

# 骨格筋ペリサイトの特徴

氏名：石口 絵梨

所属：山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 臨床神経学講座

令和3年12月

第一章	諸言	
第二章	実験方法	6
第三章	実験結果	11
第四章	考察	21
第五章	結語および将来への展望	24
	謝辞	24
	参考文献	25

## 第一章 諸言

血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) は、脳・脊髄における中枢神経系のバリアシステムである。脳微小血管内皮細胞同士は tight junction (TJ) を構成することで物質移行を制限しており、脳実質の内部環境を安定させるのに重要な役割を果たしている。同様のバリアシステムは末梢神経系にも存在しており、血液神経関門 (blood nerve barrier: BNB) と呼ばれる。BNB は BBB と異なりアストロサイトを欠き、末梢神経微小血管内皮細胞とペリサイトで構成されている。骨格筋における筋内鞘に存在する微小血管は、微小血管内皮細胞とペリサイトのみから成り立っており、構成細胞は BNB と同様である。隣接する骨格筋微小血管内皮細胞同士は TJ を有しており (Hudricka et al, 2004), BBB や BNB と共通の TJ 蛋白を発現していることが知られている (Sano et al, 2010,2012 ; Abe et al, 2012)。

興味深いことに、この骨格筋微小血管の障害は様々な筋疾患の病態に深くかかわっていることが報告されてきた。皮膚筋炎の筋組織において、血管への免疫複合体の沈着や微小血管の減少が筋線維の壊死に先駆けて生じることが報告されている (Emslie-Smith et al, 1990)。また、皮膚筋炎において筋内鞘微小血管の TJ が破壊されていることが報告されており、炎症性サイトカインが筋内鞘内に浸透し、筋障害を悪化させることが想定されている (Maeda et al, 2011)。そのため、破壊された TJ の修復が皮膚筋炎の新たな治療法の確立につながる可能性がある。

BBB では TJ を構成する膜蛋白として *occludin*, *claudin-5*, *ZO-1* が代表的なものと考えられているが、その中でも *claudin-5* がバリア機能の中心を担っていると考えられている (Ohtsuki et al, 2007)。我々はこれまでにヒト BBB 構成細胞 (微小血管内皮細胞, ペリサイト, アストロサイト), ヒト BNB 構成細胞 (微小血管内皮細胞, ペリサイト), およびヒト骨格筋微小血管内皮細胞の不死化細胞株を樹立し、報告した (Sano et al, 2010;

Maeda et al, 2013; Shimizu et al, 2010, 2011; Haruki et al, 2013; Abe et al, 2012). 導入遺伝子として、温度感受性 SV40 large T 抗原 (tsA58) 遺伝子およびヒトテロメラーゼ catalytic subunit 遺伝子 (hTERT) を用いた. この tsA58 遺伝子を発現する細胞は、33°Cの温度下では SV40 large T 抗原蛋白の機能により増殖し、37°Cでは tsA58 蛋白の分解により細胞増殖がストップし、生理的な細胞の性質を発揮することが知られている (Hosoya et al, 2008).

従来の *in vitro* BBB モデルは SV 40 large T 抗原を不死化遺伝子として使用していたため、継代を繰り返すことで腫瘍化し生理的な細胞の特性を失うことが知られていた. 一方、われわれの樹立した条件的不死化細胞株は継代を繰り返してもそれぞれのバリア構成細胞の特性を保持していた (Maeda et al, 2013; Sano et al, 2010, 2017; Abe et al, 2012). すなわち tsA58 遺伝子を導入したことで、33°Cで培養すると細胞の増殖が起こり、37°Cの条件下におくと tsA58 が不活化し生理的なバリア機能を発揮するようになり、実験に十分な増殖能と細胞特性の維持という条件を獲得することができたわけである.

TSM15 と名付けた骨格筋微小血管内皮細胞株は BBB 構成内皮細胞や BNB 構成内皮細胞と同様に (Sano et al, 2010, 2012; Abe et al, 2012), *occludin*, *claudin-5*, *ZO-1* を発現しており、ヒト BBB 構成微小血管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 (Sano et al, 2017). すなわち、微小血管の首座である血管内皮細胞自体を *in vitro* で比較した場合、BBB や BNB 構成内皮細胞と、骨格筋微小血管内皮細胞のバリア機能には大差がなかったことになる. しかし、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、すなわちバリア機能が脆弱であることが報告されていた (Kennedy et al, 1979). 今回の研究目的の一つは、我々の *in vitro* の実験結果と *in vivo* の解析結果の乖離の原因を科学的に解明することにある.

