

Title	β1インテグリン/RhoK介在性・新規血管内皮透過性制御機構の解明
Sub Title	Elucidation of novel beta 1 integrin-dependent mechanisms regulating vascular permeability
Author	伊澤, 良兼(Izawa, Yoshikane) 高橋, 慎一( Takahashi, Shin'ichi) 畝川, 美悠紀( Unekawa, Miyuki) 塚田, 直己( Tsukada, Naoki )
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>当研究は脳虚血モデルマウスを用い、血管透過性亢進メカニズムの解明を行った。虚血中心部においては、虚血後3時間以内に70kDa RITC dextranが血管外に漏出する可能性が示された。また、24時間の虚血暴露により、毛細血管だけでなく、径の大きい細小動脈においても血管透過性が亢進する様子が確認された。当研究と同時並行で行われた頭部MR (Myelin map) を用いた観察研究では、深部白質病変における髄鞘障害が確認された。過去の研究結果とあわせ、虚血が血管内皮細胞のβ1インテグリン介在性細胞内シグナルの変化を介して血管透過性を亢進させ、白質病変を含む実質障害を進行させる可能性が示された。</p> <p>We investigated here the process of inducing increased permeability using a model mouse with permanent or transient ischemia, and examined whether white matter lesions in FLAIR or T2-weighted images in a human contain demyelination by a novel MR modality, Myelin-map, which can depict demyelination specifically. The results showed that microvascular permeability can increase in a few hours after the onset of ischemia, and 70kDa RITC dextran passed through the small vessels and capillaries in the ischemic core. Myelin-map showed demyelination in the white matter lesions in humans. These data suggested the possibility that leaked serum proteins, which have a molecular weight of around 70 kDa, might contribute to disruption of microvessels and damages of neuropil, observed after ischemia. These findings would provide a novel approach to the treatment of cerebral disorders including stroke and vascular dementia where the leaky vascular wall is relevant to their progression and complication.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B) 研究期間：2017～2018 課題番号：17K16129 研究分野：脳血管障害</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16129seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K16129seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16129

研究課題名（和文）1インテグリン/RhoG介在性・新規血管内皮透過性制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel beta 1 integrin-dependent mechanisms regulating vascular permeability

研究代表者

伊澤 良兼（Izawa, Yoshikane）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90468471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：当研究は脳虚血モデルマウスを用い、血管透過性亢進メカニズムの解明を行った。虚血中心部においては、虚血後3時間以内に70kDa FITC dextranが血管外に漏出する可能性が示された。また、24時間の虚血暴露により、毛細血管だけでなく、径の大きい細小動脈においても血管透過性が亢進する様子が確認された。当研究と同時並行で行われた頭部MR(Myelin map)を用いた観察研究では、深部白質病変における髄鞘障害が確認された。過去の研究結果とあわせ、虚血が血管内皮細胞の1インテグリン介在性細胞内シグナルの変化を介して血管透過性を亢進させ、白質病変を含む実質障害を進行させる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞、脳出血、脳血管性認知症、そのほか様々な神経疾患において、脳血管透過性の亢進がその発症・病状悪化に関与することが知られている。しかし、脳血管透過性亢進メカニズムは十分に解明されていない。当研究により、脳虚血が細小動脈・毛細血管レベルで、血管内皮細胞の細胞内シグナル変化により血管透過性を亢進させ、血漿タンパクの漏出を誘導し、髄鞘などの実質構造を障害するという機序（仮説）に矛盾しない結果が得られた。in vitroで特定された1インテグリン介在性細胞内シグナルを標的とする血管透過性制御手法は、脳血管障害、脳血管性認知症、そのほか血管透過性亢進が関与する神経疾患の治療確立に応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated here the process of inducing increased permeability using a model mouse with permanent or transient ischemia, and examined whether white matter lesions in FLAIR or T2-weighted images in a human contain demyelination by a novel MR modality, Myelin-map, which can depict demyelination specifically. The results showed that microvascular permeability can increase in a few hours after the onset of ischemia, and 70kDa FITC dextran passed through the small vessels and capillaries in the ischemic core. Myelin-map showed demyelination in the white matter lesions in humans. These data suggested the possibility that leaked serum proteins, which have a molecular weight of around 70 kDa, might contribute to disruption of microvessels and damages of neuropil, observed after ischemia. These findings would provide a novel approach to the treatment of cerebral disorders including stroke and vascular dementia where the leaky vascular wall is relevant to their progression and complication.

