

**Establishment of a new conditionally
immortalized human skeletal muscle
microvascular endothelial cell line**

(新たな条件的不死化ヒト骨格筋微小血管内皮
細胞株の確立)

申請者氏名：佐野 宏徳

申請者所属：山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻 神経内科学分野

作成年月：平成 29 年 12 月

1.	要旨	3
2.	研究の背景	4
3.	目的	5
4.	方法	5
5.	結果	12
6.	考察	20
7.	結語	23
8.	謝辞	23
9.	参考文献	23

要旨

骨格筋では筋内鞘に存在する微小血管を構成する内皮細胞どうしはタイトジャンクション (tight junction: TJ) を介して密着しており, 血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) や血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) を構成する内皮細胞と類似の生物学的・生化学的性質を有すると想定される. BBB や BNB の領域では多くの知見が明らかとなっているにも関わらず, 骨格筋の筋内鞘に存在する微小血管の TJ の詳細については十分には理解されていないのが現状である. その要因のうちのひとつに, 優れたヒト骨格筋由来の微小血管 *in vitro* モデルが存在していないことが挙げられる. そこで我々はヒト筋微小血管の生物学的, 生化学的な特性を理解する目的でヒト骨格筋微小血管内皮細胞株の作成を試みた. ヒト骨格筋から骨格筋微小血管内皮細胞を単離し, 温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子及びヒトテロメラーゼ遺伝子導入した. TSM15 と名付けたこの細胞株はバリア構成内皮細胞の特徴である紡錘形の形態を示し, von Willebrand 因子や VE カドヘリンといった血管内皮細胞マーカーを発現していた. また, TSM15 は 33℃で 40 回以上の継代に耐え, 37℃では増殖を停止し温度感受性を有していた. さらに, 本細胞株は occludin, claudin-5, ZO-1 などの TJ 関連蛋白や Mdr1, ABCG2, GLUT-1 などのトランスポーターを発現しており, ヒト BBB 由来内皮細胞株と同等の電気抵抗値, すなわちバリア機能を有していた. 今回樹立した TSM15 はヒト骨格筋微小血管内皮細胞の生化学的かつ生物学的な特性の理解に役立つだけでなく, 皮膚筋炎をはじめとする多くの筋疾患の病態解明に役立つツールとなることが期待される.

研究の背景

血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) は脳・脊髄で構成される中枢神経系の内部環境を維持する上できわめて重要な役割を担っていることは広く知られている (Engelhardt and Sorokin, 2009; Sano and Kanda., 2013; Maeda et al., 2013). 同様のバリアは末梢神経系にも存在し, 血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) と呼ばれている (Poduslo et al., 1994; Kanda T, 2013). 中枢神経系や末梢神経系のバリアの本体は特殊な構造と機能を持つ微小血管内皮細胞そのものであり, タイトジャンクション (tight junction: TJ) により低い透過性が保たれている.

骨格筋の筋内鞘内の微小血管にも脳・神経系のバリアと同様の構造をしたタイトジャンクションがある一方, BBB や BNB を構成する微小血管に比し HRP をはじめとした基質の透過性が高いことが報告されている (Kennedy and Yoon, 1979; Sarin, 2010). BBB や BNB の TJ はこれまで多くの研究がなされてきたが, 骨格筋微小血管の TJ をはじめとするバリア機能に関する研究はほとんど行われてこなかった. 骨格筋微小血管内皮細胞 (skeletal muscle microvascular endothelial cells: SMMECs) は骨格筋の微小血管の本体であるため, SMMECs を用いた *in vitro* の研究は骨格筋の微小血管の生理学的・生物学的機能をよりよく理解するためにとっても役立つものと思われる. 過去にラットやマウスなどの動物由来の SMMECs の単離を達成した研究はいくつかみられるが (Le et al., 2014; Han et al., 2003), ヒト SMMECs の細胞株を樹立した報告はない.

一般的にバリア構成内皮細胞は数代の継代で増殖能力を失うことが多く, 安定した実験データを得るためには, *in vitro* の BBB や BNB モデルのほとんどで不死化遺伝子を用いた細胞の株化が行われている (Muruganandam et al., 1997; Kusch-Poddar et al., 2005; Ketabi-Kiyanvash et al., 2007). しかしながら, 不死化内皮細胞株はしばしば腫瘍細胞の特性を獲得し, *in vivo* で元々みられていた形態学的, 生理学的な特性を失うことが多い.

最近、われわれは温度感受性ラージ T 抗原 (tsA58) 及びヒトテロメラーゼ catalytic subunit 遺伝子 (hTERT) を導入したヒト BBB および BNB 由来の新しい内皮細胞株を樹立した (Maeda et al., 2013; Sano et al., 2010, 2012; Abe et al., 2012) . これらのバリア構成内皮細胞株は従来の細胞株に比べ *in vivo* のバリア構成内皮細胞の機能をよりよく保持していることが示されている (Maeda et al., 2013; Sano et al., 2010, 2012; Abe et al., 2012). 温度感受性内皮細胞株は, 33°C の条件下で培養すると tsA58 抗原が機能することで細胞の増殖がおり, 37°C の条件下にすると tsA58 が不活化するため増殖を停止し生理的な機能を発揮するようになる.

目的

温度感受性条件的不死化ヒト SMMEC 株を樹立し, 筋微小血管の細胞生物学的特性を明らかにするとともに, 樹立した内皮細胞株が皮膚筋炎などの難治性筋疾患の研究に利用できる特性を持つか否かも検証することを目的とした.

材料・方法

1. 抗体

免疫染色の一次抗体の anti-zonula occludens 1 (ZO-1) polyclonal IgG , rabbit anti-claudin-5 polyclonal IgG および二次抗体の FITC-conjugated anti-rabbit IgG は Invitrogen 社 (San Francisco, CA, USA) から購入した. 一次抗体の rabbit anti-occludin polyclonal IgG は Sigma 社 (St.Louis, MO, USA) から購入した. Goat anti-VE-cadherin, rabbit anti- β -tubulin, rabbit anti-glucose transporter 1 (GLUT-1) IgG は Santa Cruz Biotechnologies 社 (Santa Cruz, CA, USA) から, rabbit anti-human von Willbrand factor (vWF) IgG は Abcam 社 (Cambridge,UK) から入手した. Mouse anti-SV40 T antigen IgG は Calbiochem 社 (Darmstadt,Germany) から, rabbit anti-human telomerase catalytic subunit IgG

