

## ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

血液神経関門と糖尿病性ニューロパチー  
—糖尿病性ニューロパチーでは血液神経関門が破綻する—

清水文崇

山口大学大学院医学系研究科神経内科学分野(神経内科学) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 血液神経関門, ペリサイト, 糖尿病性ニューロパチー, 後期糖化反応生成物

## 和文抄録

血液神経関門 (blood-nerve barrier : BNB) は末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞とペリサイトの2者のみから構成され, BNBの破綻はギランバレー症候群などの免疫性ニューロパチーや糖尿病性ニューロパチーの発症・増悪に大いに関わる。これらの難治性ニューロパチーにおけるBNB破綻の分子メカニズムを解明するために, われわれはヒト坐骨神経よりBNB由来の血管内皮細胞とペリサイトの不死化細胞株を作製し, 世界に先駆けてヒトBNB *in vitro*モデルを樹立した。このBNB *in vitro*モデルを用いて, われわれはペリサイトが分泌するbFGFとGDNFがBNB機能を高めることを明らかとし, BNBではペリサイトがバリアー機能を制御する主要なレギュレーターであることを示した。さらに, 糖尿病性ニューロパチーでは形態学的にBNBが局在する微小血管の基底膜肥厚が認められるが, その背景にどのような分子メカニズムが存在するかについて明確な答えがなかった。われわれは, 糖尿病性細小血管障害に深く関与している後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts : AGEs) が, TGF- $\beta$ やVEGFのシグナルを介してペリサイトから産生される基底膜関連分子であるフィブロネクチンとIV型コラーゲンを増加させ, 基底膜を肥厚させる方向に働くことを明らかとした。BNBの破綻・修復のメカニズムを理解することは難治性ニュー

ロパチーの治療に直結している。本稿ではわれわれが最近明らかとした「BNBが生理的条件下でどのように制御され, 病的状況下でどのように破綻するか」という命題について概説する。

## 1. 諸言

神経系にはblood-neural barrierと総称される構造物があり, この強固なバリアーシステムにより全身の免疫現象から隔絶され, 保護・コントロールされている<sup>1)</sup>。中枢神経系には血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB), 血液網膜関門 (blood-retinal barrier), 血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier) などの多数のバリアーシステムが存在し, 中枢神経系の内部環境を維持するもっとも重要なメカニズムとなっている<sup>2-4)</sup>。末梢神経系には中枢神経系におけるBBBに類似したバリアーシステムである血液神経関門 (blood-nerve barrier : BNB) が存在し, 循環血液成分の神経内膜組織への移行を阻んでいる<sup>5-7)</sup>。BNBはかつてはBBBと比較し不完全な構造物と考えられていた。しかし, 現在では末梢神経系を全身循環系から隔絶するBBBとほぼ同等の機能を持つ強固なバリアーシステムと認識されている<sup>8)</sup>。BNB破綻が発症・増悪の鍵となるヒトの疾患として, ギランバレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーなどの自己免疫性ニューロパチーや糖尿病性ニューロパチーが知られている<sup>5-7, 9)</sup>。しかし, BBBに関する知見がこの10年間で飛躍的に蓄積しているのに対して, BNBの分子機構に

関する研究成果は驚くほど少ない。本稿では、まず現時点でのBNBの解剖学的・細胞生物学的知見の概要を整理し、続いてわれわれの研究室で解明したBNB制御の分子メカニズムと糖尿病性末梢神経障害におけるBNB破綻のメカニズムについて概説する。