研究分野：脳血管障害

キーワード：血管透過性 血液脳関門 タイトジャンクション 1インテグリン 脳血管障害 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

平成 25 年度国民生活基礎調査によれば、脳血管障害、及び認知症は、要介護状態となる原因疾患の第一位、第二位を占め大きな問題となっている。脳梗塞の発症予防はいまだ抗血栓療法と血圧管理に依存し、抗血栓療法は脳出血発症リスクと表裏一体であるなど、脳血管障害の治療で解決すべき課題は多く、脳血管性認知症に至っては治療法が存在しない。安全性と有効性を両立した脳血管障害、さらには脳血管性認知症に対する治療の確立は喫緊の課題である。

脳出血をはじめとする脳血管障害および脳血管性認知症の高リスク患者では、病理学的に血管内皮細胞間の間隙が拡大し、血管内皮透過性が亢進することが 1970 年頃から知られていた。近年、頭部 MRI による評価でも、同様の高リスク患者群で脳血管透過性が亢進していることが報告されている。このように脳梗塞、脳出血、脳血管性認知症の発症・病状悪化に、脳血管透過性の亢進が関与することが示唆されるが、脳血管透過性亢進メカニズムは、十分に解明されていない。

我々はこの血管透過性亢進機序の解明に取り組み、低酸素状態で血管内皮細胞の  $\alpha_1$  インテグリン発現が減少すること、マイクログリアなどから分泌されたマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)や  $\alpha_1$ -カテプシンが、脳血管基底膜の主要マトリックスであるコラーゲン IV を分解すること、さらに、 $\alpha_1$  インテグリンと基底膜マトリックスの結合が消失することで、血管内皮透過性亢進が誘導されるという、全く新たな機序を報告してきた。しかしながら、 $\alpha_1$  インテグリンと細胞外マトリックスの解離から、内皮透過性亢進の主因たるタイトジャンクション減少に至る機序は未解明であった。当研究代表者の伊澤は、この機序解明に取り組み、血管内皮細胞の  $\alpha_1$  インテグリンの機能阻害により、FAK、ERK、及び RhoK 下流シグナルのリン酸化が誘発されること、特に RhoK 活性化が血管内皮細胞の claudin-5 を中心とするタイトジャンクションプロテインの発現を減少させ、血管透過性が亢進すること、RhoK 阻害薬(Y-27632)により血管透過性亢進を抑制できることを *in vitro* で明らかにした。一方、FAK、ERK、RhoK からさらにどのような細胞内シグナルが関与するのか不明であったほか、*in vivo* での血管内皮透過性亢進メカニズムを明らかにするため、新たな実験モデルの確立が必要となった。当研究はこのような背景をもとに開始された。

## 2. 研究の目的

当研究は、先述したように *in vitro* で脳血管内皮細胞の透過性亢進メカニズムをさらに解明すること、ならびにその結果を発展させ、中大脳動脈・虚血再灌流モデルマウスを用い、血管透過性亢進状態を再現し、*in vivo* での血管透過性評価手法を確立することを目的とした。

これまで血管透過性の亢進機序として、トロンピンによる protease activated receptor (PAR) 受容体活性化や、MMPs によるタイトジャンクションプロテインの分解が主たる経路と考えられてきた。我々が提唱した、基底膜マトリックス- $\alpha_1$  インテグリン結合の解離に起因する RhoK 活性化を含む内皮細胞内シグナル変化、および内皮細胞間タイトジャンクションプロテイン減少という機序は第 3 の新たな経路であり、血管透過性亢進が関与する、脳血管障害、多発性硬化症、転移性腫瘍など多岐にわたる神経疾患の新たな治療標的となる可能性を示すものである。

また、2016 年に我々慶應義塾大学医学部の複数の研究室が共同で、MRI 髄鞘イメージング「ミエリンマップ」を世界に先駆けて開発し、ヒトにおいて初めて実用レベルで髄鞘構造の変化をとらえることに成功している。そこで、脳血管透過性が亢進するとされるラクナ梗塞や白質病変を有する患者において、ミエリンマップによる神経髄鞘の評価を当基礎研究と並行して進める方針とした。これは、血管透過性と神経実質障害が密接に関連することが臨床データとして証明されれば、我々が提唱する血管透過性制御に基づいた脳血管障害、脳血管性認知症の治療手法について、臨床的有效性を示唆する証左になるものと考えたからである。