は Rockland Immunochemicals 社 (Gilbertsville, PA, USA) から購入した。

2. 培地

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) は Sigma 社 (Saint Louis, Missouri, U.S.A.) より購入し、抗生物質はペニシリン (100 U/ml, Sigma, Saint Louis, Missouri, U.S.A.), ストレプトマイシン (100 µl/ml, Sigma), アンホテリシン B (25 ng/ml, Invitrogen, Grand Island, New York, U.S.A.) を添加し、FBS (Highclone, Logan, Utah, U.S.A.) を 10% になるように調整したものを dissection 培地 (dissection medium: DM) とした。EBM-2 培地 (Cambrex, Walkersville, Maryland, U.S.A.) に添加因子である EGM-2 MV (Cambrex) を加え、FBS (Highclone, Logan, Utah, U.S.A.) を 20% になるように添加し、抗生物質としてペニシリン (100 U/ml, Sigma), ストレプトマイシン (100 µl/ml, Sigma), アンホテリシン B (25 ng/ml, Invitrogen) の 3 者を各々の最終濃度になるよう添加したものを内皮細胞培地 (Endothelial medium: EM) とした。

3. ヒト筋微小血管内皮細胞株の樹立

本研究はヘルシンキ宣言に基づき計画され、山口大附属病院倫理委員会で承認を受けたのちに研究を開始した。また、遺伝子組み換え操作については山口大学組み換え DNA 実験安全委員会で承認を得ている。髄膜癌腫症で死亡した 57 歳女性例の剖検時に家族から文書で同意を得たのちに右上腕二頭筋から筋組織を採取した。8mm × 5mm × 5mm 程度の大きさの筋組織片を作成し、実体顕微鏡下にて粗大な血管を鋭利なピンセットですべて除去した。その後可能な限り細い筋線維束として引き裂いていき、目に見える細動静脈レベルの血管を丁寧に剥離した。すべての筋線維束を十分に観察し、実体顕微鏡下で見える粗大血管がないことを確認した後、滅菌済の剃刀刃で残った筋線維束を mince した。細切した組織を 0.25% type I コラゲナーゼで 2 時間消化した。デキストラン溶液 (32% 濃度になるよう DM で調整) で遠沈 (800g, 5 分)・洗浄後、更に遠心

分離 (4500g, 15 分, 4℃) した。DM で再度遠沈・洗浄後に, EM を加えコラーゲンを塗布した dish に播種した。37℃ (5%CO₂, 95%大気下) 培養で内皮細胞 (endothelial cells: ECs) のコロニーが散見された時点で tsA58 および hTERT の cDNA を保持したレトロウイルスを感染させた (Sano et al., 2010, 2012)。以後は 33℃での培養を継続した。ECs が成長すると同様に, ペリサイト, 平滑筋細胞, 線維芽細胞などの非 EC 細胞も徐々に dish を占有するようになるため, これらの非 EC 細胞は滅菌されたゴム製のヘラで機械的に剥離し取り除いた。取り除かれて浮遊している細胞を吸引し, dish を 1xHanks' balanced solution (HBSS, Invitrogen) で 3 回洗浄した。EC が数百の細胞で構成するコロニーを形成した時, クローニングカップを用いて EC 群をトリプシン EDTA (Sigma) で拾い上げ, 別の dish に播種した。拾い上げる前には 100%の EC から成るコロニーであるように見えても, ごく少数の非 EC が継代後の内皮細胞のコロニーの周辺に見受けられることがあることから, 通算 3 回のクローニング操作を行い, 100%の純度を有する内皮細胞群の分離を目指した。結果, 3 つの純粋な EC クローンを単離した。これらの 3 つのクローンのうち, バリア構成内皮細胞に特有の紡錘形の形態を示し, TJ 構成蛋白を発現しているクローンをヒト骨格筋微小血管内皮細胞 (human skeletal muscle microvascular endothelial cell: HSMMECs) 株とし, TSM15 と命名した。樹立した TSM15 がバリア機能を保持するか否かを検討するための control 細胞株として温度感受性ヒト脳微小血管内皮細胞株である TY10 株 (Maeda et al., 2013) を用いた。

4. 細胞増殖速度の検討

TSM15 の倍加時間を決定するために, 5.0×10^4 の TSM15 細胞をタイプ I コラーゲンコートした 35mm ディッシュに播種し, 33℃と 37℃で培養した。所定時間を経過した後, 細胞をトリプシンで浮遊させ, 血球計算盤で測定した。

5. 免疫細胞化学

TSM15 (1×10^6) をコラーゲンコートした 35mm ディッシュ (Becton Dickson) に播種し 33°C でコンフルエントになるまで培養した。PBS で 3 回洗浄後, SV40 large T antigen, hTERT, vWF, VE-cadherin の免疫染色では, 4%パラホルムアルデヒド (Wako, Osaka, Japan) で室温にて 15 分間固定した。0.1%TritonX-100 (Sigma) で 10 分間常温処理した後, PBS で洗浄し, 3% FBS (Fetal Bovine Serum) /PBS により常温で 30 分間ブロッキングした。Claudin-5 と ZO-1 の免疫染色では, 培養細胞を 100%エタノールにて 4°C で 30 分間固定した。PBS で洗浄し 0.5%TritonX-100 で 30 分間常温処理した後, 再度 PBS で洗浄し, 染色前に 0.1%FBS にて常温で 20 分間ブロッキングした。各々のブロッキング処理後, 一次抗体 (1:50) を 4°C で一晩反応させた。PBS にて洗浄後 FITC で標識された二次抗体を 1%FBS/PBS にて 1:200 で希釈し常温で 1 時間反応させ, PBS で洗浄後に蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。VE-cadherin と vWF の免疫染色では共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (ZEISS, Jena, Germany) で観察した。

6. ウェスタンブロッティング

培養細胞は cell lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.4) , 50mM EDTA, and 0.5% NP, 150mM NaCl に調整した溶液 10mL に protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Basel, Schweiz) を 1 錠加えたもの) 用いセルスクレイパーで回収した。超音波破碎を施行後, 4°C , 14000rpm で 5 分間遠心分離を行い, 上清 (蛋白) を回収した。20 μ g の蛋白を等量の Lamlli サンプルバッファー (BIO-RAD, Hercules, California, U.S.A.) と混ぜ, 10% SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, polyvinyliden difluoride membrane へ転写した。Blocking buffer (0.5% Tween 20 に調整した PBS (PBS-T) , 5% スキムミルク) にて室温で 10 分間ブロッキングした後, 一次抗体を 50 倍に希釈し室温で 1 時間作用させた。続いて 1000 倍に希釈した 2 次抗体を室温で 1 時間作用させた。Membrane を PBS-T で

洗ったのち、chemiluminescence detection (ECL-Advance, Amersham, UK) でバンドを検出した。

7. 経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance; TEER) 測定

Transwell inserts (pore size 0.4 μ m, effective growth area 0.3 cm², BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, U.S.A) に rat-tail collagen type-I (BD Bioscience) を塗布した上に、1.0 \times 10⁴cells/insert の培養細胞を播き、33 $^{\circ}$ C で約 2 日間培養しコンフルエントとなった後に、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 6 時間培養した。その後、Millicell electrical resistance apparatus (Endohm-6 and EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, U, S, A) を用いて電気抵抗値を測定した。

