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function

through the expression of claudin-5

アドレノメデュリンはクロウディン 5 の発現を通じて血液脳関門の機能を高進する

本田　優、中川　慎介、林　健太郎、北川直毅、堤　圭介、永田　泉、丹羽　正美

Cellular and Molecular Neurobiology 2006 Apr 20; [Epub ahead of print]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
医療科学専攻
（主任指導教員：永田　泉　教授）

**緒　　言**

脳微小血管内皮細胞（以下 BMEC）は、脳血管および心血管系での血管拡張作用、保護作用が注目されるペプチドであるアドレノメデュリン（以下 AM）の重要な供給源の一つである。AM は脳血管を拡張し、脳血流量を増加するが、細胞間内 cyclic AMP（cAMP）の増加、P-glycoprotein の活性化、また傍細胞輸送を制限し、BBB に保護的に働く。

血液脳関門（BBB）は BMEC、アストロサイト、周皮細胞の三種類の細胞から主に構成されており、なかでもタイトジャンクション（TJ）とよばれる密な内皮細胞間結合が、他組織に比し強固なバリアーを形成し、脳ホメオスタシスの安定化に働く。TJ を構成する膜蛋白の中でもクラウディン（claudin）は重要で、中でもクラウディン 5 が BMEC で特異的に発現し、 cAMP がクラウディン 5 の発現を増強することも報告されている。

BBB における AM とクラウディン 5 の関連を研究した報告はこれまでになく、我々は、AM は cAMP 様の機能を有すことから AM が BBB 機能を高進する過程でクラウディン 5 の発現を介している可能性が高いと考え、*in vitro* BBB モデルを作成し、AM の作用とクラウディン 5 発現の関連性を検討した。

**対象と方法**

１．動物：3 週令 Wistar Rat

２．培養：3 週令 Wistar Rat の脳から毛細血管内皮細胞を採取した。3 日間培養後、Transwell®の culture insert 内側に内皮細胞を播種し、3 日後に完成した単培養モデルを用い検討した。

３．AM 濃度：$10^{-6}$M、$10^{-7}$M、$10^{-8}$M、0M(コントロール) の４群とした。AM には cAMP-specific phosphodiesterase IV の阻害剤 4-(3-butoxy-4-methoxy-benzyl) imidazolidin-2-one (RO, 20-1724; 17.5 μM)を添加した。

４．BBB 特性の評価

AM を well (n=4)に投与し、6 時間後までの経内皮電気抵抗 (TEER)を観察した。6 時間後の insert を用いて、低分子量物質の傍細胞輸送の指標である sodium fluorescein (NaF、370Da)、また高分子量物質の経細胞輸送の指標である Evans' blue (EBA、67kDa)の透過性を観察した。

５．クラウディン 5 の評価

カバースリップ上に BMEC を 3 日間単培養し、2 と同様の濃度下で AM を 6 時間負荷し、細胞間結合部におけるクラウディン 5 の発現につき蛍光免疫染色を用いて観察した。また、ウェスタンブロッティングにて各 AM 濃度下でのクラウディン 5 の発現量も検討した。

## 結　　果

AM 投与後 TEER は時間経過とともに濃度依存的に漸増した。立ち上がり 30 分間の TEER 増加率も濃度依存的であった。

傍細胞輸送の指標である NaF 透過性は濃度依存的に低下していたが、経細胞 EBA 透過性に優位な変化は認めなかった。

クラウディン 5 は濃度依存的に細胞壁に強く発現し、蛋白量も同様の増加傾向を示していた。

## 考　　察

これらの結果により、AM は脳血管内皮細胞において濃度依存性に TJ 構成膜蛋白の一つであるクラウディン 5 の発現を通して BBB 機能を高めていることが明らかとなった。

AM がなぜクラウディン 5 の発現を惹起するのかについては以下のように考察する。

cAMP は、クラウディン 5 のリン酸化と protein kinase A（PKA）依存・非依存的経路で CL5 の発現を誘導する。 cAMP は PKA 非依存的に CL5 の遺伝子発現を活性化し、また PKA 活性化を通じても細胞間結合部でのクラウディン 5 発現を強化する。一方 AM は cAMP と同様に半減期が 20 分と短く、持続投与で得られる効果は cAMP 非依存性である。今回の研究で得られた結果では単回投与の効果は TEER 上 24 時間継続している。従って、AM/cAMP/PKA カスケードと、これらに依存しない直接的な AM の効果で CL5 発現に強く関与していることが想像された。

BBB において、AM はアストロサイトや周皮細胞の働きも調節しており、逆にアストロサイトから分泌される因子が AM の働きを強めている。さらに近年周皮細胞の TJ への保護作用も報告され、これらの細胞を用いて構築した新たな BBB 共培養モデル（BBB 再構築系）を利用した研究も BBB 特性を解明するには必要である。

また実験で使用する細胞系、培養液の組成、AM の投与部位なども、細胞の増殖・分化に影響し、クラウディン 5 だけでなく、アクチンフィラメントの再構築も TJ 機能高進に関与しており、今後はこれらの物質との関連も解明する必要がある。

AM の BBB 機能高進作用は、まだまだ解明すべき点が多いが、クラウディン 5 を標的とする新たな視点から、脳浮腫などの治療法が今後確立される可能性がある。