近年、BNB ではペリサイトが *paracrine* に放出するさまざまな液性因子が内皮細胞、



すなわち BNB のバリア機能を高めていることが明らかにされた (Shimizu et al, 2008). さらに, ペリサイトが分泌しているグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF); Shimizu et al, 2012) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor(bFGF); Shimizu et al, 2010) が BNB 構成内皮細胞の *claudin-5* を up-regulate し, バリア機能を高めていることが報告された (Shimizu et al, 2012). 末梢神経系と同じく血管内皮細胞とペリサイトのみから構成される骨格筋微小血管でも, ペリサイトが内皮細胞に何らかの影響を及ぼしていることが推察され, この点を検証することが本研究の二つ目の目的である.

上記の研究目的を達成すべく, まずはヒト骨格筋微小血管由来のペリサイトを単離し, 条件的不死化細胞株を樹立することから研究を開始した. そして, 骨格筋ペリサイトが骨格筋微小血管内皮細胞に与える影響について解析した. その後, 骨格筋微小血管バリア機能が BBB や BNB に比し *in vivo* で脆弱な理由を科学的に検討する, という流れで本研究を進めた.

## 第二章 実験方法

### 1. 培地

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) は Sigma 社 (Saint Louis, Missouri, U.S.A.) より購入し, 抗生剤はペニシリン (100 U/ml, Sigma, Saint Louis, Missouri, U.S.A.), ストレプトマイシン (100 $\mu$ l/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ペリサイトの 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  $\mu$ l/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とした.

### 2. 材料

モノクローナル抗 $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) 抗体は Agilent 社 (Santa Clara, CA, USA) より購入した. ポリクローナル抗 platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) 抗体, 抗 human telomerase (hTERT) 抗体, 抗  $\beta$  tubulin 抗体は Santa Cruz 社 (CA, USA) から購入した. ポリクローナル抗 basic fibroblast growth factor (bFGF) 抗体, モノクローナル抗 glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) 抗体は R&D systems 社 (Minneapolis, Minnesota, USA) から購入した. モノクローナル抗 SV40 T antigen 抗体は Calbiochem (Darmstadt, Germany) から購入した. 蛍光標識 (fluorescein isothiocyanate ; FITC) された二次抗体は Invitrogen から入手した. FITC デキストラン (10 kDa) は Sigma から入手した. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells ; HUVECs) はヒューマンサイエンス振興財団 (Osaka,

Japan)から入手した。

### 3. ヒト骨格筋微小血管内皮細胞の単離と同定

ヒト骨格筋組織を用いた本研究はヘルシンキ宣言に基づき計画され、山口大学医学部附属病院倫理委員会で承認を受けたのちに開始した。髄膜癌腫症で死亡した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正常筋組織を採取した。実体顕微鏡下にて可視可能な小さな血管を鋭利なピンセットを用いて慎重に剥離した。小さな筋切片を剃刀刃で mince し、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。遠沈 (800g, 5 分) 後、小片を DM に溶解し、同量の 32%デキストランを加え、16%濃度に調整し、遠沈 (4500g, 15 分, 4°C) した。小片を再度デキストラン溶液に溶解し遠沈した。遠沈後、小片を洗浄し、タイプ I コラーゲンを塗布した dish に播種した。細胞は内皮細胞培地を用いて 37°C (5%CO<sub>2</sub>, 95%大気下) で培養した。tsA58 遺伝子および hTERT 遺伝子を既報告と同様にレトロウイルスを用いて導入した (Sano et al, 2017)。その独特な形態からペリサイトと思われる細胞が増殖してくるのを確認し、ひとつのコロニーをペニシリンカップを用いてトリプシン処理にて pick up し、新たな dish に播種した。この操作を数回行うことにより、純度 100%のペリサイト細胞株を樹立した。また、得られた細胞株がペリサイトマーカーを発現していることを確認した。

### 4. 免疫細胞化学

$\alpha$ SMA と hTERT の免疫染色では、培養した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で調整した 4%パラホルムアルデヒド (Wako, Osaka, Japan) を用いて室温で 20 分間固定し、100%メタノールを 4°C で 15 分間作用させ、PBS で 1%に調整した FBS で 30 分間ブロッキングを行った。

PDGFR $\beta$  の免疫染色では、培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで室温 20 分間固定