8. 透過性試験

TSM15 株と TY10 株をコラーゲンコート済みの 24 well プレート用のセルカルチャーインサート (孔径 0.4 μ m) の表面に 1.0 \times 10⁴ cells/insert の密度で播種し、コンフルエントになるまで培養した。続いて、1300 μ l の培養液 (EBM-2) を 24well プレートの well の下層に入れ、500 μ l の 10kDa 蛍光標識デキストラン (Sigma; 0.5mg/ml) を含んだ培養液 (EBM-2) を、内皮細胞層を有するセルカルチャーインサートの上層に加え、37 $^{\circ}$ C で培養を開始した。培養開始から 15 分、30 分、45 分、60 分の各時点で上層と下層から抽出した 20 μ l のサンプルをマイクロプレートリーダー FlexStation 3 (Molecular Devices, CA, USA) で測定した。蛍光標識デキストランのクリアランスは次のように測定した。 Cd (μ l) = $VL \times CL / CU$ で VL は 1 μ l 中の下層のコンパートメントの用量、 CL は下層の蛍光標識デキストランの蛍光度、 CU は上層の蛍光標識デキストランの蛍光度である。得られた cleared volume を時間軸に対してプロットし、直線回帰することで傾きを求め

た。傾きは透過係数 (permeability surface area product : PS) を表す。各内皮細胞を介した透過クリアランス (PeS) は次式を用いて算出した。

$$1/PeS = 1/P_{total}S - 1/P_{filter}S$$

$P_{total}S$ は細胞を培養したセルカルチャーインサートの透過クリアランス, $P_{filter}S$ は細胞を培養していないインサートの透過クリアランスをそれぞれ示す。PeS を用いたインサートの表面積 (0.3 cm^2) を除すことで膜透過係数 (permeability coefficient) となる。

9. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

TSM15 をコンフルエントになるまで培養した後、細胞を PBS で 3 回洗浄した。TSM15 の Total RNA は RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。200ng の total RNA から StrataScript First Strand Synthesis System (STRATAGENE®, Cedar Creek, Texas, U.S.A.) と TAKARA PCR Thermal Cycler Dice (TakaRa) を用い、Single-stranded cDNA を合成した。Quantitative real-time PCR 解析は FullVelocity SYBR Green QPCR Master MIX (STRATAGENE®) を用い、Stratagene's Mx3005P (STRATAGENE®) で増幅し (95°C for 10 min, then at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min for 40 cycles), MxPro™ (STRATAGENE®) を用い G3PDH で補正し相対的な定量を行った。特異的なプライマーは以下の通りである。

claudin-5 :

forward primer (5'-CTG TTT CCA TAG GCA GAG CG-3) ,

reverse primer (5'-AAG CAG ATT CTT AGC CTT CC-3')

occludin :

forward primer (5'-TGG GAG TGA ACC CAA CTG CT-3' ,

reverse primer (5'-CTT CAG GAA CCG GCG TGG AT-3')

ZO-1 :

forward primer (5'-CATAGAATAGACTCCCCTGG-3'),

reverse primer (5'-GCTTGAGGACTCGTATCTGT -3')

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) :

forward primer (5'-GTC AAC GGA TTT GGT CTG TAT T-3'),

reverse primer (5'-AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT-3')

Mdr1 :

forward primer (5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT-3'),

reverse primer (5'-CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT-3')

ABCG2 :

forward primer (5'-TGGCTGTCATGGCTTCAGTA-3'),

reverse primer (5'-GCCACGTGATTCTTCCACAA-3')

GLUT-1 :

forward primer (5'-TGTCCTATCTGAGCATCGTG-3'),

reverse primer (5'-CTCCTCGGGTGTCTTATCAC-3')

Conventional な RT-PCR では上記のプライマーを用いて増幅 (反応条件 94℃ 5 分 →94℃1 分, 55-60℃ 1 分, 72℃ 1 分を 40 サイクル) し, 0.5μg/ml のエチジウムブロマイドを含む 2%アガロースゲルを用い電気泳動し分離した. PCR 増幅産物の増幅サイズを 50bp DNA ladder (O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Burlington, Canada) と比較し計測した. 各々の増幅産物は, 我々が以前報告した予想サイズと一致した (Sano et al., 2010) .

10. 免疫組織化学

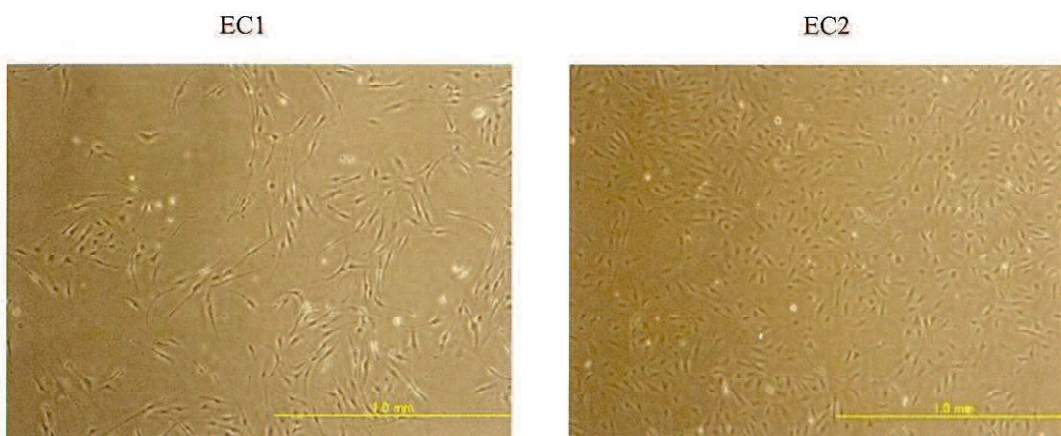
家族から同意を得た後, 剖検時に筋萎縮性側索硬化症の男性の右上腕二頭筋から筋組織を採取した. 筋組織はイソペンタン/液体窒素に浸して凍結させた後, クリオスタッ

トで 10 μ m に薄切し，ポリ-L-リジンコートスライドグラスに載せ風乾した．4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し，PBS で洗浄後，3.0% H_2O_2 加メタノールに常温で 10 分間浸透させ，内因性ペルオキシダーゼ (POD) 除去を行った．PBS で洗浄後，10%ヤギ血清でブロッキングを行った後，PBS で希釈した一次抗体 (ラビット抗 claudin-5 (1:50)，ZO-1 (1:100)，GLUT-1 (1:100)，vWF (1:500) IgG) を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた．PBS で洗浄後，二次抗体 (HRP 標識抗ラビット IgG (Nichrei,Tokyo,Japan)) を室温で 60 分間反応させた．洗浄後，免疫組織化学染色試薬ヒストファイン (DAB (3,3'-diaminobenzi-dine) [Nichrei,Tokyo,Japan]) に曝露させ，光学顕微鏡下で観察した．

