

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592100

研究課題名(和文)脳卒中におけるCNPの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)C-type natriuretic peptide modulates permeability of the blood&#8211;brain barrier

研究代表者

永山 哲也(Nagayama, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40336334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、脳に豊富に存在することが報告されているが、血液脳関門(BBB)に対する機能は明らかではない。本研究では、CNPによるBBB透過性亢進作用とそのメカニズムを解明した。BBBのバリア機能は、CNPの濃度依存的に減少した。CNPの作用は、cGMPのアナログである8-Br-cGMPで再現され、PKGの阻害剤であるRp-8-CPT-cGMPで阻害された。さらに、マウスにCNPを静注すると、血中フルオロセインの脳実質移行性が増加した。以上の結果より、CNPはBBBの透過性を亢進することが可能で、この結果は脳に対するドラッグデリバリーシステムの構築に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：C-type natriuretic peptide (CNP) is abundant in brain, but its effect on blood-brain barrier (BBB) permeability has not been clarified yet. Here, we examined this effect. Transendothelial electrical resistance (TEER) of in vitro BBB model, was significantly dose dependently decreased by CNP. CNP treatment reduced both the messenger RNA and protein expressions of zonula occludens-1 (ZO-1). The effects on TEER, mRNA, and protein expressions of ZO-1 were mimicked by cyclic GMP (cGMP) analog 8-bromo-cGMP and reversed by protein kinase G (PKG) inhibitor Rp-8-CPT-cGMP, thus implying the role of PKG and cGMP signaling in BBB function. In vivo study of mouse brain by fluorimetric analysis with intravenous administration of sodium fluorescein also showed a significant increase in BBB permeability by CNP. These findings suggest that CNP modulates the BBB permeability by altering ZO-1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：血液脳関門 C型ナトリウム利尿ペプチド zonula occludens-1 JunD ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

脳卒中においては、神経細胞の障害だけではなく、出血などの血管障害も併発する複合的な病態を呈する。さらには脳血管内皮細胞が障害され、血液脳関門の破綻によって脳浮腫が副次的に起こる事により脳へのダメージはさらに進行する (Park et al., 2004; Koliass et al., 2008)。すなわち、脳血管内皮細胞は脳卒中治療における重要なターゲットであるが、脳卒中時の脳血管内皮細胞の細胞死メカニズム及び保護方法は確立されているとはいえない。

一方、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーに属し、他のメンバーである ANP および BNP が心臓に局在するのは異なり、ほとんどが脳に局在するが、脳における詳細な機能は不明である。心筋や血管内皮細胞において多くの場合 CNP は保護効果を発揮することが報告されているが、一方で、CNP とそのセカンドメッセンジャーである cGMP は血管内皮細胞のアポトーシスを直接誘導することが報告されており (Suenobu et al., 1999)、状況に応じて CNP は血管内皮細胞に細胞死を誘導する可能性がある。さらに、CNP と同様にナトリウム利尿ペプチドファミリーに属し、セカンドメッセンジャーも共通している ANP に関しても、心筋細胞において細胞障害性および保護の二面性が存在することが報告されている (Kato et al., 2005)。我々の未発表のデータとして、初代培養ラット脳血管内皮細胞及びマウス脳血管内皮細胞のセルラインである bEnd3 (ATCC 社)には CNP およびその特異的受容体である GC-B が共に発現しており、このような初代培養ラット脳血管内皮細胞に対して 100 nM までの濃度で CNP を曝露すると、タイトジャンクションを形成するタンパク質である zonula occludens-1 (ZO-1)、Occludin-1 および Claudin-5 の発現量と経上皮電気抵抗 (TEER) の減少が CNP の濃度依存的

に低下することを見出している。すなわち、我々の実験系においても CNP は脳血管内皮細胞の細胞死のみならず機能面においても何らかの障害性を有する可能性を示唆している。一方、近年、脳の外傷的疾患や心臓疾患時においては血中 CNP 濃度の上昇が惹起されることが知られており、さらに心疾患では血管内皮細胞の機能障害と血中 CNP 濃度に正の相関が見られることが報告されていることから、CNP と血管内皮細胞の細胞死には関連性がある可能性が推察される (Wright et al., 2004; Bahrami et al., 2010; Del Ry et al., 2010)。そこで、申請者は脳虚血における CNP の病態生理学的な意義を CNP の障害性の面から検討し明らかにすることにした。