し、0.1% Triton X-100 (Sigma) を 10 分間作用させ、PBS で 5% に調整した FBS で一晩ブロッキングを行った。

SV40 large T 抗原の免疫染色では、4%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 15 分間固定し、0.1% Triton X-100 (Sigma) を 10 分間作用させ、PBS で 3% に調整した FBS で 30 分間ブロッキングを行った。

室温で一次抗体 (1:50) を 1.5 時間反応させたのちに、蛍光標識された二次抗体 (1:200) を室温で 1 時間反応させた。HUVECs を SV40 large T 抗原と hTERT を染色した際のネガティブコントロールとして用いた。TSM15 (Sano et al, 2017) 呼ばれるヒト骨格筋微小血管内皮細胞株を  $\alpha$ SMA と PDGFR $\beta$  を染色した際のネガティブコントロールとして用いた。核を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:2000, Sigma) を用いて可視化し、蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

#### 5. 経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance; TEER) 値測定

transwell inserts (pore size 0.4 $\mu$ m, effective growth area 0.3 cm<sup>2</sup>, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, U.S.A) に rat-tail collagen type- I (BD Bioscience) を塗布し、 $1.0 \times 10^4$  cells/insert の TSM15 細胞を播き、33 $^{\circ}$ C でコンフルエントにし、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 24 時間培養した。その後、DM, ペリサイト上清, および各種添加物を含んだ DM で 24 時間培養したのち、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。統計学的有意差はスチューデントの t 検定を用いて評価した。

#### 6. 透過性試験

TSM15 細胞を rat-tail collagen type- I (BD Bioscience) を塗布した transwell

inserts (pore size 0.4 $\mu$ m, effective growth area 0.3 cm<sup>2</sup>, BD Bioscience) に播き, コンフルエントになるまで 33°C で培養した. コンフルエントになった後, 細胞を 37°C で 24 時間培養した. その後カルチャーインサートをそれぞれの培養液で 37°C 24 時間培養した. 1200 $\mu$ l の培養液を well の下層に入れ, 内皮細胞層を有するセルカルチャーインサートの上層から各々の培養液を取り除き, 500 $\mu$ l の 10kDa 蛍光標識デキストラン (Sigma; 0.5mg/ml) を含んだ培養液 (10 $\mu$ g/ml) を加えた. 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 $\mu$ 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.  $Cd (\mu$ l) =  $VL \times CL/CU$  で VL は 1 $\mu$ 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 (0.3cm<sup>2</sup>) を除すことで膜透過係数 (permeability coefficient) となる.

## 7. ペリサイト上清, GDNF, bFGF が TSM15 に与える影響

脳ペリサイト (HBPCT) や末梢神経ペリサイト (HPPCT) と同様に, HSMPT は DM にて 37°C で培養を行った. 24 時間後, 脳ペリサイト上清 (HBPCT-CM), 末梢神経ペリサイト上清 (HPPCT-CM), 骨格筋ペリサイト上清 (HSMPT-CM) を採取し, 解析まで -80°C で保存した. TSM15 は DM, HSMPT-CM, HBPCT-CM, HPPCT-CM で 37°C, 24

時間培養し、TEER 値測定と透過性試験を行った。bFGF と GDNF を用いた実験では、TSM15 は bFGF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml), GDNF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を添加した、もしくは添加しない DM にて 37°C で 24 時間培養し、TEER 値測定と透過性試験を施行した。中和抗体の実験では、TSM15 は抗 GDNF 抗体 (1.0µg/ml), 抗 bFGF 抗体 (1.0µg/ml), もしくは正常ヤギ IgG (1.0µg/ml) を添加した HSMPC-TM にて 37°C で 24 時間培養し、TEER 値測定と透過性試験を施行した。

#### 8. 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 33°C で培養した後、37°C 下で GDNF(1ng/ml, 10ng/ml) を含むあるいは含まない DM で 24 時間培養した。その後細胞を 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')