結果

1. TSM15 株の確立

ヒト骨格筋から HSMMECs の候補となりうる 3 つの内皮細胞のクローンを得た (Fig. 1)．これらのクローン EC1-3 のうち，EC1 だけがバリア構成内皮細胞の特徴である紡錘状の形態を呈していた (Sano et al., 2010, 2012; Abe et al., 2012; Hosoya et al., 2000)．更に EC1 のみが TJ を維持する上で最も重要な蛋白として広く知られている claudin-5 (Sano and Kanda, 2013) を cell-to-cell boundary に発現してことを免疫染色で確認した (data not shown)．したがって，EC1 を TJ を有する骨格筋微小血管に由来する内皮細胞株と考え「TSM15」と命名した．



EC3

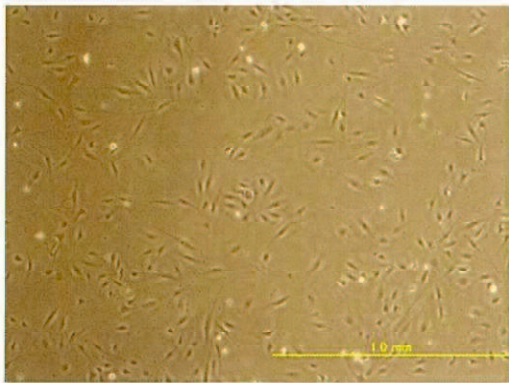
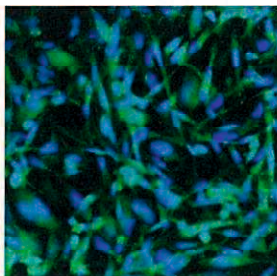


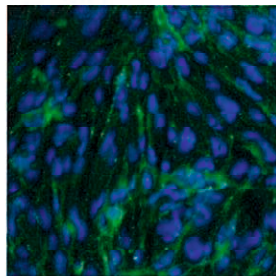
Fig. 1. HSMMECs の候補となりそうな 3 つの内皮細胞のクローン (EC1-3) の中で, EC1 だけがバリア構成内皮細胞株の特徴である紡錘状の形態を呈していた. EC2 と EC3 は敷石状の形態を呈していた. スケールバー : 1mm

TSM15 は血管内皮細胞マーカーである VE-カドヘリンや vWF を発現しており (Fig. 2A, B), ヒト脳微小血管内皮細胞株である TY10 と同様に不死化温度である 33°C 下においてもコンフルエント後も重なり合うことなく contact inhibition を示した (Fig. 2D). 重要なことに, TSM15 は 33°C 培養下で 40 世代以上, 安定的に紡錘状の形態を保ち, コンフルエント後に contact inhibition を示した (Fig. 2E). また, TSM15 が tsA58 遺伝子や hTERT 遺伝子を獲得したことを免疫組織化学で確認した (Fig. 3A, B).

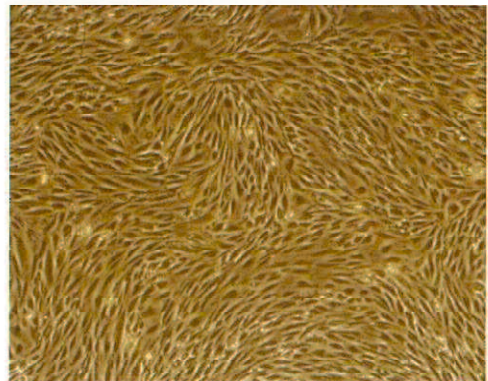
A TSM15 (Passage 8)



B TSM15 (Passage 15)



C TY10 (Passage 15)



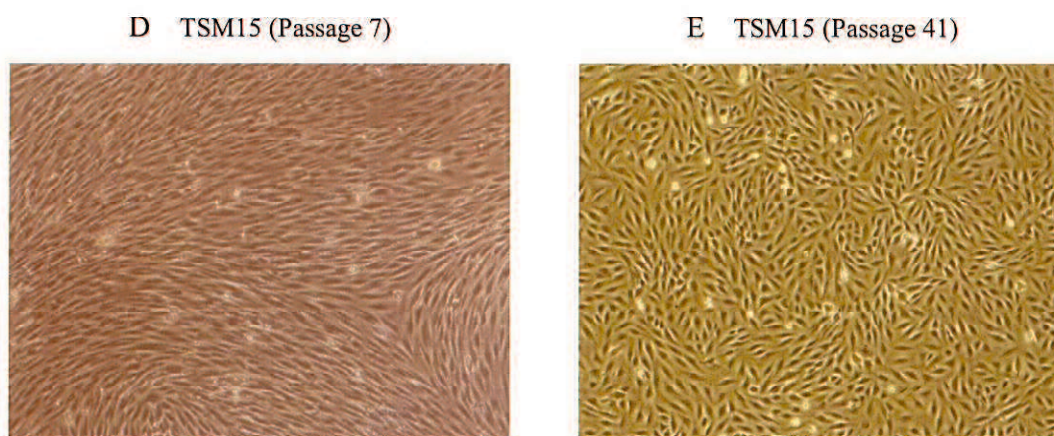
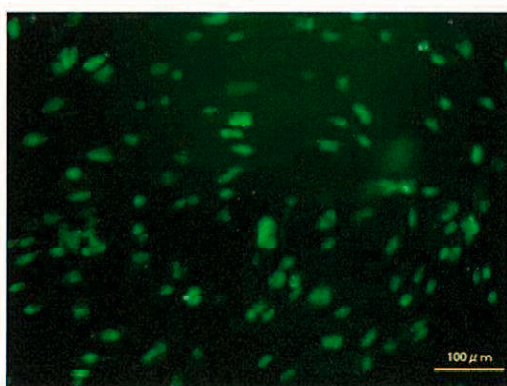


Fig. 2. TSM15 の内皮細胞マーカー発現とバリア構成内皮細胞としての形態.

A : 免疫染色ですべての細胞が抗 vWF 抗体で染色された. B : TSM15 は VE-カドヘリンを細胞境界に発現していた. C : ヒト脳微小血管内皮細胞株である TY10 は位相差顕微鏡で紡錘状の形態を呈し, contact inhibition を示した. D:TSM15 (7 代目) も位相差顕微鏡で紡錘状の形態を呈し, contact inhibition を示した. E : TSM15 は 41 回の継代下でも 33°C で安定的に紡錘状の形態を維持し, コンフルエント後に contact inhibition を示した.

A Expression of tsA58 protein in TSM15



B. Expression of hTERT protein in TSM15

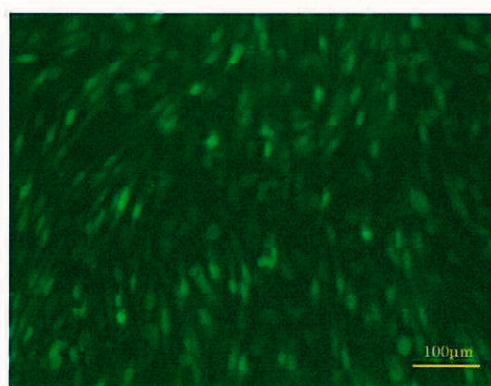


Fig. 3. 抗 SV40T 抗原抗体 (A) および抗 h-TERT 抗体 (B) を用いた TSM15 の免疫染色. TSM15 細胞で tsA58 蛋白 (A) や hTERT 蛋白 (B) の核内分布がみられた.