## 2. BNBはどこに局在し、何から構成されるか

末梢神経幹は、血管内と神経内膜組織を隔てる神経内膜内微小血管と神経周膜の最内層の2カ所に局在するBNBにより外部から隔絶され内部環境が維持されている<sup>6)</sup>。BBBは脳微小血管内皮細胞、アストロサイト、脳微小血管由来周細胞（ペリサイト）の3種類の細胞から構成される<sup>1, 3, 10)</sup>。一方で、神経内膜内微小血管に存在するBNBを構成する細胞は2種類であり、末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞（peripheral nerve microvascular endothelial cell: PnMECs）と神経内膜微小血管由来血管周細胞（ペリサイト）から構成される<sup>6, 7)</sup>。BNBでは隣接する内皮細胞はタイトジャンクションにより連結されて一層の管腔を形成し、その外側にペリサイトが不完全に覆うという構造を示しており、この2種類の細胞は共通の1枚の基底膜で覆われている（図1）<sup>5)</sup>。BNBを構成する微小血管内皮細胞は、隣接する内皮細胞間で高度に複雑で連続性のあるタイト

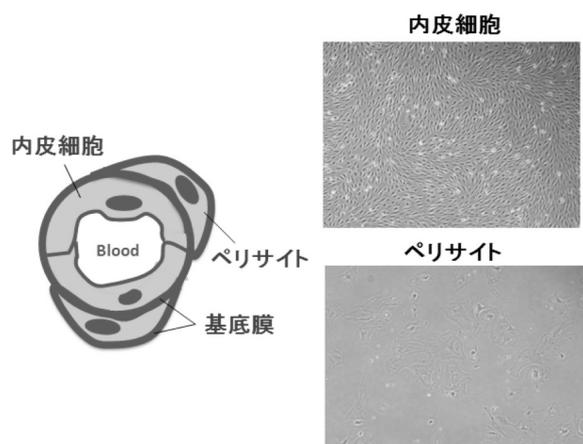


図1

BNBの基本構造を示す。隣接する内皮細胞がtight junctionによって連結されて管腔を形成し、その外側をペリサイトが不完全に覆うのが、BNBの基本構造である。この2種類の細胞は共通の基底膜によって完全に覆われている。右図にわれわれが樹立に成功したヒト末梢神経神経内膜内微小血管内皮細胞株（FH-BNB）とペリサイト細胞株を示す。

ジャンクションを形成し、各種トランスポーターやレセプターを発現することで特有の物質輸送系を有しバリアー機能を維持している。ペリサイトはBNB構成内皮細胞に極めて近接した位置関係を保っており、ペリサイトがパラクラインに放出するさまざまな液性因子が内皮細胞機能に大きな影響を与えるであろうことは容易に想像される。一方で基底膜の生化学的な詳細はわかっていない。

## 3. BNB機能の全容解明を目指したヒトBNB *in vitro* モデルの作製

われわれはBNBがどのように維持され、破綻するかを明らかとするためには、細胞生物学的知見・分子生物学的知見からのアプローチが必要であると考えた。そこで、ヒトBNB由来の*in vivo*の性状をよく把持するPnMECs、ペリサイトの不死化細胞株を樹立し、ヒト由来のBNB *in vitro*モデルの作成を試みた。ヒト剖検例より坐骨神経を摘出し、神経内膜内血管分画を採取後PnMECs、ペリサイトを単離し、温度感受性SV 40 large T抗原遺伝子およびヒトテロメラーゼ遺伝子と同じレトロウイルスベクター（pDONAI: Takara Bio）を用いてそれぞれ導入し不死化した。PnMECsは、spindle-fiber状の形態、von Willebrand factorの発現、tight junction関連分子の発現、高い電気抵抗値などバリアー構成内皮細胞の基本的属性を有していた<sup>11, 12)</sup>。ペリサイトはruffled-border状の形態、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現、PDGF- $\beta$  receptor

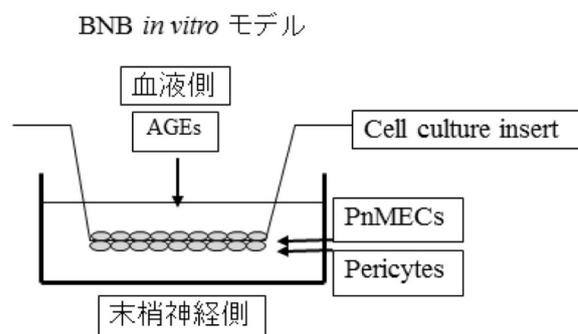


図2

Cell culture insertの底面にペリサイトを播種し、表面にPnMECsを播種しconfluentになるまで培養した。内皮細胞接着面が生体での血液側に相当し、ペリサイト接着面が末梢神経側に相当するBNB *in vitro*モデルを作成した。上面からAGEsを作用させた。

(PDGF  $\beta$  R), osteopontin, desminの発現をもって同定した<sup>13, 14</sup>). こうして, 同一ヒト由来で*in vivo*の性質をよく把持するBNB構成PnMECS (FH-BNBs)とペリサイトの不死化細胞株樹立に世界に先駆けて成功した (図2).