2. 研究の目的

極度の低血圧、心停止などにより生じる全脳虚血における海馬 CA1 および大脳皮質神経細胞、主幹動脈の閉塞により生じる局所脳虚血における梗塞辺縁部(ペナンブラ領域)の神経細胞など、これらの細胞は虚血後極めてゆるやかな経過を経て死に至ることが知られている。近年、このような部位の神経細胞においてはアポトーシスが関与していると考えられている。申請者も現在までラット全脳虚血モデル(4血管閉塞モデル)および局所脳虚血モデル(血管内栓子モデル)を用いて、脳虚血による神経細胞死がアポトーシスであることを裏付ける研究結果を多数報告してきた (Nagayama et al., 1999, 2000a and 2000b)。しかしながら、アポトーシスを誘導する主要な毒性物質であると考えられているグルタミン酸の受容体の阻害剤を投与することでは神経細胞保護作用が顕著に認められないことが知られている。そこで、新しい抗脳卒中薬の作用点として脳血管内皮細胞に着目、その細胞死を抑制し脳血管の恒常性を維持することで、浮腫や老廃物および有害物質の脳への流出を阻害することが可能

となる。その結果、神経細胞のアポトーシスを抑制し、脳卒中による後遺症を抑制できることが示唆される。

脳卒中は、日本における死因の第3位ではあるが、入院の原因疾患の第2位であるとともに、寝たきり老人の約40%、訪問看護の約40%を占めるなど、超高齢化社会を迎えた我が国において大きな社会問題となっていることから、脳卒中における脳障害メカニズムの解明は急務であると考えられる。

多くの先行研究においてCNPは保護的な物質であることが報告されているが、障害的な一面もある二面性を持った生体内物質ということは未だ議論されていない。本研究では、CNPによる細胞死誘導メカニズムを詳細に解析することによって、脳卒中におけるCNPの病態生理学的な意義を解明し、将来の脳卒中治療におけるCNPの臨床応用に繋げる。

3. 研究の方法

In vitro 血液脳関門モデルの作成

血液脳関門は血管内皮細胞とペリサイト、アストロサイトの3種類の細胞で構成される脳実質への分子輸送を制限するバリアである。この血液脳関門に対するCNPの効果を詳細に解明するためにin vitro血液脳関門モデルを作成する。具体的には、グライナー製のセルカルチャーインサートの底面にアストロサイトを培養し、逆の面にウシ脳微小血管内皮細胞を培養した。これにより、ウシ脳微小血管内皮細胞だけを培養した時に比べて、バリア機能の増加が観察されることが知られている (Gaillard et al., 2001)。

一方で、ファルマコセル社から上記3種類の細胞で構成されるin vitro血液脳関門モデルであるBBBキットが市販されている。

これらのin vitroにおけるBBBモデルを用いて、以下の実験を行った。

薬物の曝露

1-100 nMのCNPとcGMPのアナログである1 μ Mの8Br-cGMPは24時間曝露した。100 μ MのRp-8-CPT-cGMPSはCNPの曝露30前から適用した。

経上皮電気抵抗 (TEER) の測定

TEERは血管内皮細胞の層によって形成される電気抵抗を測定することで、バリア機能の指標とする試験である。具体的にはEVOM2とENDORM6で構成される電気抵抗測定器に、種々の処置をしたセルカルチャーインサートを入れ、その電気抵抗を測定した。

ウェスタンブロッティング

ウシ脳微小血管内皮細胞を培養し、種々の薬物を曝露した。24時間後にホスファターゼ阻害剤を添加したRIPAバッファ中で細胞を回収し、超音波発生装置で破碎した。5 μ gのタンパク質を用いて、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF膜に転写した後にウェスタンブロッティングに供した。一次抗体として、ZO-1, Claudin-5, Occludin-1 (Zymed), JunD (Cell Signal), Actin (SantaCruz), 二次抗体として、HRPと結合したmouse IgG (PIERCE), rabbit IgG (Cell Signal)を用いた。

