

## 虚血脳における神経-グリア-血管内皮細胞相互作用

南 雅文

## Neuro-glio-vascular Interaction in Ischemic Brains

Masabumi MINAMI

Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,  
Kita 12 Nishi 6, Kita-ku, Sapporo 060-0120, Japan

(Received October 13, 2010)

The brain contains glial cells (astrocytes, microglia, and oligodendrocytes) and endothelial cells in addition to neurons. Under various pathologic conditions, the invasion of leukocytes such as neutrophils, monocytes/macrophages, and lymphocytes is observed. Interactions among these cell types play crucial roles both in brain function and dysfunction. However, the molecular basis of such interactions remains unclear. Cytokines and chemokines were originally identified as essential mediators of inflammatory and immune responses. Enhanced production and release of cytokines/chemokines are observed also in the central nervous system under various pathologic conditions. There is growing evidence showing that brain cytokines/chemokines play crucial roles in the neuro-glio-vascular interaction underlying the pathology of various brain disorders and therefore are potential targets for the development of novel and effective therapeutics for central nervous system diseases. This article reviews the evidence for the involvement of cytokines/chemokines in ischemic brain injury and presents our data on introducing organotypic brain slice cultures and *in vitro* blood brain barrier models as useful tools to investigate neuro-glio-vascular interaction.

**Key words**—neuro-glio-vascular interaction; ischemia; cytokine; chemokine

## はじめに

脳は、神経細胞だけでなく、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞、さらには、脳微小血管を構成する血管内皮細胞やペリサイトなどの様々な細胞種から構成されている。加えて、脳虚血などの病態時には、好中球や単球などの白血球も脳実質内へと浸潤する。脳の生理的あるいは病態生理的機能は、これら脳を構成する多様な細胞間の相互作用の上に成り立っているが、その細胞間情報伝達のしくみはかならずしも明らかではない。筆者らは、免疫反応や炎症反応において細胞間情報伝達物質として重要な役割を果たしているサイトカイン及びケモカインに着目し、それらの脳内における発現調節と役割に関して研究を進めてきた。本総説では、筆者

らの研究成果を中心に、脳内におけるサイトカイン及びケモカインの発現と機能、さらには、脳スライス培養系を用いた脳内細胞間相互作用解析について神経細胞傷害によるケモカイン産生誘導機構解析を例に紹介するとともに、プレリミナリーなデータではあるが、シンポジウムで紹介したインビトロ血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) モデルを用いたバリア機能における神経-グリア-血管内皮細胞間相互作用の役割について述べたい。

## 1. 虚血時における脳内サイトカイン・ケモカイン産生

1992年に、われわれが、ラット脳虚血モデルを用いて脳虚血による脳内インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 発現誘導を報告<sup>1)</sup>してから、これまでに脳虚血による脳内サイトカイン産生について多くの報告がなされている (Table 1).<sup>2)</sup> 4血管閉塞モデルでは、IL-1 $\beta$ に加え、IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) や transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) の遺伝子発現誘導が惹起されることが報告されてい

北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室 (〒060-0120 札幌市北区北12条西6丁目)

e-mail: mminami@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS47で発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Cytokine/Chemokine mRNA Expression in the Normal and Ischemic Brain

	Normal	Focal ischemia	Global ischemia
<b>Cytokine</b>			
IL-1 $\beta$	weak	↑	↑
IL-6	weak	↑	↑
IL-10		↑	
IL-23		↑	
G-CSF		↑	
TNF $\alpha$	weak	↑	↑
TGF $\beta$	weak	↑	↑
EPO	constitutive	↑	
<b>Chemokine</b>			
MCP-1/CCL2	weak	↑	
MIP-1 $\alpha$ /CCL3		↑	
CINC-1		↑	
MIP-3 $\alpha$ /CCL20		↑	
SDF-1/CXCL12	constitutive	↓, ↑	
fractalkine/CX <sub>3</sub> CL1	constitutive	↑	

Weak: detectable by RT-PCR; constitutive: detectable by RT-PCR, northern blot and *in situ* hybridization. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) and four vessel occlusion (4VO) models are used for focal and global ischemia, respectively. ↑ and ↓ means increase and decrease in the mRNA expression, respectively.