われわれの報告から遅れてVosefらはヒト坐骨神経由来のBNB構成血管内皮細胞株を樹立した<sup>15, 16</sup>). この細胞はSV40 large T抗原遺伝子を導入し不死化細胞株としている<sup>16</sup>). しかし, SV40 large T抗原遺伝子を導入し作成した不死化細胞株は継代を繰り返すと細胞の形態が変化し*in vivo*での生理学的, 生化学的性質を失う可能性が指摘されている<sup>17</sup>). われわれが樹立したヒトBNB構成内皮細胞株 (FH-BNBs)とペリサイト株は温度感受性SV40 large T遺伝子を用いて条件的不死化をしているため, 37°Cで培養するとSV40 large T遺伝子が不活化し不死化が解除されるという特徴を有しており, より*in vivo*での生理学的, 生化学的性質を保持した細胞株であると言える<sup>11, 14</sup>).

#### 4. BNB機能はどのようなメカニズムで維持されるか

BBBでは内皮細胞が物理的, 機能的なバリアーとして機能しているが, 生理的なバリアー機能の維

持は内皮細胞のみでは不可能であり, 内皮細胞を取り巻く細胞性, 非細胞性構成要素からの継続的な“クロストーク”が必須であると考えられている. アストロサイトが以前からBBB機能維持の主要なレギュレーターであると想定されてきたが<sup>18</sup>, 近年ペリサイトがBBB機能維持におけるもう一つの重要なレギュレーターとして注目されている<sup>19, 20</sup>). 2010年にArmulikらは, ペリサイト欠損マウスではBBB構成内皮細胞のトランスサイトシスが生じBBB透過性亢進をきたすことを報告した<sup>20</sup>).

BNBにはアストロサイトに相当する細胞は存在しないので, ペリサイトがレギュレーターとして重要な役割を担っている可能性が想定される. われわれは最近, BNB *in vitro*モデルを用いてこの仮説を証明する研究結果をえた. すなわち, (1) ペリサイトの培養上清によりBNB由来内皮細胞株の経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance: TEER)が上昇し<sup>14</sup>C標識イヌリンの透過性が減少すること (図3), (2) ペリサイトの培養上清は, BNB由来内皮細胞株に発現する重要なtight junction関連蛋白であるclaudin-5, occludinの発現を高める作用を有すること (図3), (3) ペリサイトは, BBBを構成するアストロサイトと同じく, 生理活性物質であるAngiopoietin-1 (Ang-1), vascular endothelial growth factor (VEGF),

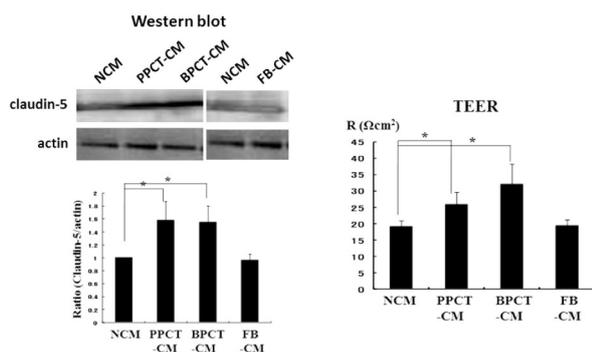


図3

ペリサイトの培養上清が, BNB由来内皮細胞株に発現する重要なtight junction関連蛋白であるclaudin-5の発現を高め (左図), BNB由来内皮細胞株の経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance: TEER) を上昇させる作用を有する (右図).