脳血管障害のほかにも、血管内皮細胞の透過性亢進が関与する多くの病態・疾患が知られており、当研究の成果は幅広い研究分野への波及が期待される。本邦における脳血管障害および脳血管性認知症に伴う社会的な負担、影響は高齢化の進展に伴い増大しており、まずは、新たな脳血管障害、脳血管性認知症の治療確立を目標として、当研究を開始した。

## 3. 研究の方法

実験の計画内容については、慶應義塾動物実験委員会の審査を受け、動物愛護の観点、環境保全の観点、ならびに動物実験等を行う者の安全確保の観点から策定された同実験委員会ガイドラインに則った動物実験プロトコルであることの確認を受けており、慶應義塾動物実験計画・承認番号 08097-(17)、16012-(2)として承認を得た。遺伝子改変マウスを用いた実験プロトコルについては、遺伝子組換え実験安全委員会への申請を行い、これも慶應義塾大学医学部遺伝子組換え実験・承認番号 17-037-14 として承認を受けた。

血管内皮細胞が蛍光標識された Tie2-GFP マウスを用い、中大脳動脈虚血再灌流モデルを使用

した。中大脳動脈の可逆的閉塞手法として、田村変法による中大脳動脈の一過性閉塞を行った。再灌流後に二光子顕微鏡(OLYMPUS FV1200MPE)にて、頭窓法により観察を行った。頭窓法は富田(慶應義塾大学医学部神経内科非常勤講師)らの報告に基づき、Bregma から後方 2mm、外方 3mm を中心に、左右両側に観察窓(頭窓)を作成し、中大脳動脈領域を生存麻酔下で直接観察する手法を用いた。二光子顕微鏡により、脳表から 500 $\mu$ m の深部まで連続的に観察可能であり、動脈・細動脈・毛細血管レベルでの変化を生体内で経時的に評価した。血管透過性亢進の評価は rhodamine dextran の血管外(神経実質)への拡散を観察して行った。なお、Dextran の分子量は 4kDa、70kDa を用いた。透過性は虚血開始後複数のタイムポイントにおいて評価した。

#### 4. 研究成果

これまでの研究により、1 インテグリンを介した out-in signal が阻害されると、内皮細胞内で myosin light chain(MLC)キナーゼ、Rho キナーゼ(RhoK)が活性化すること、Myosin light chain のリン酸化が亢進(pMLC が増加)し、内皮細胞内のアクチンフィラメントの構造変化が起こること、これにより内皮細胞間のタイトジャンクションが減少し、内皮間透過性が亢進することを明らかにした(5. 雑誌論文(2))。

in vivo 血管透過性亢進評価モデルマウスの確立では、血管内皮細胞が GFP 標識された Tie2-GFP マウスを用い、4kDa、70kDa RITC dextran の血管外への拡散を観察して行った。結果、虚血後 3 時間程度から血管透過性が亢進する可能性が示され、同時間帯から血漿タンパクが血管外に漏出しうること、それが更なる脳実質障害の進展に寄与しうることを示す結果が得られた。このほか、血管構造が比較的単純で漏出が起きやすいと予測された毛細血管だけでなく、血管平滑筋を有するような細小動脈からも、RITC dextran が漏出する様子が確認された。ただし、統計解析にはサンプル数が不十分であるため、今後同研究の継続が必要である。

永久閉塞モデルでは虚血開始 24 時間後には、血管外に多数の 70kDa RITC dextran が漏出したが、虚血再灌流モデルでは 24 時間後に血管外漏出する様子は確認されなかった。ただし、この虚血再灌流モデルの結果については、側副路からの血流、虚血領域のコア・辺縁などの部位の違い、あるいは虚血時間など様々な要素により左右され、一貫性のある結果は得られなかった。

以上のように、虚血後は我々が当初予測したよりも早期の時間帯から、細小動脈、毛細血管レベルで血管透過性の亢進が生じている可能性が示された。過去に我々が報告した invitro の実験結果も合わせて考えると、血管内皮細胞間のタイトジャンクションプロテイン発現を低下させる細胞内変化が虚血により生じてから、3 時間程度で血管透過性亢進による脳浮腫が in vivo で生じうることが推測された。