る。また、中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) による局所脳虚血モデルでの研究では、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), erythropoietin (EPO) などの発現上昇が報告されている。

ケモカインは、N 末側に保存されたシステイン残基周辺のアミノ酸の並びにより CXC, CC, C, CX<sub>3</sub>C の 4 つのサブファミリーに分類されている。虚血脳内においてケモカインの発現変化が報告されている (Table 1)。CXC ケモカインでは cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) の mRNA 及びペプチドレベルが上昇する。CC ケモカインである monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 及び macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) の mRNA 発現上昇、また、最近では MIP-3 $\alpha$  の mRNA 発現上昇<sup>3)</sup> も報告されている。CX<sub>3</sub>C ケモカインであるフラクタルカインは神経細胞において、一方、その受容体である CX<sub>3</sub>CL1 受容体はミクログリアにおいて構成的に発現している。<sup>4)</sup> 他の大部分のケモカインと異なり、フラクタルカインは膜貫通部位を有し膜タンパクとして存在しており、グルタミン酸受容体を介した興奮性刺激

によりフラクタルカインが切断され神経細胞から遊離されることが報告されていることから、<sup>5)</sup> 脳虚血時の細胞外グルタミン酸濃度上昇により傷害された神経細胞からフラクタルカインが遊離され、周辺のミクログリア活性化や白血球浸潤に関与している可能性が考えられる。

## 2. 虚血性脳細胞傷害とサイトカイン・ケモカイン

リコンビナントタンパク質や受容体拮抗薬、中和抗体、さらには遺伝子改変動物を用いた研究により、虚血性脳細胞傷害におけるサイトカイン・ケモカインの役割が検討されている (Table 2)。<sup>2)</sup> 脳虚血モデル動物を用いた実験において、リコンビナントタンパク質の脳内投与では、IL-1 $\beta$  が虚血性脳細胞傷害を増悪する一方、IL-6, IL-10, G-CSF, EPO の投与は脳保護作用を有することが報告されている。さらに、脳卒中患者へのリコンビナントヒト EPO 投与の効果を検討した治験では、EPO が脳梗塞叢体積を減少させる傾向があることが報告されている。<sup>6)</sup>

サイトカインによる情報伝達を阻害する研究としては、IL-1 $\beta$  の中和抗体や内因性受容体拮抗物質が脳保護作用を示す。さらに、IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  のダブルノックアウトマウスでは、野生型に比べて、局所脳虚血負荷後の脳梗塞叢体積が小さいことも報告されている。<sup>7)</sup> TNF $\alpha$  については、中和抗体や分泌型 TNF 受容体 (TNF と結合するが情報伝達を行わないため、中和抗体と同様の作用がある) が脳保護作用を示すとの報告がある一方、TNF 受容体ノックアウトにより虚血性脳細胞傷害が悪化すると報告もあり、虚血性脳細胞傷害における TNF $\alpha$  の役割には議論のあるところである。最近、IL-17 及び IL-23、特に、IL-17 のノックアウトにより虚血 4 日後の比較的遅い時期での脳細胞傷害が抑制されることが報告され、<sup>8)</sup> 脳卒中発症後でも有効な治療薬開発のための標的として期待されている。

われわれは、ケモカイン受容体拮抗薬が脳保護作用を有することを、マウス MCAO モデルを用いた実験により明らかにしている。<sup>9,10)</sup> また、IL-8 や CINC-1 の中和抗体の全身性投与が局所脳虚血による脳梗塞叢の体積を減少させるとの報告がある。<sup>11,12)</sup> さらに、遺伝子改変動物を用いた研究では、MCP-1 やフラクタルカイン遺伝子のノックアウト

Table 2. Effects of Cytokines/Chemokines and Their Antagonists, Neutralizing Antibodies or Gene Manipulation on Ischemic Brain Injury