スケールバー：100 μm .

2. TSM15 の温度感受性

TSM15 は増殖温度である 33°C では倍加時間約 4 日で増殖した (Fig.4). 33°C から 37°C にした 1 日後には細胞増殖は停止した (Fig.4). すなわち, TSM15 は温度感受性遺伝子 *tsA58* の獲得により, 温度依存性の増殖を示すことが確認できた.

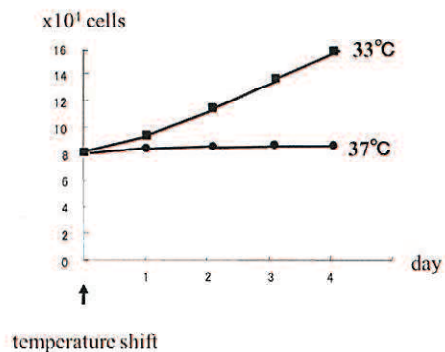


Fig. 4. TSM15 の温度感受性. TSM15 は培養条件 33°C では約 4 日で倍に増殖する. 培養条件を 33°C から 37°C に変更すると約 1 日後には細胞増殖が停止する.

3. TSM15 の TJ 関連分子の発現とバリア機能

TSM15 細胞株の TJ 関連分子の mRNA 発現を調べるために, 細胞から total RNA を分離し, リアルタイム PCR 解析を行った. TSM15 細胞株はヒト脳微小血管内皮細胞株である TY10 と同様に, *occludin*, *claudin-5*, *ZO-1* など TJ 関連分子を発現していた (Fig.5A-C). これらの結果は, ゲル電気泳動法を用いた conventional な RT-PCR でも確かめられた (Fig.5D). また, TSM15 は *claudin-5* や *occludin* を蛋白レベルでも発現していることをウエスタンブロット法により確認した (Fig.5E). さらに, 免疫細胞化学的手法を用いた解析でタイトジャンクション蛋白の局在を確認した. TY10 と同様に TSM15 では *claudin-5* や *ZO-1* は隣接する細胞同士の境界に局在していた (Fig.6A-D).

続いて、TSM15 のバリア機能を評価する目的で経内皮細胞電気抵抗 (TEER) を測定した。結果、TSM15 は TY10 と同程度の TEER 値を示した (Fig.7)。10kDa FITC デキストランの透過性によるバリア機能の評価では、TSM15 の透過係数 (Pe) は 1.78×10^{-4} cm/min である一方、TY10 が 1.35×10^{-4} cm/min であり統計学的な有意差は認められなかった。以上より、TSM15 はタイトジャンクション蛋白を発現し、TY10 と同等のバリア機能を有していることが明らかになった。

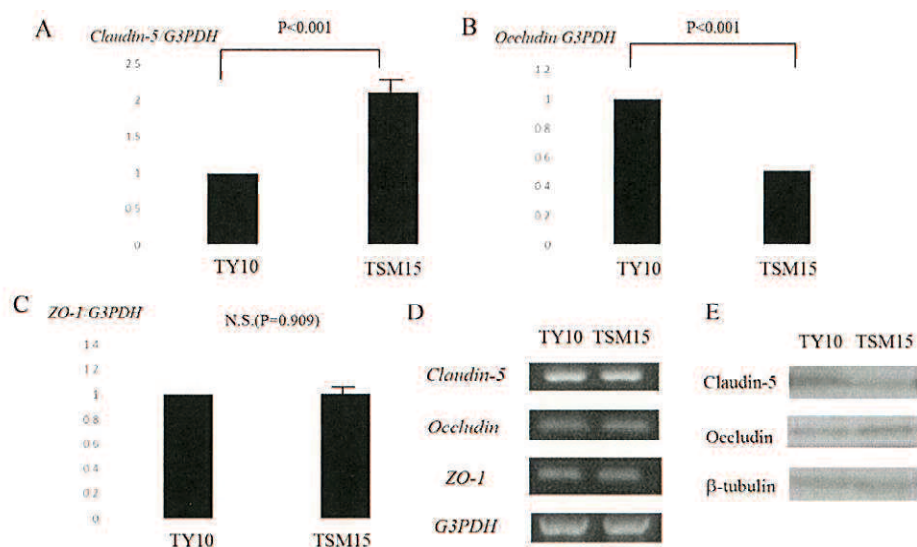


Fig. 5. TSM15 のタイトジャンクション関連分子の発現。TSM15 は *claudin-5*, *occludin*, *ZO1* を mRNA レベルで発現していることをリアルタイム PCR にて確認した (A-C)。これらはゲル電気泳動法でも確かめられた (D)。TSM15 は蛋白レベルでも *claudin-5* や *occludin* を発現していた (E)。

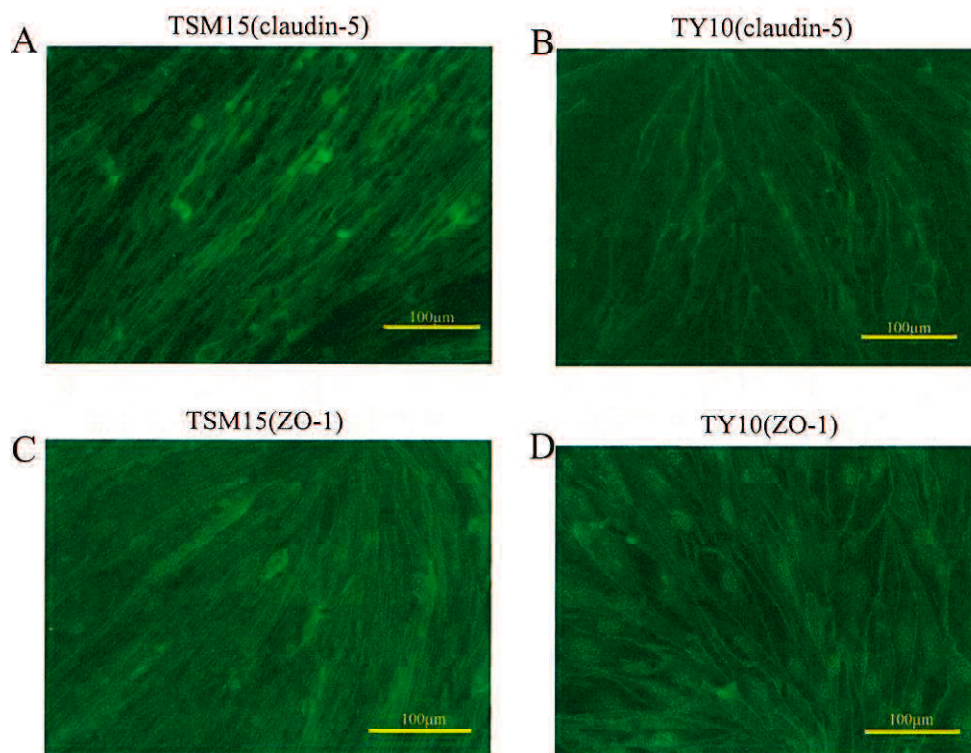


Fig. 6. TSM15 と TY10 のタイトジャンクション蛋白の免疫細胞化学. TSM15(A, C)では TY10(B, D)と同様に claudin-5、ZO-1 は細胞と細胞の境界部分に局在していた. スケールバー : 100µm.