RT-PCR

ウシ脳微小血管内皮細胞を培養し、種々の薬物を曝露した。24時間後にTRIzol (Life technologies)を用いてトータルRNAを回収した後、High capacity cDNA reverse transcription kit (Life technologies)を用いて逆転写を行った。その後、ZO-1, Claudin-5, Occludin-1, GAPDHを特異的に認識するプライマーを用いたPCRによって、それぞれのターゲットのmRNA発現量を測定した。

免疫細胞化学法

ウシ脳微小血管内皮細胞を培養し、種々

の薬物を曝露した。24時間後に-30°Cのメタノール/アセトンを5分間処置することで、細胞を固定しZO-1, Claudin-5を一次抗体とした免疫細胞化学法によって、それぞれのタンパク質の細胞内局在を観察した。

siRNA のトランスフェクション

ウシのJunDを特異的に認識するsiRNAは、Block-iT RNAi Designer (Life technologies) を用いてデザインし、Life technologies に合成を依頼した。siRNA は Lipofectoamine RNAiMAX によってウシ脳微小血管内皮細胞にトランスフェクションし、1日後にTEERを測定し、続いてCNPを曝露した。さらに、CNPの曝露から1日経過後に再度TEERを測定した。

In vivoでの解析

マウスの使用は鹿児島大学の動物実験倫理委員会の承認を受け実施した(MD12123)。ICR 雄性マウスに10 nmol/kgのCNPを静脈内投与し、投与後2, 6, 12, 24時間後に40 mg/kgのフルオロセインナトリウムを静脈内投与した。フルオロセインナトリウムの静脈内投与30分後に、ペントバルビタール麻酔下、心臓よりヘパリンを含有した生理食塩水を還流し、血液を洗い流した。次いで、脳を摘出し、ホモジナイズ後、488 nm (ex)/ 535 nm (em)の蛍光強度を測定することで、脳実質へ移行したフルオロセインナトリウム量を測定し、血液脳関門のバリア機能の指標とした。

4. 研究成果

ウシ脳微小血管内皮細胞とBBBキットにおいて、血液脳関門のバリア機能の指標であるTEERはCNPの濃度依存的、時間依存的に減少した (Fig.1.)。24時間後の標品をホモジナイズし、ウェスタンブロッティングおよびRT-PCR解析に供すると、タイトジャンクシ

ョンの形成に重要であることが知られているタンパク質群、ZO-1, Claudin-5, Occludin-1の中でもZO-1のタンパク質発現とmRNA発現が選択的に減少することが明らかとなった(Fig.2.)。