	Manipulation	Effect
Cytokine		
IL-1	IL-1 $\beta$	detrimental
	anti-IL-1 $\beta$ antibody	protective
	IL-1ra (endogenous antagonist)	protective
	IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ KO mice	protective
IL-6	IL-6	protective
IL-10	IL-10	protective
IL-17	IL-17 KO mice	protective
IL-23	IL-23p19 KO mice	protective
G-CSF	G-CSF	protective
TNF $\alpha$	anti-TNF $\alpha$ antibody	protective
	soluble form of TNF receptor I	protective
	TNF receptor KO mice	detrimental
EPO	EPO	protective
	EPO derivatives	protective
Chemokine		
	retroinverso analogue of MCP-1 (broad-spectrum chemokine inhibitor)	protective
	vMIP-II (virus-derived chemokine receptor an- tagonist)	protective
	TAK-779 (CCR2/CCR5 receptor antagonist)	protective
IL-8/CXCL8	anti-IL-8 antibody	protective
CINC	anti-CINC antibody	protective
MCP-1/CCL2	MCP-1 KO mice	protective
	MCP-1 overexpression in the brain	detrimental
MIP-3 $\alpha$ /CCL20	anti-MIP-3 $\alpha$ antibody	protective
fractalkine/CX <sub>3</sub> CL1	fractalkine KO mice	protective

により虚血性脳細胞傷害の程度が軽減すること<sup>13,14)</sup> 逆に, MCP-1 遺伝子を脳内で過剰発現するトランスジェニックマウスで虚血性脳細胞傷害が悪化すること<sup>15)</sup>が報告されており, 虚血脳内において産生・遊離されたこれらケモカインが脳細胞傷害の増悪因子として働いている可能性が考えられる。

### 3. 虚血性脳細胞傷害における神経-グリア-血管内皮-白血球間相互作用

脳内サイトカイン・ケモカインの産生細胞あるいは標的細胞としてアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。脳虚血により活性化されたミクログリアは一酸化窒素 (NO) やフリーラジカルに加えて IL-

1 $\beta$  や TNF $\alpha$  などのサイトカインを産生・遊離する。これらサイトカインはアストロサイトに作用し MCP-1 や IL-8 などのケモカインを産生させ, さらに, これらケモカインはミクログリアを活性化させる。結果として, 活性化したグリア細胞により脳内においてサイトカイン・ケモカインネットワークが構築され, 虚血性脳細胞傷害の形成あるいは増悪に係わることが考えられる。

脳血管内皮細胞や病態時に脳実質内に浸潤してくる白血球も脳内サイトカイン・ケモカインの標的となり得る。脳実質で産生されたケモカインはトランスサイトーシスなどにより血管内皮細胞を通過し, 管腔側細胞表面に存在するヘパラン硫酸グリカンなどに結合し白血球に提示される。白血球上の受容体にケモカインが結合するとインテグリンが活性化され, 内皮細胞上の intercellular cell adhesion molecule (ICAM) や vascular cell adhesion molecule (VCAM) に結合する。これにより白血球の脳実質内浸潤が起こる。脳微小血管内皮細胞では IL-1 受容体が豊富に発現しており, IL-1 受容体刺激により MCP-1 や ICAM の産生が増加することが報告されている。<sup>16)</sup> 脳実質内に浸潤した白血球や活性化した内皮細胞も, グリア細胞とともに, 脳内サイトカイン・ケモカインネットワークに組み込まれる。

BBB の透過性も脳内サイトカイン・ケモカインの影響を受ける。例えば, MCP-1 は脳血管内皮細胞上にある受容体に結合し, 細胞骨格タンパク質の再構成とタイトジャンクションタンパク質の局在変化を引き起こすことにより血管透過性を亢進させる。<sup>17)</sup> 血管透過性亢進は脳浮腫や脳出血につながり脳卒中患者の生命を脅かす原因となるため, BBB 機能に対するサイトカイン・ケモカインの効果の解明とそれに基づく治療薬の開発が待たれる。

### 4. 脳スライス培養系を用いた神経細胞傷害によるグリア細胞活性化機構の解析

脳が傷害されると周辺のグリア細胞が活性化することはよく知られた現象であるが, 傷害された細胞からグリア細胞への情報伝達分子についてはほとんど不明のままであり, また, そのような情報伝達に係わるグリア細胞内の情報伝達機構にも不明な点が多い。筆者らは, 神経-グリア細胞間相互作用がインビボに近い状態で保持されている脳スライス培養系を用いて, 脳虚血病態において重要な役割を果た