### 第三章 実験結果

#### 1. ヒト骨格筋ペリサイト株の確立

ヒト骨格筋ペリサイト (HSMPT) 株を樹立した (Fig.1). 細胞は紡錘形もしくはひし形様であり (Fig.1), これはペリサイト特有の形態として知られている (Tigges et al, 2012). 抗  $\alpha$ SMA 抗体を用いた免疫染色にて HBPCT (Fig.2A) と HSMPT (Fig.2B) が  $\alpha$ SMA を発現していることが確認できた. ネガティブコントロールとして用いた TSM15 は  $\alpha$ SMA を発現していなかった (Fig.2C). 同様に, 抗 PDGFR $\beta$  抗体を用いた免疫染色にて HBPCT (Fig.2D) と HSMPT (Fig.2E) では PDGFR $\beta$  蛋白が染色されたが, ネガティブコントロールの TSM15 は染色されなかった (Fig.2F). また, ウェスタンブロットでも HBPCT と HSMPT が  $\alpha$ SMA と PDGFR $\beta$  を蛋白レベルで発現していることが示された (Fig.2G). 次に, HBPCT (Fig.3A) と HSMPT (Fig.3B) に tsA58 遺伝子が導入されたことが免疫細胞化学的に示された. HBPCT (Fig.3D) と HSMPT (Fig.3E) において tsA58 が核に局在していることを DAPI とマージさせて確認した. ネガティブコントロールとして用いた HUVEC では DAPI のみで核が染色され, tsA58 抗原は染色されなかった (Fig.3C, Fig.3F). また, ウェスタンブロットでは HSMPT は TSM15 と同程度に tsA58 を発現していた (Fig.3G). HBPCT (Fig.4A) と HSMPT (Fig.4B) における

hTERT の発現も免疫細胞化学的に確認した. HBPCT (Fig.4D) と HMPCT (Fig.4E) において, hTERT が核に局在していることは DAPI とマージさせて確認した.

Figure 1

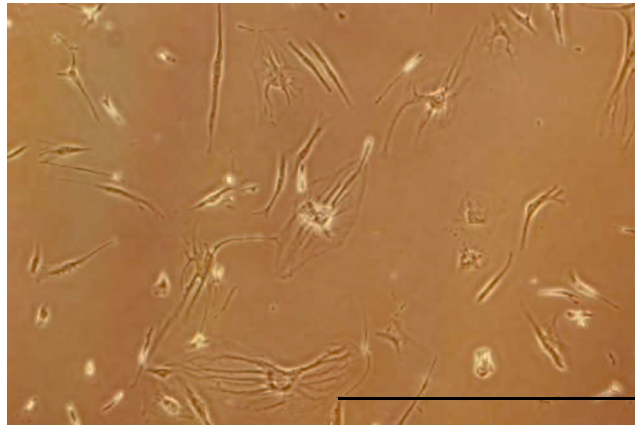
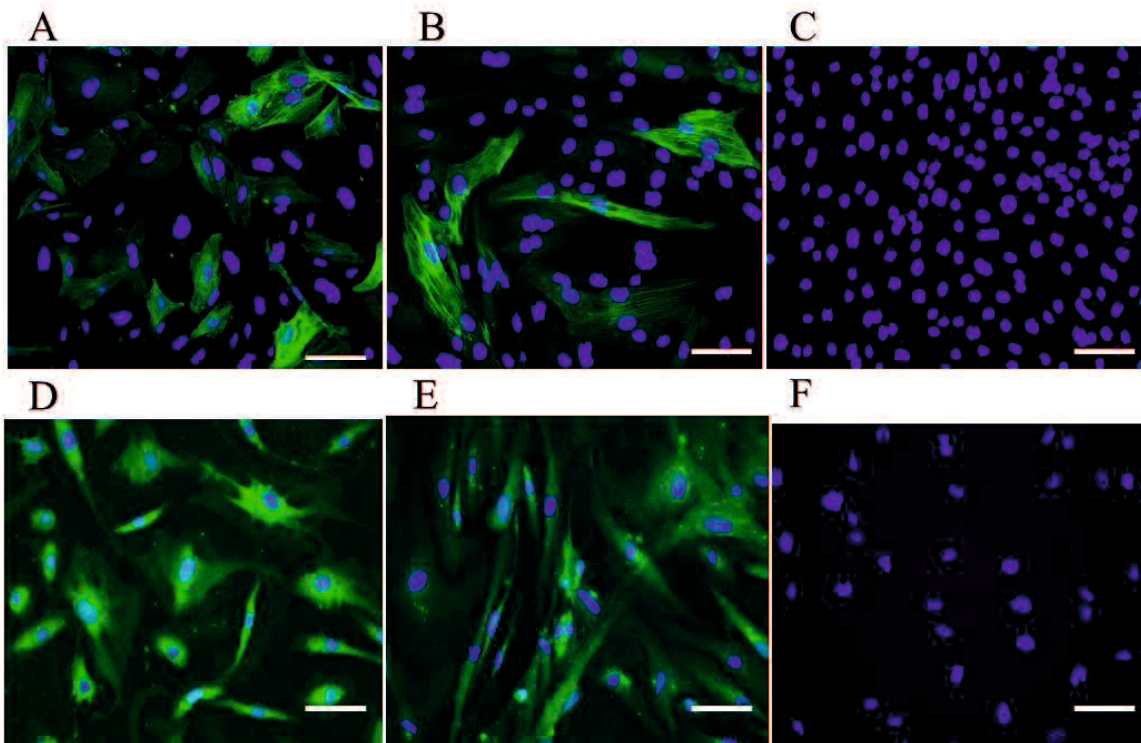