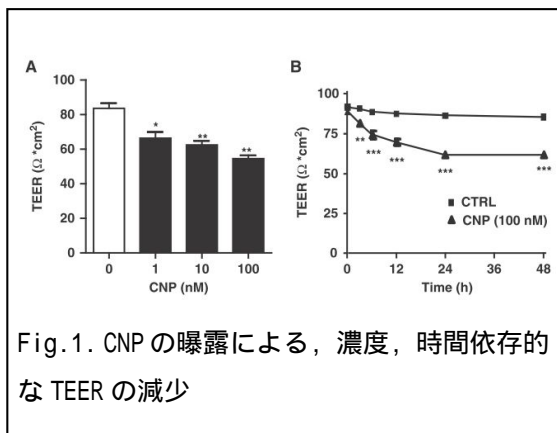


Fig.1. CNPの曝露による、濃度、時間依存的なTEERの減少

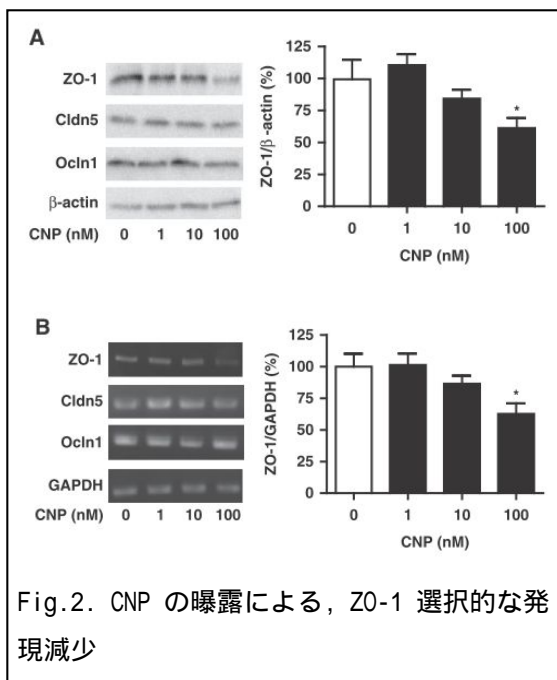


Fig.2. CNPの曝露による、ZO-1 選択的な発現減少

CNPは細胞膜受容体であるGC-Bにアゴニストとして作用し、細胞内セカンドメッセンジャーとしてcGMPを動員し、次いでPKGを活性化することが知られている。そこで、CNPが血液脳関門のバリア機能を抑制するメカニズムを詳細に解析する目的で、cGMPのアナログである8Br-cGMPとPKGの阻害剤であるRp-8-CPT-cGMPを用いて同様の解析を行うと、8Br-cGMPはCNPと同様にTEER、ZO-1発現を共に抑制することが明らかとなり、CNP曝露前

に Rp-8-CPT-cGMP を添加しておくことで、CNP による TEER, ZO-1 発現の抑制がキャンセルされた。このことから、CNP は cGMP/PKG シグナルを介して血液脳関門のバリア機能を抑制していることが明らかとなった (Fig.3.)。

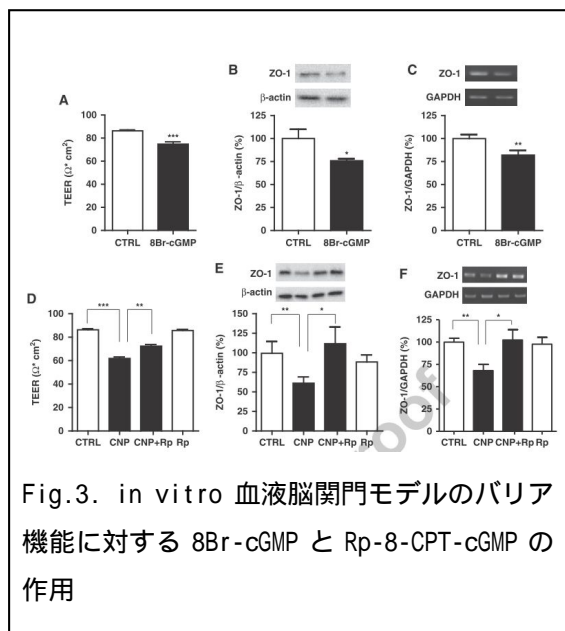


Fig.3. *in vitro* 血液脳関門モデルのバリア機能に対する 8Br-cGMP と Rp-8-CPT-cGMP の作用

続いて、研究代表者は ZO-1 発現が選択的に抑制されることに注目した。これまでの報告から、AP-1 ファミリーに属する転写制御因子である JunD は Claudin-5, Occludin-1 の発現には影響を与えず、選択的に ZO-1 の発現を抑制することが報告されている (Chen et al., 2008)。そこで、CNP の下流メカニズムにおける JunD の関与を検討した。まず、CNP と 8Br-cGMP を曝露した細胞を用いてウェスタンブロッティングを行い、JunD の発現を検討すると、どちらの化合物の曝露においても顕著な JunD 発現の増強が観察された。続いて、CNP の曝露前に Rp-8-CPT-cGMP を添加しておくことで、CNP による JunD の発現増強がキャンセルされた。すなわち、JunD の発現も CNP の下流において cGMP/PKG シグナルカスケードで調節されることが明らかとなった。さらに、CNP の曝露前に JunD の siRNA をトランスフェクションし、ZO-1 のタンパク質発現を観察すると、CNP による ZO-1 タンパク質の