していると考えられている興奮性神経毒性による神経細胞傷害が、アストロサイト活性化を引き起こすメカニズムを、ケモカイン産生誘導を指標として検討してきた。グルタミン酸受容体アゴニストであるNMDAを高濃度処置することにより、神経細胞傷害とケモカインMCP-1産生誘導が惹起された。このとき、神経細胞での一過性のextracellular signal-regulated kinase (ERK)活性化に引き続き、アストロサイトでの持続的なERK活性化が惹起されること、さらに、アストロサイトでのケモカインMCP-1産生誘導には、神経細胞でのERK活性化は関与せず、アストロサイトでの持続的なERK活性化が重要であることを明らかにしている (Fig. 1).<sup>18)</sup> 現在、脳スライス培養系を活用して、傷害された神経細胞から遊離あるいは漏出して周辺のグリア細胞に情報を伝達する分子を探索中である。

#### 5. BBBバリア機能における神経-グリア-血管内皮細胞相互作用の役割—新規インビトロBBBモデルを用いた解析—

BBBは血管内皮細胞間のタイトジャンクションを基盤として形成されているが、そのバリア機能は、血管内皮細胞と近接するアストロサイトや神経細胞などとの多種細胞間のクロストークにより調節されている。一方、種々の脳疾患時にBBB透過性が亢進することが知られているが、その詳細なメカニズムはよく分かっていない。これまで、BBBバリア機能の研究は、多孔質膜上に脳微小血管内皮細胞

胞 (brain microvascular endothelial cell, BMEC) を培養したものや、多孔質膜の上面と下面に、各々BMECとアストロサイトを培養したものをを用いて行われてきた。しかしながら、アストロサイトの性質は神経細胞との相互作用の有無により大きく異なることから、よりインビトロに近いBBBモデルを得るためには、神経-アストロサイト-血管内皮細胞相互作用を有するモデルの構築が必要であると考えられる。そこで、筆者らは、神経、アストロサイト、BMECの3種の細胞からなる新規BBBモデルを作製し、従来のBBBモデルと比較するとともに神経細胞傷害時のバリア機能変化に関して検討した。

経内皮電気抵抗値 (TEER) 並びに蛍光標識物質透過性を指標としてBBBモデルのバリア機能を評価したところ (Fig. 2), BMEC単独に比較し、BMEC (上面)+アストロサイト (下面)は高いバリア機能を有していた。さらに、培養アストロサイトの代わりに、下面をアストロサイトと神経細胞の共培養としたところ、さらに高いバリア機能を得ることができた。NMDA (100  $\mu\text{M}$ ) によって神経細胞特異的に傷害を与えたとき、48時間以降において、TEERの減少と蛍光標識物質透過性の増大が認められ、バリア機能が著しく低下することが示された (Fig. 3)。本インビトロBBBモデルは、BBB機能における神経-アストロサイト-血管内皮細胞相互作用の役割の解明、及び、神経細胞傷害がBBB機能に与える影響とそのメカニズムの解析に有用であ

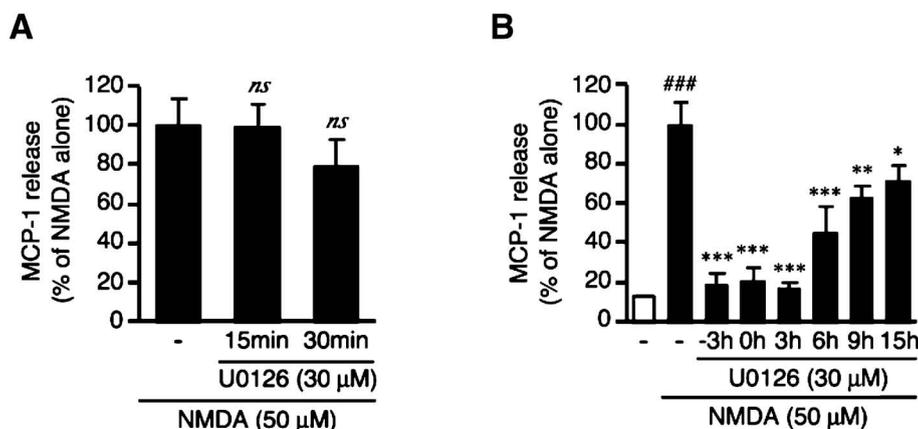


Fig. 1. Inhibition of Astrocytic, But not Neuronal, ERK Activation Suppresses Neuronal Injury-induced MCP-1 Production

MEK inhibitor U0126 (30  $\mu\text{M}$ ) was applied 3 h before NMDA treatment (50  $\mu\text{M}$ , 3 h) and washed out at 15 or 30 min after the end of NMDA treatment to suppress early activation of ERK in neurons, but not later activation of ERK in astrocytes (A), or applied 3 h before or 0, 3, 6, 9, or 15 h after the beginning of NMDA treatment to suppress later activation of ERK in astrocytes in a stepwise manner (B). MCP-1 concentration in the culture medium at 27 h was determined. Values are expressed as percentages of MCP-1 release in NMDA alone-treated culture. ns (not significant), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. NMDA alone-treated group. ### $p < 0.001$  vs. vehicle-treated group.