Fig. 1. HMPCT を位相差顕微鏡で観察した. 紡錘状あるいはひし形様の形態をしている. スケールバー : 1mm





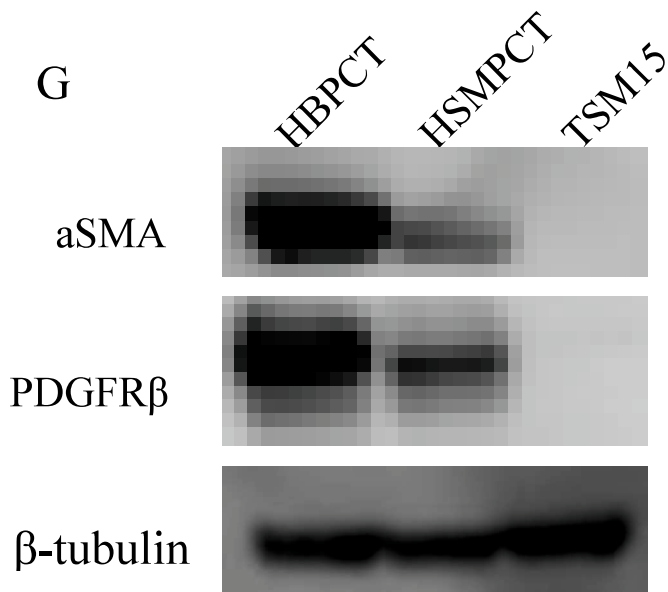


Fig. 2. HSMPTCT はペリサイトマーカーを発現している. 抗  $\alpha$ SMA 抗体を用いた免疫染色を HBPCT (A) と HSMPTCT (B) に対して行った. TSM15 は  $\alpha$ SMA のネガティブコントロールとして用いた (C). 抗 PDGFR $\beta$  抗体を用いた免疫染色では, HBPCT (D) だけでなく HSMPTCT (E) も PDGFR $\beta$  を発現していた. TSM15 をネガティブコントロールとして用いた (F, G). HBPCT と HSMPTCT で  $\alpha$ SMA 蛋白と PDGFR $\beta$  蛋白の発現をウェスタンブロット法で解析した (G). TSM15 をネガティブコントロールとして用いた.  
スケールバー : 100 $\mu$ m