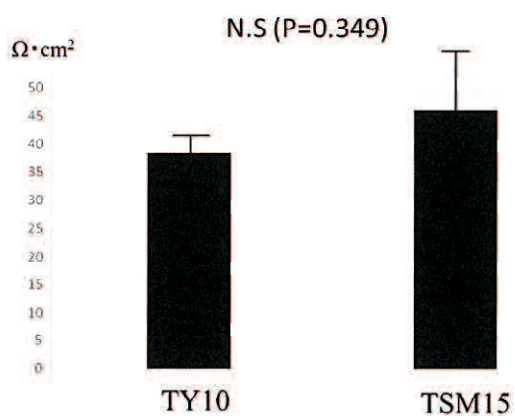


Fig. 7. TSM15 のバリア機能. TSM15 と TY10 の TEER 値は統計学的に有意差を認めなかった.

4. TSM15 のトランスポーターの発現

筋微小血管内皮細胞でも BBB や BNB 構成内皮細胞と同様の transporter が発現しているか否かを検討した. *Multiple drug resistance 1 (Mdr1)* と *ATP-binding Cassette Sub-family B Member 2 (ABCG2)* は TSM15 細胞において mRNA レベルで発現していた (Fig.8A, B, D). ヒト BBB やヒト BNB で D-グルコースの血液側から神経系内への能動輸送を行っている GLUT-1 も TSM15 で mRNA レベル (Fig.8C, D) と蛋白レベル (Fig. 8E) で発現していた.

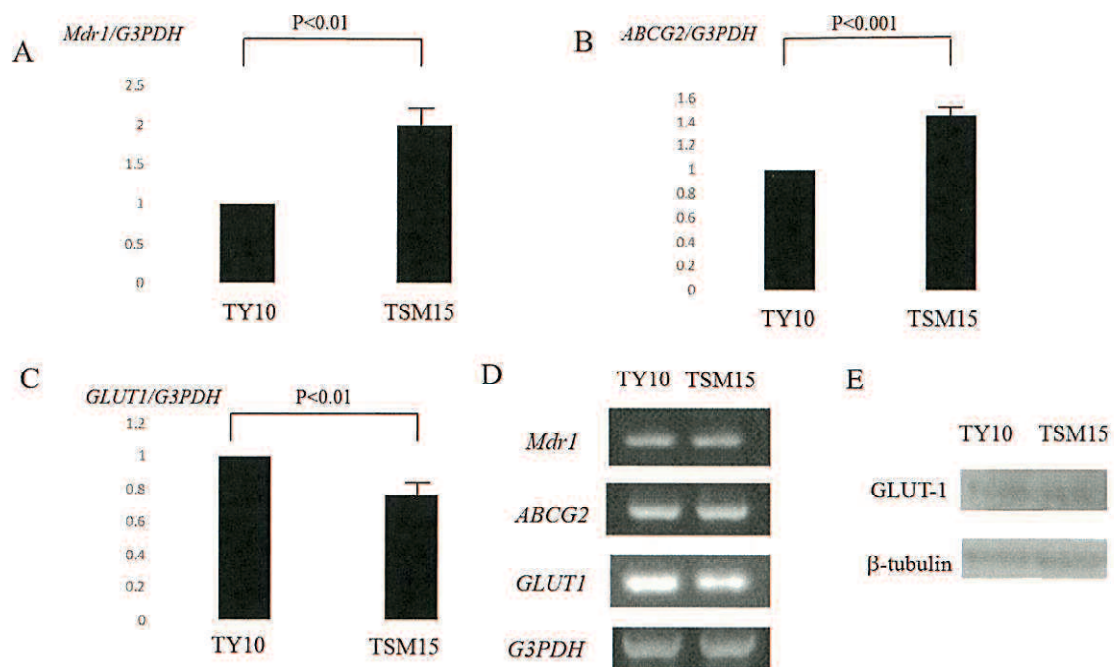


Fig. 8. TSM15 細胞でのトランスポーターの発現. TSM15 は TY10 と同様に *Mdr1* (p-glycoprotein) (A) と *ABCG2* (B), および *GLUT-1* (C) を mRNA レベルで発現していた. リアルタイム PCR (A-C) に加え, ゲル上での電気泳動にて可視化しこれらの mRNA レベルでの発現を確認した (D) 代表的な influx transporter である GLUT1 は TY10 と同様に TSM15 も蛋白レベルで発現していることをウエスタンブロットにて確認した (E).

5. ヒト骨格筋微小血管の TJ 関連蛋白とトランスポーターの発現

ヒト骨格筋の筋内鞘の微小血管に実際に TJ 関連蛋白とトランスポーターが発現しているかをみる目的で、ヒト骨格筋組織を用い免疫組織化学的に検討した。その結果、筋微小血管に TJ 関連蛋白である claudin-5, ZO-1, および transporter である GLUT-1 の発現が確認された (Fig.9A-C)。つまり、TSM15 を用いた *in vitro* で得られた結果の一部は *in vivo* でも裏付けられた。