また、血管透過性亢進の評価に用いた RITC dextran の分子量は 70kDa であった。これは様々な血漿タンパクの分子量に相当するサイズであり、70kDa RITC dextran が漏出した結果は、血漿タンパクが血管外に漏出しうること、それが更なる脳実質障害、血管障害の進展に寄与しうることを示唆するものであった。

当基礎研究と並行して行われた、ミエリンマップ研究で着目した白質病変は、血管透過性亢進によって生じることが報告されている。FLAIR で確認された白質病変はミエリンマップでも髄鞘の障害が示唆されたが、このことは、ヒトにおいても様々な要因により生じた虚血が細小動脈レベルで血管透過性を亢進させ、血漿タンパクの漏出によって髄鞘などの実質構造を障害している可能性を示しているのかもしれない。また、血漿タンパクの漏出がさらなる血管障害を惹起し、これが白質病変の拡大を誘発する可能性も考えうる。今後は、血管障害を来す血漿タンパクの特定や、その作用機序、血管透過性亢進を抑制する薬剤の検討が必要である。

白質病変の進行、髄鞘障害の進行には、慢性の脳低灌流に起因する血液脳関門の破綻、血管透過性の亢進が関与していることが報告されているが、一連の研究によりリン酸化ミオシン軽鎖(pMLC)など、特定の脳血管内皮細胞内シグナルがこの血管透過性亢進にかかわる可能性を示す知見が得られた。今後は高血圧、糖尿病などを背景として血管透過性亢進を伴う血管病変、いわゆる細小動脈病変を有する患者において、このシグナルを標的とした、血管透過性制御に基づく、脳血管障害および認知機能低下に対する治療の確立を最終目標に研究を継続する方針である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Mashima K, Takahashi S, Minami K, Izawa Y, Abe T, Tsukada N, Hishiki T, Suematsu M, Kajimura M, Suzuki N. Neuroprotective Role of Astroglia in Parkinson Disease by Reducing Oxidative Stress Through Dopamine-Induced Activation of Pentose-Phosphate Pathway. ASN Neuro. 2018 Jan-Dec; 10: 1759091418775562. doi: 10.1177/1759091418775562. 査読有り  
Izawa Y, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Hawkins BT, Koziol JA, Papayannopoulou T, Spatz M, Del Zoppo GJ. 1-integrin-matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability. J Cereb Blood Flow Metab. 2018 Apr;38(4):641-658. doi: 10.1177/0271678X17722108. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

伊澤良兼. シンポジウム 1「血管内皮、グリア細胞、脳血液関門: 脳卒中と脳循環代謝 Neurovascular unit という微小世界からみた神経内科の実臨床」. Brain Japan 2018 第 61 回日本脳循環代謝学会学術集会 (2018 年 10 月 18-20 日, 岩手)

伊澤良兼. 基礎と臨床からみた血液脳関門の障害. Neurovascular unit 研究会 2018

伊澤良兼, 高橋慎一, 中原仁, 谷川万里子, 陣崎雅弘, 中村雅也, 岡野栄之, 鈴木則宏. MRI 髄鞘イメージング「ミエリンマップ」を用いた無症候性大脳白質病変における髄鞘障害の検討. Brain Japan 2017 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会

伊澤良兼, Gu YH, 長田高志, 金澤雅人, Hawkins BT, Koziol JA., Papayannopoulou T, Spatz M, del Zoppo GJ. 1 インテグリンは脳血管のタイトジャンクション発現と透過性を調節する (1-integrin modulates cerebral microvascular tight junction expression and permeability). Brain Japan 2017 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会

Izawa Y, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Hawkins BT, Koziol JA, Papayannopoulou T, Spatz M, Del Zoppo GJ. 1-integrin-matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability. The 8th Korea-Japan Joint Stroke Conference. 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者: 若手研究のため研究分担者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 高橋 慎一

ローマ字氏名: TAKAHASHI, Shinichi

研究協力者氏名: 畝川 美悠紀

ローマ字氏名: UNEKAWA, Miyuki

研究協力者氏名: 塚田 直己

ローマ字氏名: TSUKADA, Naoki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。