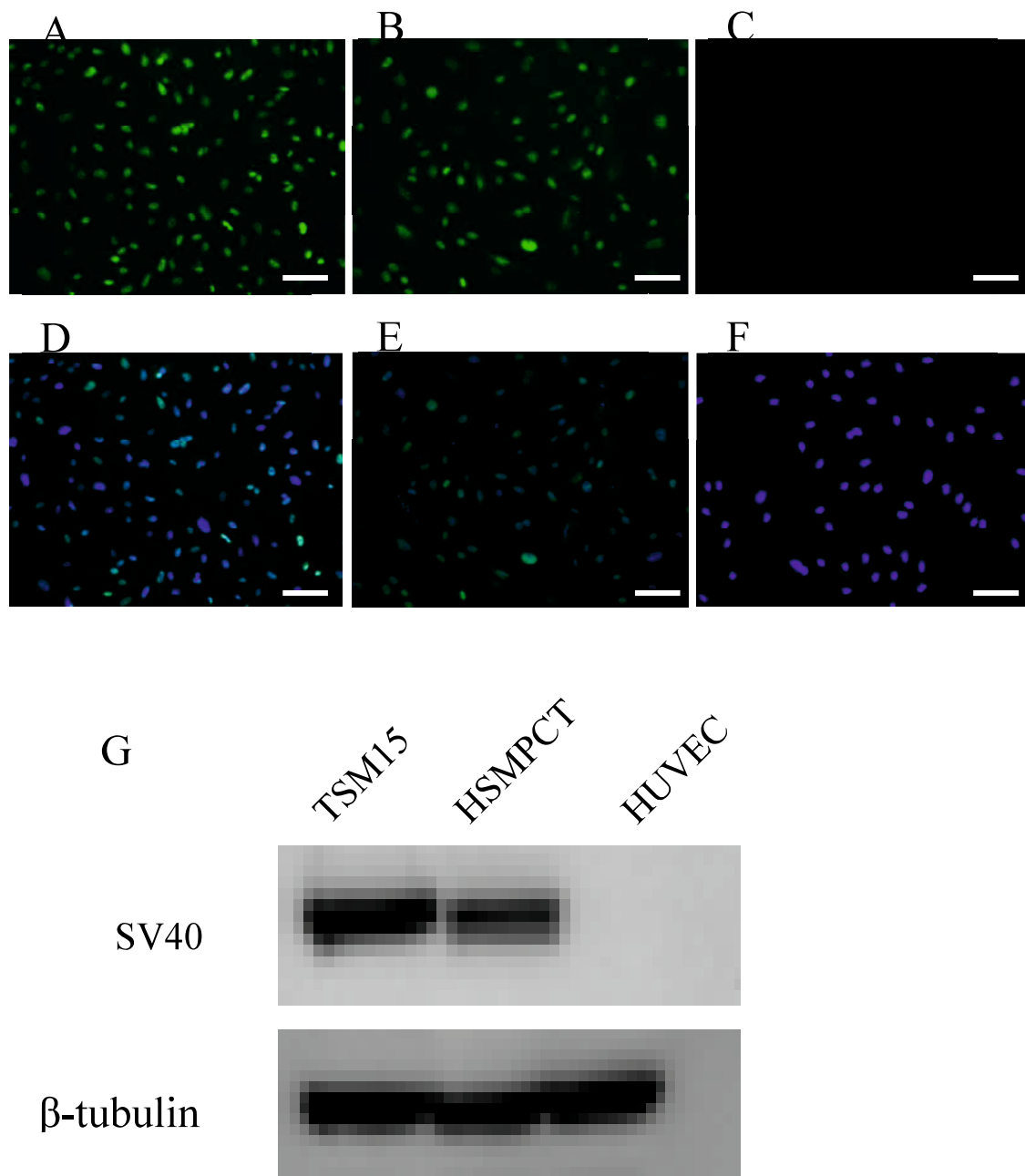


Fig. 3.

抗 SV40 抗原抗体を用いた HBPCT (A) と HSMPTCT (B) の免疫染色. HBPCT (D) と HSMPTCT (E) において tsA58 の核内分布は DAPI を用いて核を染色しマージさせ確認した. HUVEC はネガティブコントロールとして用いた (C, F). HBPCT と HSMPTCT で

tsA58 の発現をウェスタンブロット法で解析した (G)