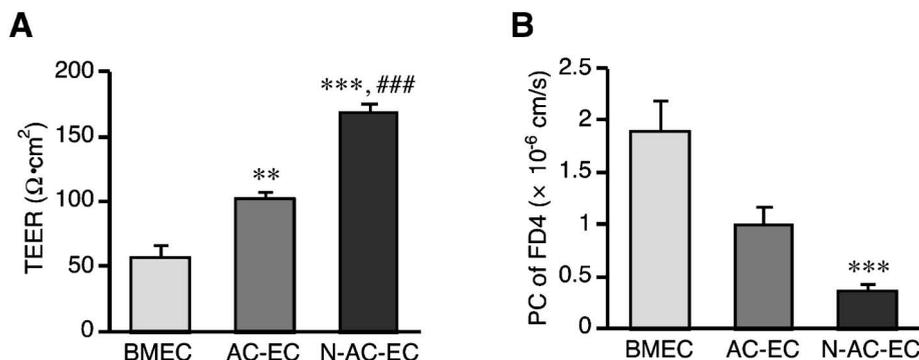


Fig. 2. Comparison of the Barrier Function among Three Types of *In Vitro* BBB Models

The models were composed of BMEC alone (BMEC), astrocytes and BMEC (AC-EC), or neuron-astrocyte co-culture and BMEC (N-AC-EC). BMEC were seeded on the upper side of porous membrane, and astrocyte-enriched culture or neuron-astrocyte co-culture was seeded on the underside of the membrane. The barrier function was determined by measuring TEER (A) and FITC-dextran (MW 4000; FD4) permeability (B). Permeability coefficient (PC) of FD4 was calculated from the permeability for 5 h. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. BMEC, \*\*\* $p < 0.001$  vs. AC-EC.

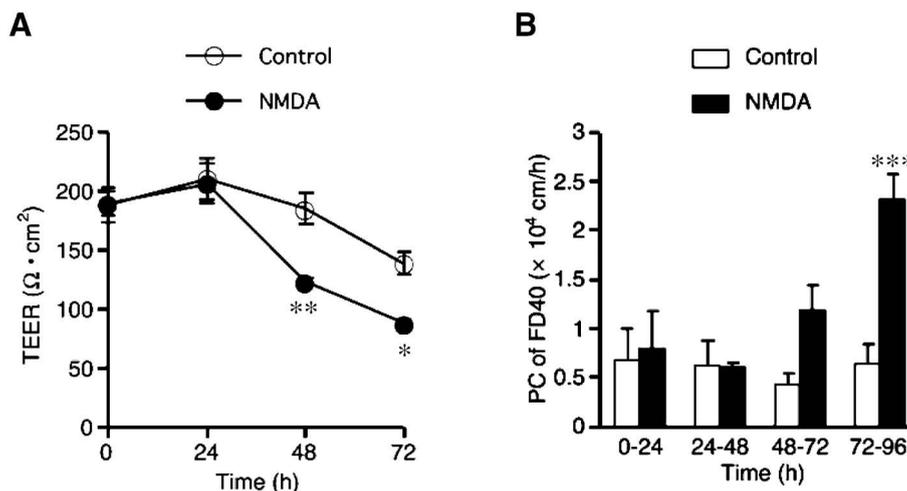


Fig. 3. Effect of Neuronal Injury on the Barrier Function in *In Vitro* BBB Model (N-AC-EC)

The barrier function was determined by measuring TEER (A) and FITC-dextran (MW 4000; FD40) permeability (B). After treatment with NMDA (100  $\mu$ M), TEER and PC of FD40 were determined every 24 h. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control.

