



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1959号
学位記番号	第1389号
氏名	中村 知寿
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Aβ42 treatment of the brain side reduced the level of flotillin from endothelial cells on the blood side via FGF-2 signaling in a blood-brain barrier model (血液脳関門モデルにおける脳側へのAβ42投与はFGF-2シグナルを介して内皮細胞から血液側へのフロチリン分泌を低下させる)</p> <p>Molecular Brain, 16(1):15, 2023</p>
論文審査担当者	主査： 松川 則之 副査： 斎藤 貴志, 飛田 秀樹

背景

アルツハイマー型認知症(AD)の診断マーカーは、脳脊髄液中の A β 42、リン酸化タウ蛋白質や PET-CT での脳内 A β 沈着などが最も有力とされている。しかし、これらの検査は侵襲的で、高価なため、その臨床利用は非常に限られる。近年では、A β を標的とした疾患修飾薬の臨床試験で有望な結果が報告され、実臨床への展開が期待されている。したがって、疾患の早期診断や適切な治療選択のためにバイオマーカーの利用がこれまで以上に重要になっている。

目的

我々の以前の研究では、AD 患者の血中フロチリン濃度は、非 AD 患者および血管性認知症患者と比較して低下し、血中フロチリンが AD の血液バイオマーカーとなる可能性を示した。しかし、血中フロチリン濃度が低下する分子メカニズムは未解明であった。今回、我々は血液脳関門(BBB)に着目して、*In vitro* BBB モデルを構築し、脳内の A β が血中フロチリン分泌に影響を与える分子メカニズムについて検討した。

方法

1) *In vitro* BBB モデルの構築

我々が以前に確立したヒト人工多能性幹(iPS)細胞から得た脳毛細血管内皮細胞(iBMECs)とラット初代培養アストロサイトによる *In vitro* BBB モデルを使用した。iBMEC をトランスウェルインサートの上面(血液側)に、アストロサイトをウェルの底面(脳側)に播種した。BBB のバリア機能は経内皮電気抵抗値(TEER)を用いて評価した。

2) 脳側 A β 42 による血液側フロチリンタンパクレベルの評価

脳側に添加した A β 42 による血液側培養上清中のフロチリンレベルをウエスタンブロット(WB)にて評価した。脳側に A β を添加した後、血管側から培養上清を回収して WB を行った。

3) アストロサイトの細胞内および分泌 FGF-2 の評価

A β 42 によるアストロサイトの細胞内 FGF-2 レベルを WB にて評価した。分泌 FGF-2 は脳側培養上清を限外ろ過して濃縮した後、ELISA を用いて測定した。

4) 脳側 FGF-2 が血液側フロチリンレベルに与える影響の評価

A β 42 によるフロチリンレベルの減少を、FGF-2 の添加により回復できるかどうかを検討した。A β と同時に、FGF-2 を添加し、血液側フロチリンレベルを WB で評価した。

結果

1) 我々の *in vitro* BBB モデルは、血管内皮細胞のバリア機能の指標となる TEER 値が高く、実験期間中において A β 42 による変化は認めなかった。iBMECs のみをインサートに播種した単層培養系では、A β 42 は血液側のフロチリン分泌に影響を及ぼさなかった。

2) ウェル底面にアストロサイトを播種した共培養系のモデルでは、血液側フロチリンレベルは時間依存的に増加し、A β 濃度依存的にフロチリン分泌が有意に抑制された。

3) 脳側の培養上清およびアストロサイトの FGF-2 レベルは、A β 42 により有意に減少した。また、脳側 FGF-2 の低下は、iBMECs における FGF-2 受容体(FGFR-1)のリン酸化レベルの減少を伴っていた。

4) 脳側 A β 42 による血液側のフロチリンレベルの減少は、脳側への FGF-2 の添加により用量依存的に回復した。

考察

今回の結果から、血液側のフロチリン分泌に及ぼす影響は、脳側の $A\beta$ がアストロサイトから分泌される $FGF-2$ レベルを低下させ、 $FGF-2$ の低下が $iBMECs$ を介して $iBMECs$ から血液側に分泌されるフロチリンレベルを低下させたと考えられた。 $iBMECs$ 単独培養とアストロサイトとの共培養の結果の違いから、 $A\beta$ が $iBMECs$ に直接作用するのではなく、アストロサイトを介した間接的な作用によると考えられるためである。すなわち、脳側の $A\beta$ により脳側の $FGF-2$ が減少し、血管内皮細胞の $FGF-2$ 受容体を介したシグナル伝達が減少したと推察される。これは、 $A\beta$ 処理により $iBMECs$ の $FGFR1$ のリン酸化が抑制された結果からも支持される。さらに、 $FGF-2/FGFR1$ 経路が血管リモデリング、細胞外小胞 (EVs) 放出に関与するとの報告もある。 EVs やエクソソームの AD 診断への有用性が報告されているが、我々の発見は、脳内 $A\beta$ が血管内皮細胞を介して血中のフロチリンなど EVs やエクソソームに関わる分子のレベルを変化させるという新しいメカニズムである。