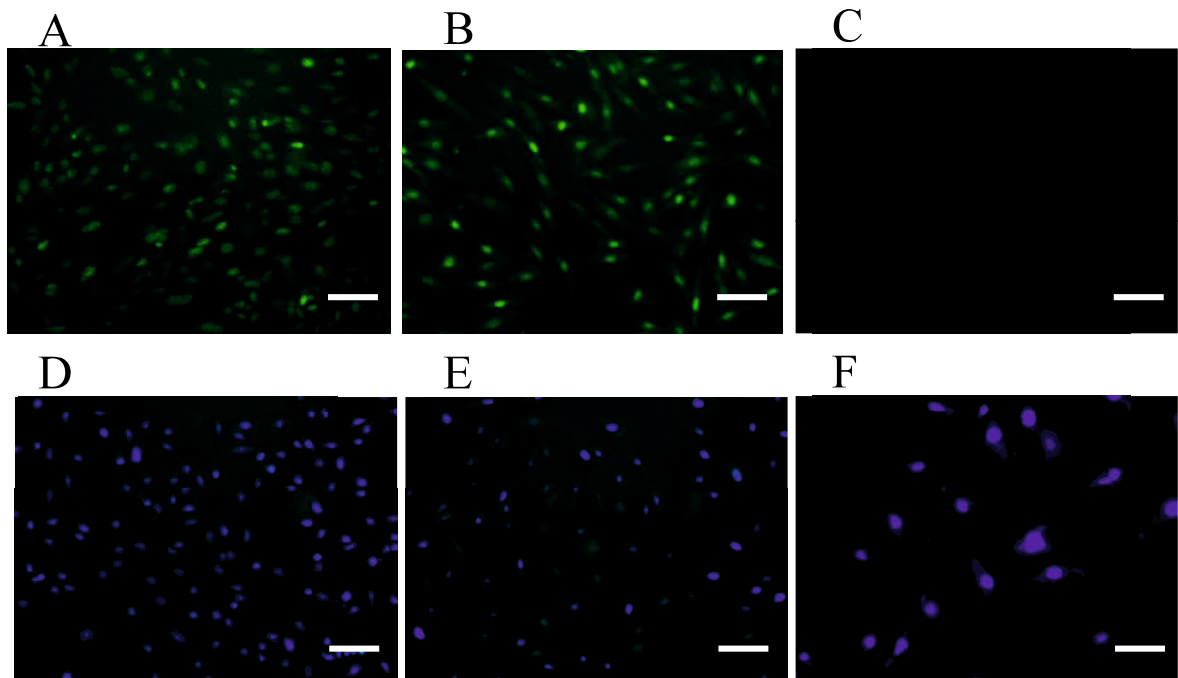


Fig. 4.

抗 hTERT 抗原抗体を用いた HBPCT (A) と HSMPT (B) の免疫染色. HBPCT (D) と HSMPT (E) において hTERT の核内分布は DAPI を用いて核を染色しマージさせ確認した. HUVEC はネガティブコントロールとして用いた (C, F).

## 2. HSMPT 上清が TSM15 のバリア機能に与える影響

ペリサイトから放出される液性因子が筋内鞘微小血管内皮細胞のバリア機能を高めるかどうかを評価するために, DM, HSMPT-CM, HBPCT-CM, HPPCT-CM で培養した TSM15 を用いて TEER 値測定と透過性試験を行った. HSMPT-CM で培養した TSM15 の TEER 値は有意に増加した (A). 加えて, TSM15 の FITC デキストランの透過性は DM と比較して HSMPT-CM だけでなく HBPCT-CM, HPPCT-CM で有意に低下した

(B).

Figure 5

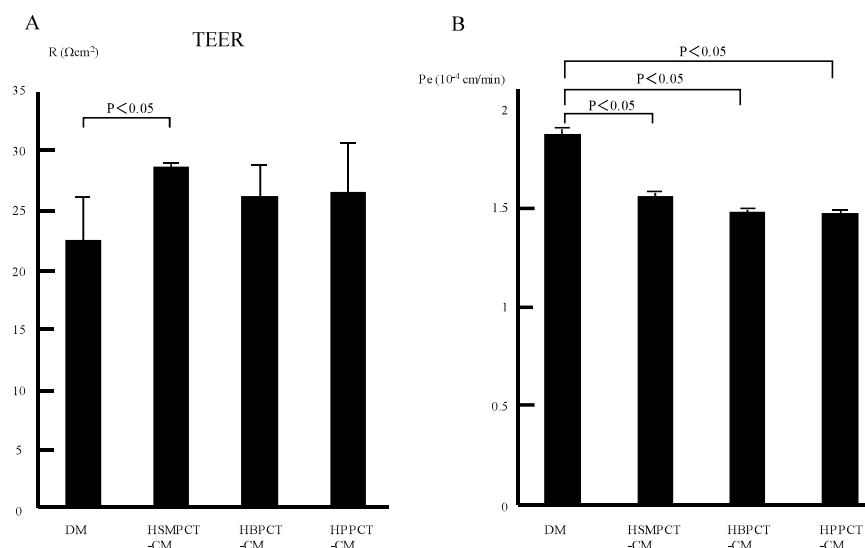


Fig. 5.

ペリサイト上清が TSM15 単層の TEER 値に及ぼす影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). TSM15 の TEER 値は HSMPT-CM で培養すると DM に比し有意に増加した (A). ペリサイト上清が TSM15 単層の FITC デキストラン Pe 値に及ぼす影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). HSMPT-CM だけでなく HBPCT-CM, HPPCT-CM も DM に比し有意に Pe 値を低下させた (B).