NCM, non-conditioned medium; PPCT-CM, conditioned medium of peripheral nerve pericytes; BPCT-CM, conditioned medium of brain pericytes; FB-CM, conditioned medium of fibroblasts. (文献14より改変して転載)

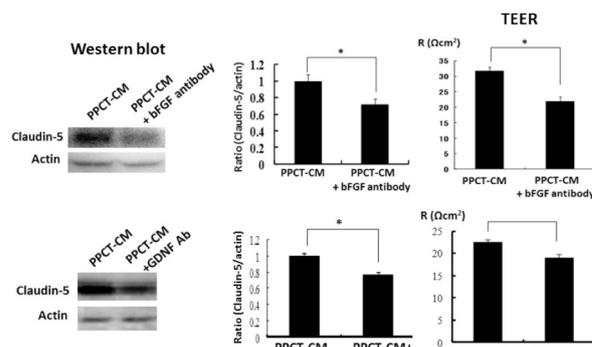


図4

ペリサイトの培養上清に含まれるbFGFやGDNFを中和抗体を用いて中和すると, BNB由来内皮細胞株のclaudin-5蛋白量が低下し (左図), 電気抵抗値 (TEER) が低下する (右図).

PPCT-CM, conditioned medium of peripheral nerve pericytes; PPCT-CM + bFGF antibody, conditioned medium of peripheral nerve pericytes pretreated with bFGF neutralizing antibody; PPCT-CM + GDNF antibody, conditioned medium of peripheral nerve pericytes pretreated with GDNF neutralizing antibody. (文献14, 21より改変して転載)

basic fibroblast growth factor (bFGF) と神経栄養因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) を分泌すること, (4) ペリサイトが分泌する Ang-1 と VEGF は内皮細胞の claudin-5 の発現を減少させ, BNB 機能を弱める方向に働くこと, (5) bFGF と GDNF は逆に claudin-5 の発現を増加させる方向に働くこと, などを明らかにした (図4)<sup>14, 21)</sup>. これらの知見より, BNB 構成内皮細胞に最も近接した細胞であるペリサイトが BNB の主要なレギュレーターであることは, ほぼ間違いのないと言える. 現在, われわれはペリサイトに働きかけ生理的に近い条件下で BNB を制御できる新規物質を同定することを目指して, さらなる解析を進めている.

#### 5. 糖尿病性末梢神経障害では BNB の破綻が生じる

2007年の厚生労働省の全国調査によると, 我が国で糖尿病が疑われる人は現在890万人, 糖尿病の可能性が否定できない人は約1,320万人とされ, あわせて約2,210万人にのぼる. この数は成人の5人に1人の割合とされており, 糖尿病がもたらす合併症は重要な問題となってきている. 糖尿病性ニューロパチーは糖尿病三大合併症のなかでも最も頻度が多い合併症である. 糖尿病性ニューロパチーは, 下肢の痛みや感覚低下, 自律神経障害, 足壊疽などの重篤な症状を示し, 糖尿病患者のQOL (quality of life) を著しく減退させ, 寿命を短くする合併症である.

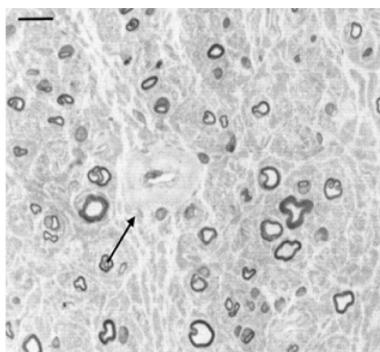


図5 糖尿病性ニューロパチー患者の生検腓腹神経の光顕像

大径有髄線維の著明な減少に加えて, 著しい神経内膜内微小血管壁の肥厚 (矢印) が認められる. エボン包埋切片トリジンブルー染色.

その重要性にも関わらず, ニューロパチーの認知度は, 網膜症や腎症, 大血管障害に比べて低く, 研究も立ち遅れてきた<sup>22)</sup>.