アストロサイトは、中枢神経系における血管新生の際、成長因子を分泌して成熟脳血管の誘導に寄与している。さらに、多くの抗炎症および組織保護メディエーターを分泌し、炎症を制御することも示されている。本研究では、 $A\beta$ 処理によりアストロサイト細胞内外の $FGF-2$ レベルが低下することを見いだした。これまでの研究で、 $FGF-2$ は BBB の特性を誘導するアストロサイト因子の一つであることが示されているが、本研究はアストロサイトから分泌される $FGF-2$ が血管内皮細胞機能に影響を与え、フロチリン分泌を制御していることが明らかになった。これまで、脳内の代謝物は、動脈周囲排液やリンパ系を経由して血液に出ると考えられてきたが、今回明らかになった経路は、これまでの仮説とは異なった脳内の分子が血液側に及ぼす新規の伝達経路であるといえる。

結論

AD 血中フロチリンタンパクの低下が起こる原因の一つとして、 $A\beta 42$ によりアストロサイトから分泌される $FGF-2$ の低下を介して、血管内皮細胞から分泌されるフロチリンタンパクの分泌低下が引き起こされている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】アルツハイマー型認知症(AD)の診断マーカーは、脳脊髄液検査や PET-CT など画像検査が最も有力とされている。しかし、これらの検査は侵襲的あるいは検査費用が高価なため、その臨床利用は非常に限られている。一方、近年、A β を標的とした疾患修飾薬が実臨床へ展開される段階に入りつつあり、疾患の早期診断や適切な治療選択のための簡便なバイオマーカーがこれまで以上に重要になっている。申請者らの研究グループでは、血中フロチリタンパクが AD の血液バイオマーカーとなる可能性を発見した。しかし、血中フロチリン濃度が低下する分子メカニズムは未解明であり、本研究では脳内の A β が血中フロチリン分泌に影響を与える分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト人工多能性幹細胞から得た脳毛細血管内皮細胞(induced microvascular endothelial-like cells: iBMECs)とラット初代培養アストロサイトで *In vitro* BBB モデルを構築した。血液脳関門 (Blood brain barrier: BBB) のバリア機能は経内皮電気抵抗値(trans-endothelial electrical resistance: TEER)を用いて評価した。培養上清中のフロチリンおよび FGF-2 の解析はウェスタンブロッティング法で行った。分泌 FGF-2 は培養上清を限外ろ過して濃縮した後、ELISA を用いて定量した。

【結果】*In vitro* BBB モデルは、TEER 値が十分に高く、実験期間中において A β 42 処理による有意な変化は認めなかった。iBMECs のみの単層培養系では、A β 42 による血液側へのフロチリン分泌に影響を及ぼさなかったが、アストロサイトとの共培養系モデルでは、A β 42 濃度依存的にフロチリン分泌が有意に減少した。脳側の培養上清およびアストロサイトの FGF-2 は、A β 42 により有意に減少した。また、脳側 FGF-2 の低下は、iBMECs における FGF-2 受容体のリン酸化の減少を伴っていた。脳側 A β 42 による血液側のフロチリンの減少は、脳側への FGF-2 の添加により用量依存的に回復した。以上より A β 42 による血中フロチリン低下メカニズムとして、脳内における A β 42 の増加が、アストロサイトからの FGF-2 分泌低下を招き、FGF2 によって駆動する血管内皮細胞におけるシグナル伝達の変化、ならびにそれに依存して生じるフロチリン分泌低下によって引き起こされるのではないかと考えられた。

【考察】本研究は、iBMECs の単独培養とアストロサイトとの共培養の結果の違いから、A β が iBMECs に直接作用するのではなく、アストロサイトを介した間接的な作用であることを示した。これまでの研究で、FGF-2 は BBB の特性を誘導するアストロサイト因子の一つであることが示されているが、本研究はアストロサイトからの FGF-2 分泌低下が血管内皮細胞機能に影響を与え、フロチリン分泌を制御していることが明らかになった。これまで、脳内の代謝物は、動脈周囲排水やリンパ系を經由して血液に出ると考えられてきたが、今回明らかになった経路は、これまでの仮説とは異なった脳内の分子が血液側に及ぼす新規の伝達経路であると考えられる。

【審査内容】申請者のプレゼンテーションの後、主査松川から①アミロイド PET の結果とフロチリン濃度の連続関数として表した場合に逆相関がみられるのではないかと、②歯科疾患と AD の関連について、③TEER 値のメカニズムなどにつき計 7 項目の質問、第一副査の斎藤教授から①AD 患者の脳での FGF-2 濃度に関する報告、②実験に使用した FGF-2 は生理的な濃度か、③iBMECs とアストロサイトを直接接触させたモデルについてなどについて計 9 項目の質問、第二副査の飛田教授から①アストロサイトの培養について、②iPS 細胞から iBMECs への分化効率、③脳部位によってアストロサイトに差異があるが、海馬由来のアストロサイトなどは検討結果などについて計 9 項目の質問があった。これらの質問に対し、概ね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、AD バイオマーカーとして期待されるフロチリンの脳内から血液中への分泌する分子メカニズムの一端を明らかにした重要な研究報告である。よって、本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 松川 則之 副査 斎藤 貴志 飛田 秀樹