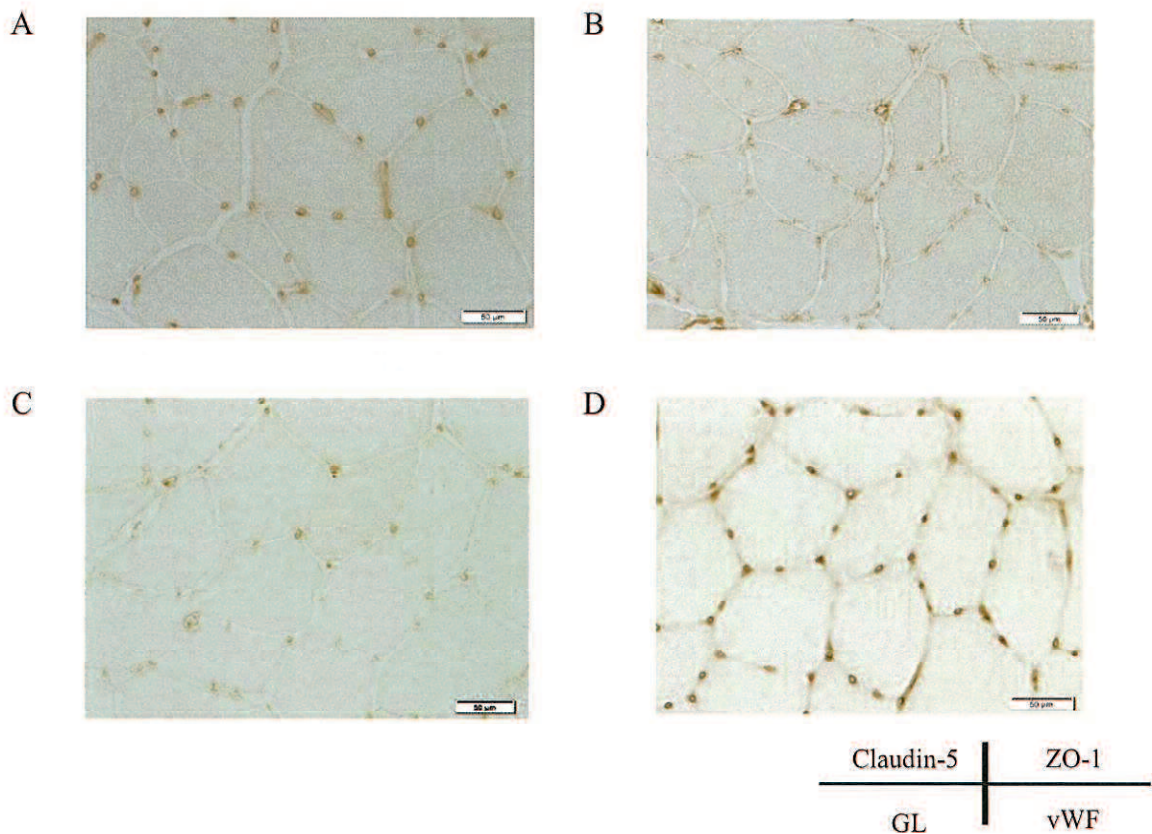


Fig. 9. ヒト骨格筋組織の免疫組織化学的染色. 筋微小血管に TJ 関連蛋白である claudin-5 (A), ZO-1 (B), GLUT-1 (C), vWF (D) が免疫染色にて染色された。

スケールバー：50 μ m.

考察

筋内鞘の微小血管内の隣接する内皮細胞は TJ を介して強固に結合しあっていることが知られている (Hudricka et al., 2004). しかしながら, 筋内膜の微小血管での TJ の分子構築については明らかになっていなかった. それはおそらくヒト由来のすぐれた骨格筋微小血管 *in vitro* モデルが樹立されてこなかったからと推察される. 本研究では, われわれが過去にヒト *in vitro* BBB/BNB モデル (Sano et al., 2010, 2012; Abe et al., 2012; Maeda et al., 2013) を樹立した際に非常に有用であった tsA58 と hTERT という 2 つの不死化遺伝子を利用し, 100%の純度を誇る条件的不死化ヒト骨格筋微小血管内皮細胞株を世界で初めて樹立することに成功した.

TSM15 と名付けたヒト筋微小血管内皮細胞株は BBB や BNB と共通の TJ 蛋白が発現していた (Sano et al., 2010, 2012; Abe et al., 2012). 興味深いことに, TSM15 は BBB 由来内皮細胞株 (TY10) とほぼ同等の TEER 値を示し, ほぼ同等のバリア機能を有するという結果が得られた. しかしながら, Kennedy のウサギを用いた *in vivo* の検討では, BBB や BNB を構成する微小血管に比し, 筋内鞘に存在する微小血管では HRP をはじめとした基質の透過性が高いことを報告している (Kennedy et al., 1979). 我々の今回の *in vitro* の結果と, 過去の *in vivo* の結果の差は, これらの組織で微小血管を構成する細胞の種類と量の違いによるものであると推測された. アストロサイトは液性因子を介して脳微小血管内皮細胞のバリア機能を強めると報告されている (Hori et al., 2004; Kim et al., 2006). 最近の研究ではペリサイトもまた BBB や BNB を構成する内皮細胞のバリア機能を強めることが示されている (Shimizu et al., 2011, 2012). BBB は微小血管内皮細胞, ペリサイト, アストロサイトの 3 つの細胞から成り立っているが, BNB はアストロサイトに該当する細胞を欠き, 血管内皮細胞とペリサイトのみから成り立っている. 筋内鞘に存在する微小血管は BNB と同じく血管内皮細胞とペリサイトの 2 つの構成細胞で成り立っている. ラットのペリサイトと内皮細胞の数の比率は, 網膜で 1:3, 脳で 1:5, 肺で 1:10 であり, バリアシステムを構築する微小血管でペリサイト/内皮細胞の比が高

いことが知られている (Balabanov et al., 1998). 一方, 正確な骨格筋微小血管のペリサイトと内皮細胞の数の比率は明らかになってはいないが, ヒトでは末梢神経より筋の方がペリサイト/内皮細胞の比が少ないと報告されている (Miyoshi et al., 1979). すなわち, 骨格筋微小血管を構成する内皮細胞自体は BBB/BNB を構成する微小血管内皮細胞とほぼ同等のバリア機能を有する可能性があるものの, ペリサイトの被覆数の少ない筋微小血管では, ペリサイト数の多い BNB や潤沢な数のペリサイトに加えアストロサイトをも有する BBB を構成する微小血管に比し *in vivo* ではバリア機能が低くなっている可能性が考えられた.

中枢神経システムや末梢神経システム内の環境を維持するために, BBB や BNB にはさまざまなトランスポーターが発現しており, 栄養を神経系に供給するだけでなく薬物や神経毒性物質を神経組織から排出する役割を果たしている (Engelhardt, 2009; Sano and Kanda, 2013; Kanda, 2013). 興味深いことに, TSM15 でもいくつかの efflux および influx トランスポーターが mRNA レベルで発現していた. さらに, TSM15 (Fig.8E) ばかりでなくヒト骨格筋微小血管 (Fig. 9C) でも GLUT-1 が蛋白レベルで発現していた. BBB や BNB では GLUT-1 は D-グルコースなどの栄養素を選択的に神経実質内に取り込む働きをしているが (Sano and Kanda, 2013), 同様の輸送システムは筋内膜微小血管でも存在するのであろうか.