糖尿病性ニューロパチーの成因として糖尿病性細小血管症による微小血管障害が一因であると考えられている<sup>23-25)</sup>. 糖尿病性ニューロパチーでの BNB の形態変化については1970年代後半から, 内皮細胞の過形成, 内皮細胞のタイトジャンクションの解離, 微小血管の閉塞, 微小血管内皮細胞の有窓化, 神経内膜微小血管の基底膜の肥厚や重複, 微小血管構成内皮細胞とペリサイトの変性など, さまざまな報告がなされている<sup>23-25)</sup>. これら全てが糖尿病性ニューロパチーでの BNB 破綻を示唆する形態学的所見であると考えられるが, 微小血管基底膜の肥厚や重複を除くと極めて軽微な変化にとどまる (図5). 微小血管での基底膜肥厚の背景にどのような分子メカニズムが存在するかについて明確な答えがない.

#### 6. 後期糖化反応生成物 (AGEs) は BNB を破綻させる

後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts: AGEs) は持続的な高血糖状態で加速度的に生成され, 腎症, 網膜症, 認知症などの糖尿病性細小血管障害に深く関与していることが知られている<sup>26, 27)</sup>. 糖尿病性ニューロパチーでは AGEs は末梢神経のシュワン細胞や軸索, および BNB 構成細胞である PnMECs, ペリサイト, 基底膜に蓄積することが知られており<sup>28)</sup>, 糖尿病性ニューロパチ

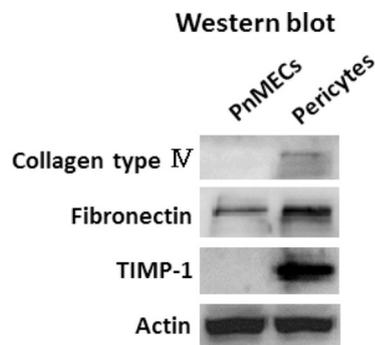


図6

BNB由来内皮細胞株とペリサイトの基底膜関連分子の発現をウェスタンブロット法で比較した. Collagen type IV や Fibronectin など基底膜を構成する蛋白と TIMP-1 など基底膜分解を制御する蛋白は主にペリサイトから産生される. (文献31より改変して転載)

一の進展においてもAGEsの関与が想定される。糖尿病性腎症では糸球体基底膜の肥厚が認められるが、その機序としてAGEsによりメサンギウム細胞がTGF- $\beta$ を放出し基底膜構成成分であるCollagen type IVの産生を増加させることが重要であると考えられている<sup>29)</sup>。糖尿病性網膜症では網膜血管にAGEsが蓄積するが、AGEs蓄積に伴いVEGFの発現が亢進し血液網膜関門が破綻し網膜内微小血管の透過性亢進が生じることが知られている<sup>30)</sup>。したがって、糖尿病性末梢神経障害でのAGEsによるBNBの破綻についてもTGF- $\beta$ 、VEGFの関与が推測されるが、その分子メカニズムについては現在のところ明確な解答がえられていない。この理由としてBNB破綻の詳細な分子メカニズムを解明するためにはすぐれたヒトBNB *in vitro*モデルを構築する必要があるが、技術面の困難さからこれまで樹立がなされていなかったことが主因であった。

われわれは最近、ヒトBNB由来内皮細胞とペリサイトの不活化細胞株を用いて、糖尿病性ニューロパチーでの基底膜制御の分子メカニズムとAGEsのBNBに対する影響に関する研究を報告した。まず、フィブロネクチンやIV型コラーゲンなど基底膜を構成する蛋白と基底膜の分解を阻害する分子である

TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloprotease-1) は主にペリサイトから放出され、BNBでの基底膜の形成は主にペリサイトが行っていることを示した(図6)。次に、(1) Advanced glycation endproducts (AGEs) はBNB構成内皮細胞がautocrineに分泌するVEGFを増加させることで、BNB構成内皮細胞のclaudin-5量を減少させ、BNBを破綻させる方向に働くこと、(2) AGEsはペリサイト自身がautocrineに分泌するVEGFとTGF- $\beta$ を増加させ、このことによりフィブロネクチン、IV型コラーゲンを大量に産生し基底膜を肥厚させる方向に働くこと、などを明らかとした(図7)。このことから、糖尿病性ニューロパチーでの微小血管基底膜肥厚の主役はペリサイトであるという結論がえられ、AGEsがVEGFやTGF- $\beta$ シグナルを介してその引き金を引く物質である可能性が示唆された<sup>31)</sup>。現在、われわれは糖尿病性ニューロパチーにおけるBNB破綻を修復させる物質の候補のスクリーニングをBNB *in vitro*モデルを用いて進めている。

## 7. おわりに

BNBの生理学的・解剖学的知見は1980年頃までに十分解明されてきたが、細胞生物学的・分子生物学的研究は諸についたばかりである。BNBの破綻・修復のメカニズムを知ることは糖尿病性ニューロパチーや免疫性ニューロパチーの治療に直結しており、常に考慮の対象となるべき重要な課題である。われわれが樹立したヒトBNB由来不活化細胞株が今後のBNB研究の起爆剤となることが期待される。われわれの研究によるBNB破綻に関する分子細胞学的知見の蓄積がこれらの難治性ニューロパチーの新規治療法開発につながる日を祈念したい。

稿を終えるにあたり、長年にわたり臨床・研究ともに丁寧な御指導を頂き、研究を継続する意義と面白さを教えて頂いた神田 隆先生(山口大学大学院医学系研究科脳神経病態学神経内科教授)、研究を始めた当初から御指導頂いた佐野泰照先生(山口大学大学院医学系研究科脳神経病態学神経内科助教)、ともにヒトBNB由来細胞樹立に勤しんだ安部真彰先生(山口大学医学部地域医療推進学講座助教)に深謝致します。

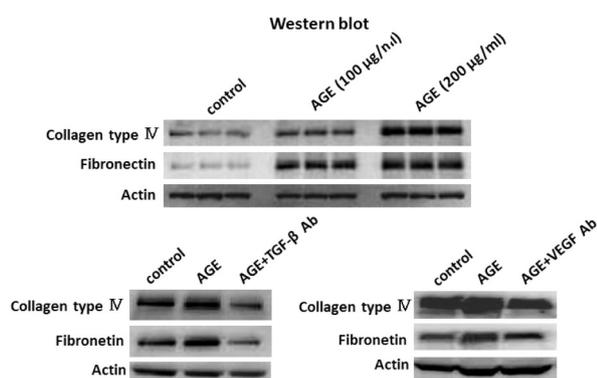


図7

AGEsはペリサイトから産生されるCollagen type IVやFibronectinの発現を増加させる(上図)。AGEsに併せてTGF- $\beta$ やVEGFの中和抗体を作用させると、ペリサイトから産生されるCollagen type IVとFibronectinの発現がリパースされる(下図)。

control, conditioned medium of unmodified BSA; AGE, conditioned medium of AGEs-BSA; AGE+TGF- $\beta$  Ab, conditioned medium of AGEs-BSA pre-treated with TGF- $\beta$  neutralizing antibody; AGE+VEGF Ab, conditioned medium of AGEs-BSA pre-treated with VEGF neutralizing antibody. (文献31より改変して転載)