ることが示唆された。

#### おわりに

脳内炎症様反応 (neuroinflammation) は、様々な神経疾患に関与していることが明らかにされつつあり、そこでは、脳内サイトカイン・ケモカインが神経-グリア-血管内皮細胞間の情報伝達分子として重要な役割を果たしている。本稿では、虚血性脳細胞傷害に焦点を絞ったが、脳内サイトカイン・ケモカインはパーキンソン病などの神経変性疾患、さらに最近では、うつ病や統合失調症などの精神疾患への関与も指摘されている。個体を用いたインビボ実験系に加え、脳スライス培養系や BBB モデルを用いたインビトロ実験系の開発と創薬研究への応用に

より、神経-グリア-血管内皮細胞間相互作用におけるサイトカイン・ケモカインの役割が明らかとなり、種々の精神神経疾患に対する有効な治療薬の創製につながることを期待している。

#### REFERENCES

- 1) Minami M., Kuraishi Y., Yabuuchi K., Yamazaki A., Satoh M., *J. Neurochem.*, **58**, 390–392 (1992).
- 2) Minami M., Katayama T., Satoh M., *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 461–470 (2006).
- 3) Terao Y., Ohta H., Oda A., Nakagaito Y., Kiyota Y., Shintani Y., *Neurosci. Res.*, **64**, 75–82 (2009).

- 4) Nishiyori A., Minami M., Ohtani Y., Takami S., Yamamoto J., Kawaguchi N., Kume T., Akaike A., Satoh M., *FEBS Lett.*, **429**, 167–172 (1998).
- 5) Chapman G. A., Moores K., Harrison D., Campbell C. A., Stewart B. R., Strijbos P. J., *J. Neurosci.*, **20**, RC87 (2000).
- 6) Ehrenreich H., Hasselblatt M., Dembowski C., Cepek L., Lewczuk P., Stiefel M., Rustenbeck H. H., Breiter N., Jacob S., Knerlich F., Bohn M., Poser W., R  ther E., Kochen M., Gefeller O., Gleiter C., Wessel T. C., De Ryck M., Itri L., Prange H., Cerami A., Brines M., Sir  n A. L., *Mol. Med.*, **8**, 495–505 (2002).
- 7) Boutin H., LeFeuvre R. A., Horai R., Asano M., Iwakura Y., Rothwell N. J., *J. Neurosci.*, **21**, 5528–5534 (2001).
- 8) Shichita T., Sugiyama Y., Ooboshi H., Sugimori H., Nakagawa R., Takada I., Iwaki T., Okada Y., Iida M., Cua D. J., Iwakura Y., Yoshimura A., *Nat. Med.*, **15**, 946–950 (2009).
- 9) Takami S., Minami M., Nagata I., Namura S., Satoh M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 1430–1435 (2001).
- 10) Takami S., Minami M., Katayama T., Nagata I., Namura S., Satoh M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 780–784 (2002).
- 11) Matsumoto T., Ikeda K., Mukaida N., Harada A., Matsumoto Y., Yamashita J., Matsushima K., *Lab. Invest.*, **77**, 119–125 (1997).
- 12) Yamasaki Y., Matsuo Y., Zagorski J., Matsuura N., Onodera H., Itoyama Y., Kogure K., *Brain Res.*, **9**, 103–111 (1997).
- 13) Hughes P. M., Allegrini P. R., Rudin M., Perry V. H., Mir A. K., Wiessner C., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 308–317 (2002).
- 14) Soriano S. G., Amaravadi L. S., Wang Y. F., Zhou H., Yu G. X., Tonra J. R., Fairchild-Huntress V., Fang Q., Dunmore J. H., Huszar D., Pan Y., *J. Neuroimmunol.*, **125**, 59–65 (2002).
- 15) Chen Y., Hallenbeck J. M., Ruetzler C., Bol D., Thomas K., Berman N. E., Vogel S. N., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 748–755 (2003).
- 16) Zhang W., Smith C., Howlett C., Stanimirovic D., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 967–978 (2000).
- 17) Stamatovic S. M., Keep R. F., Kunkel S. L., Andjelkovic A. V., *J. Cell Sci.*, **116**, 4615–4628 (2003).
- 18) Katayama T., Sakaguchi E., Komatsu Y., Oguma T., Uehara T., Minami M., *Eur. J. Neurosci.*, **31**, 1359–1367 (2010).