インスリン反応性のグルコース輸送単体である GLUT-4 が筋肉細胞やアディポサイトに豊富に発現しているとされている (Shepherd and Kahn, 1999). しかしながら, 筋微小血管内皮細胞自体にグルコース輸送単体が存在するか否かを検討した報告はまれである. 今回の研究で, GLUT-1 が筋内膜微小血管を構成している内皮細胞に発現していることが *in vitro* と *in vivo* で示された (Fig.8, 9). Jurysta らは, GLUT-1 の mRNA が骨格筋内に発現していることを示している (Jurysta et al., 2013). さらに Huang らは, 血管内皮細胞に発現する GLUT-1 が D グルコースを心筋へと輸送すると報告している

(Huang et al., 2012). これらの報告および今回の実験結果をまとめると、骨格筋ではD
グルコースは微小血管内皮細胞に存在する GLUT-1 により筋細胞へと輸送され、さらに
筋細胞表面の GLUT4 を介して筋線維内に選択的に取り込まれることが示唆された。

BBB や BNB では有害物質が神経組織に入ることを阻止するため様々な efflux トラン
スポーターが発現している (Sano and Kanda, 2013), 代表的なものとして P-gp (Schinkel
et al., 1996) と ABCG2 (Cisternino et al., 2004) が広く知られている。興味深いことに、
TSM15 において P-gp および ABCG2 が発現していた。すなわち、筋微小血管を構成す
る内皮細胞に発現する efflux トランスポーターによって筋組織も有害薬物から保護され
ている可能性が示された。

筋組織の微小循環障害は、様々な筋疾患の発症に関与していることが報告されている。
Duchene 型筋ジストロフィーでは筋微小血管内皮細胞の腫脹や基底膜の肥厚が観察
され、酸素や溶質の拡散を減じる原因になっているものと推察されている (Miike et al.,
1987)。Emslie-Smith と Engel は筋微小血管内への免疫複合体の沈着や微小血管の数の
減少が筋細胞の構造変化に先駆けておこる病理学的変化であると報告しており
(Emslie-Smith and Engel, 1990), 皮膚筋炎における筋微小血管障害の病態形成における
重要性が示されている。筋内膜微小血管が病気の進行に影響しているとされる筋疾患の
メカニズムを明らかにするために、すぐれたヒト *in vitro* 筋微小血管モデルは必要不可
欠である。今回われわれが樹立した筋微小血管内皮細胞株は、骨格筋の微小循環システ
ムを分子レベルで解明するための研究や、筋ジストロフィーや皮膚筋炎などの難治性筋
疾患の新たな治療法開発のために有用なツールとなりうるものと考えられた。

結語

ヒト筋微小血管内皮細胞株の樹立に成功した。本細胞株はヒト BBB 構成内皮細胞株と共通のバリア関連分子を発現しており、少なくとも内皮細胞同士の比較では BBB 由来内皮細胞株と同等のバリア機能を有していた。

謝辞

本研究に際し、実験の遂行・データ分析・論文作成をご指導頂いた佐野泰照先生、実験の遂行・データ分析にご協力頂いた石口絵梨先生、西原秀昭先生、大石真莉子先生、竹下幸男先生、高橋志織先生、清水文崇先生、前田敏彦先生、尾本雅俊先生、本研究にあたり統括・ご指導・ご教鞭を賜りました神田隆先生に深謝申し上げます。

参考文献

- Abe M, Sano Y, Maeda T, et al. Shimizu F, Kashiwamura Y, Haruki H, Saito K, Tasaki A, Kawai M, Terasaki T, Kanda T. 2012. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines: a new in vitro blood-nerve barrier (BNB) model. *Cell Struct Funct* 37:89-100.
- Balabanov R, Dore-Duffy P. 1998. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 53:637-644.
- Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F and Scherrmann JM. 2004. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 64: 3296-3301.
- Emslie-Smith AM, Engel AG. 1990. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann Neurol* 27:343-356.
- Engelhardt B, Sorokin L. 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31:497-511.
- Han X, Boyd PJ, Colgan S, Madri JA, Haas TL. 2003. Transcriptional up-regulation of

endothelial cell matrix metalloproteinase-2 in response to extracellular cues involves GATA-2. *J Biol Chem* 278:47785-47791.

Hosoya K, Takashima T, Tetsuka K, Nagura T, Ohtsuki S, Takanaga H, Ueda M, Yanai N, Obinata M. and Terasaki T. 2000. mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new in vitro BBB model for drug targeting. *J Drug Target* 8:357-370.

Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T. 2004. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* 89:503-513.

Huang Y, Lei L, Liu D, Jovin I, Russell R, Johnson RS, Di Lorenzo A, Giordano FJ. 2012. Normal glucose uptake in the brain and heart requires an endothelial cell-specific HIF-1 α -dependent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17478-17483.

Hudricka O, Brown MD, Egginton S. 2004. The microcirculation in muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology*, 3rd ed. New York: McGraw-Hill. p511-533.

Jurysta C, Nicaise C, Giroix MH, Cetik S, Malaisse WJ, Sener A. 2013. Comparison of GLUT1, GLUT2, GLUT4 and SGLT1 mRNA expression in the salivary glands and six other organs of control, streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats. *Cell Physiol Biochem* 31:37-43.

Kanda T. 2013. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:208-212.

Kennedy WR, Yoon KS. 1979. Permeability of muscle spindle capillaries and capsule. *Muscle Nerve* 2:101-108.

Ketabi-Kiyanvash N, Herold-Mende C, Kashfi F, Caldeira S, Tommasino M, Haefeli WE and Weiss J. 2007. NKIM-6, a new immortalized human brain capillary endothelial cell line with

conserved endothelial characteristics. *Cell Tissue Res* 328:19-29.

Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol* 39:339-345.

Kusch-Poddar M, Drewe J, Fux I and Gutmann H. 2005. Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier. *Brain Res* 1064:21-31.

Le GY, Essackjee HC, Ballard HJ. 2014. Intracellular adenosine formation and release by freshly-isolated vascular endothelial cells from rat skeletal muscle: effects of hypoxia and/or acidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 450:93-98.

Maeda T, Sano Y, Abe M, Shimizu F, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Ueda M and Kanda T. 2013. Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines. *Clin Exp Neuroimmunol* 4:326-338.

Miike T, Sugino S, Ohtani Y, Taku K, Yoshioka K. 1987. Vascular endothelial cell injury and platelet embolism in Duchenne muscular dystrophy at the preclinical stage. *J Neurol Sci* 82:67-80.

Miyoshi T, Kennedy WR, Yoon KS. 1979. Morphometric comparison of capillaries in muscle spindles, nerve, and muscle. *Arch Neurol* 36:547-552

Muruganandam A, Herx LM, Monette R, Durkin JP and Stanimirovic DB. 1997. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *FASEB J* 11:1187-1197.

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. 1994. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5705-5709.

Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Obinata M, Kajiwara K, Fujii M, Suzuki M, Kanda T. 2010. Establishment of a new conditionally

immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 225:519-528.

Sano Y, Kashiwamura Y, Abe M, Dieu LH, Huwyler J, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Saito K, Tasaki A, and Kanda T. 2012. Stable human microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clin Exp Neuroimmunol* 3: 1-12.

Sano Y and Kanda T. 2013. Blood–neural barrier: Overview and latest progress. *Clin Exp Neuroimmunol* 4:220-223.

Sarin H. 2010. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenes Res* 2: 14.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA and van Deemter L. 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97: 2517-2524.

Shepherd PR, Kahn BB. 1999. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-257.

Shimizu F, Sano Y, Abe MA, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T. 2011. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 226:255-266.

Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, Kanda T. 2012. 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* 37:401-409.