## 引用文献

- 1) 神田 隆. 序 - 血液脳関門の基礎知識. *Brain Nerve* 2013 ; 65 : 117-120.
- 2) Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008 ; 57 : 178-201.
- 3) 清水文崇, 神田 隆. 血液脳関門と神経免疫疾患. *Brain and Nerve* 2013 ; 65 : 165-176.
- 4) Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012 ; 83 (3) : 288-297.
- 5) 神田 隆. 血液神経関門update. *Brain and Nerve* 2011 ; 63 : 557-569.
- 6) Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013 ; 84 : 208-212.
- 7) 清水文崇, 神田 隆. 血液神経関門と自己免疫性ニューロパチー. *Peripheral nerve* 2013 ; 24 : 54-62.
- 8) Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 5705-5709.
- 9) 清水文崇, 安部真彰, 神田 隆. 糖尿病性末梢神経障害の病態解明に向けたヒト血液神経関門 *in vitro*モデルの作製. *Peripheral nerve* 2011 ; 22 : 57-63.
- 10) Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 2010 ; 225 : 519-528.
- 11) Abe M, Sano Y, Maeda T, Shimizu F, et al. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines : a new *in vitro* blood-nerve barrier (BNB) model. *Cell Struct Funct* 2012 ; 37 : 89-100.
- 12) Sano Y, Shimizu F, Maeda T, Abe M, et al. Establishment of conditionally immortalized *in vitro* BNB models. *Cell Struct Funct* 2007 ; 32 : 139-147.
- 13) Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, et al. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol* 2008 ; 217 : 388-399.
- 14) Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, et al. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 2011 ; 226 : 255-266.
- 15) Yosef N, Xia RH, Ubogu EE. Development and characterization of a novel human *in vitro* blood-nerve barrier model using primary endoneurial endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010 ; 69 : 82-97.
- 16) Yosef N, Ubogu EE. An immortalized human blood-nerve barrier endothelial cell line for *in vitro* permeability studies. *Cell Mol Neurobiol* 2013 ; 33 : 175-186.
- 17) Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier : chemokine regulation and *in vitro* models. *Immunol Rev* 2012 ; 248 : 228-239.
- 18) Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006 ; 7 : 41-53.
- 19) Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997 ; 277 : 242-245.
- 20) Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010 ; 468 : 557-561.
- 21) Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe M, Maeda T,

- Haruki H, Kanda T. Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res* 2012 ; **37** : 401-409.
- 22) 八木橋操六. 糖尿病性ニューロパチーの臨床と研究の進歩. *Brain and Nerve* 2011 ; **63** : 571-582.
- 23) Giannini G, Giannini C, Dyck PJ, et al. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 1995 ; **37** : 498-504.
- 24) 神田 隆. 糖尿病性神経障害の病理. *日本臨床* 2005 ; **63** : 482-487.
- 25) Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. *Med Clin North Am* 2004 ; **88** : 947-999.
- 26) Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins) : an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; **94** : 6474-6479.
- 27) Shimizu F, Sano Y, Kanda T. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of TGF- $\beta$  by pericytes and VEGF and MMP-2 by endothelial cells *in vitro*. *Neurobiol aging* 2013 ; **34** : 1902-1912.
- 28) Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2005 ; **1043** : 598-604.
- 29) Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol* 2003 ; **200** : 537-546.
- 30) Canning P, Glenn JV, Hsu DK, et al. Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. *Exp Diabetes Res* 2007 ; 51837.
- 31) Shimizu F, Sano Y, Haruki H, Kanda T.

Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- $\beta$  and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia* 2011 ; **54** : 1517-1526.

## The Blood-nerve Barrier Breakdown and the Diabetic Neuropathy

Fumitaka SHIMIZU

Department of Neurology (Neurology), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

### SUMMARY

It is important to understand the cellular properties of endoneurial microvascular endothelial cells and pericytes which constitute blood-nerve barrier (BNB), since this barrier structure in the peripheral nervous system (PNS) may play pivotal pathophysiological roles in various PNS disorders including inflammatory neuropathy and diabetic neuropathy. However, in contrast to blood-brain barrier (BBB), very few studies have been directed to BNB and no adequate cell lines originating from BNB had been launched. We successfully established human immortalized cell lines originating from BNB using temperature-sensitive SV40 large T antigen and the cellular properties of human cell lines are demonstrated in this manuscript. The humoral factors including bFGF and GDNF secreted by pericytes strengthened the barrier properties of PnMECs, suggesting that in the PNS, peripheral nerve pericytes support the BNB function and play the same role of astrocytes in the BBB. Furthermore, AGEs increased the expression of basement membrane molecules

including fibronectin and collagen type IV in pericytes via TGF- $\beta$  and VEGF signaling. Further accumulation of the knowledge

concerning the cellular properties of BNB-forming cells will open the door to novel therapeutic strategies for diabetic neuropathy.