発現抑制は JunD の siRNA のトランスフェクションでキャンセルされた。このような条件下において、*in vitro* 血液脳関門モデルにおける TEER を観察すると、CNP による TEER の抑制は JunD の siRNA のトランスフェクションによってキャンセルされた。以上の結果から、CNP は血液脳関門のバリア機能を抑制するが、これには cGMP/PKG/JunD のシグナルを介する ZO-1 の発現抑制が関与している可能性が明らかとなった (Fig.4.)。

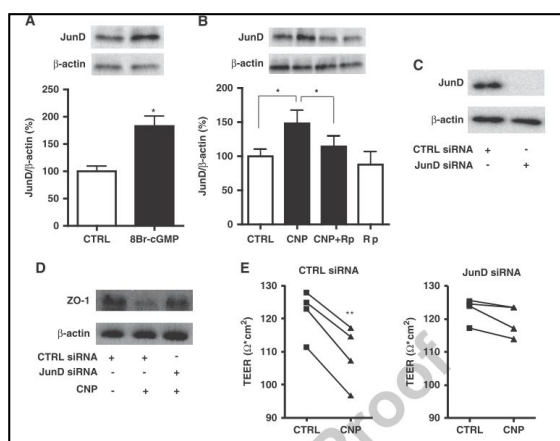


Fig.4. CNP による *in vitro* 血液脳関門モデルのバリア機能抑制における JunD の関与

さらに、CNP による血液脳関門のバリア機能の抑制がマウス個体でも観察されるかどうかを検討した。その結果、CNP を投与すると 6 時間目をピークにフルオロセインナトリウムの脳実質移行量が有意に増強することが明らかとなった。しかしながら、フルオロセインにデキストランを共有結合し分子量を大きくした分子の透過性には著変を与えなかった。このことから、CNP は低分子量の化合物に選択的に血液脳関門透過性を増加させることが明らかとなった (Fig.5.)。

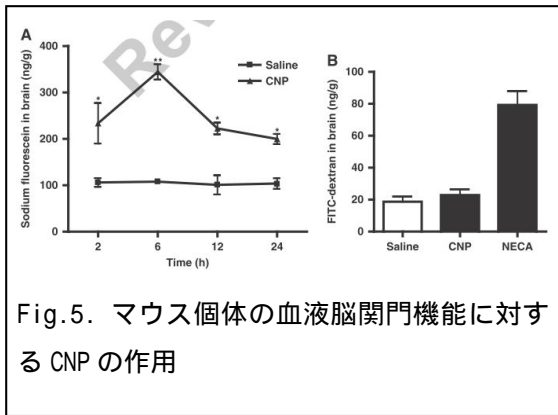


Fig.5. マウス個体の血液脳関門機能に対する CNP の作用

以上の結果より，CNP は BBB の透過性を亢進することが可能で，この結果は脳に対するドラッグデリバリーシステムの構築に寄与できる可能性が示唆された．

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1 M.Bohara, Y. Kambe, T. Nagayama, H, Tokimura, K. Arita, and A. Miyata. C-type natriuretic peptide modulates permeability of the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab. vol.34 589-596, 査読有, 2014

[学会発表] (計 3 件)

1 ボハラ マノズ、宮田篤郎、Effect of C-type natriuretic peptide on blood-brain barrier function. 第 15 回日本血管内分泌代謝学会学術総会、2011 年 11 月 25 日～26 日、千里ライフサイエンスセンター

2 神戸悠輝、Manoj Bohara、栗原 崇、永山哲也、有田和徳、宮田篤郎、C 型ナトリウム利尿ペプチドによる血液脳関門透過性の調節、第 31 回内分泌代謝セミナー、2013 年 7 月 11 日～13 日、ゆふいん山水館

3 神戸悠輝、Manoj Bohara、栗原 崇、永山哲也、有田和徳、宮田篤郎、C 型ナトリウム利尿ペプチドによる血液脳関門透過性の調節、第 4 回鹿児島神経科学研究会、2013 年 7

月 20 日、鹿児島大学

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

永山 哲也 (Nagayama Tetsuya)

鹿児島大学医歯学総合研究科・研究員

研究者番号 : 40336334

(2) 研究分担者

宮田 篤郎 (Miyata Atsurou)

鹿児島大学医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 60183969

(3) 研究分担者

神戸 悠輝 (Kambe Yuki)

鹿児島大学医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 60549913