### 3. TSM15 のバリア機能に対する GDNF と bFGF の影響

HBPCT と HPPCT は, GDNF と bFGF を発現し放出し, 内皮細胞のバリア機能を高めると報告されている (Shimizu et al, 2011; Shimizu et al, 2012). まず, 我々はウェスタンブロット法を用いて HSMPT が GDNF と bFGF を発現しているかを確認した. 結果, HBPCT だけでなく HSMPT も GDNF と bFGF を発現していた (Fig. 6A, 6B). 次に我々は TEER 値測定と透過性試験を用いて GDNF と bFGF が TSM15 のバリア機能に与

える影響について検討した。GDNF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を添加した TSM15 の TEER は有意に増加していた (Fig. 7A)。次に、GDNF が TJ 分子の発現に与える影響を示すために、GDNF を 24 時間作用させた後の TSM15 における *claudin-5*, *occludin*, *ZO-1* の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR を用いて確認した (Fig. 7C-E)。GDNF (1ng/ml, 10ng/ml) を添加した TSM15 は、DM のみで培養された TSM15 に比し *claudin-5* の発現が有意に増加していた (Fig. 7C) が、*occludin* や *ZO-1* では変化はみられなかった。

加えて、DM と比較して GDNF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を添加した TSM15 の Pe 値は有意に低下していた (Fig. 7B)。さらに、HSMPT から放出される GDNF の TSM15 のバリア機能への寄与を明らかにするために、抗 GDNF 抗体を用いて GDNF を阻害した。抗 GDNF 中和抗体を含む HSMPT-CM を作用させると、TSM15 の TEER 値は有意に低下し (Fig. 7F)、Pe 値は有意に増加した (Fig. 7G)。

また、DM に比し bFGF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を添加した DM で培養した TSM15 の TEER 値は有意に増加した (Fig. 8A)。また、DM と比較して bFGF (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) を添加した TSM15 の Pe 値は有意に低下していた (Fig. 8B)。次に、HSMPT から放出される bFGF の TSM15 のバリア機能への寄与を明らかにするために、抗 bFGF 中和抗体を用いて bFGF を阻害した。抗 bFGF 中和抗体を含む HSMPT-CM を作用させると、TSM15 の TEER 値は有意に低下し (Fig. 8C)、TSM15 の Pe 値は有意に増加した (Fig. 8D)。

これらの結果から、HSMPT から放出される GDNF と bFGF はヒト筋内鞘における微小血管内皮細胞のバリア機能を高めることが示された。

Figure 6

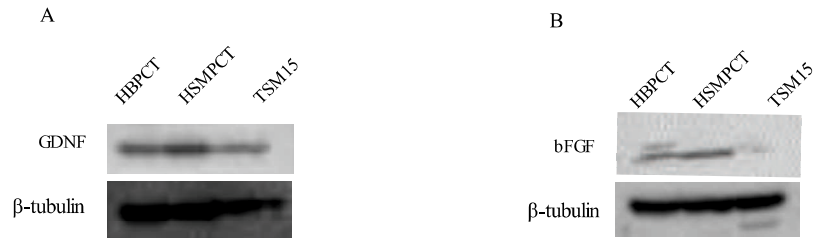


Fig.6.

HBPCT と HSMPT における GDNF と bFGF 蛋白のウェスタンブロット解析. HBPCT と同等のレベルで HSMPT は GDNF と bFGF を発現していた.

Figure 7

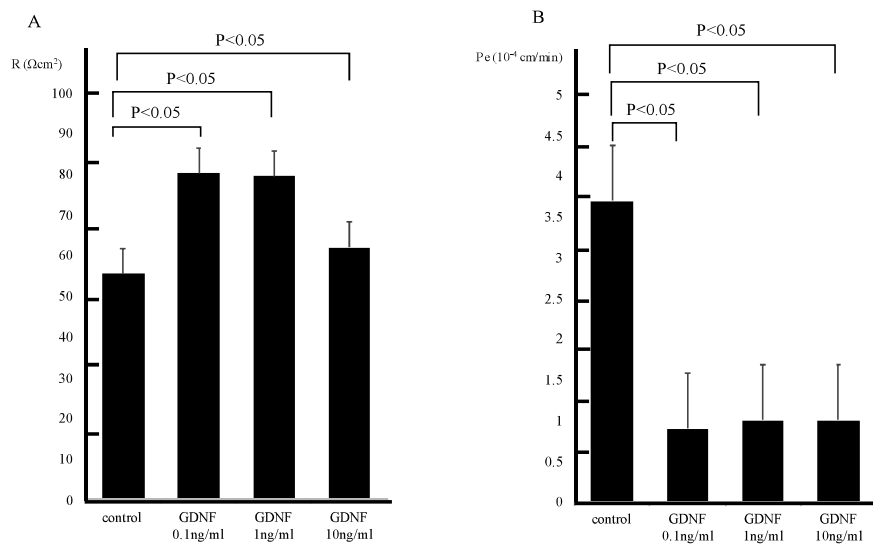


Figure 7

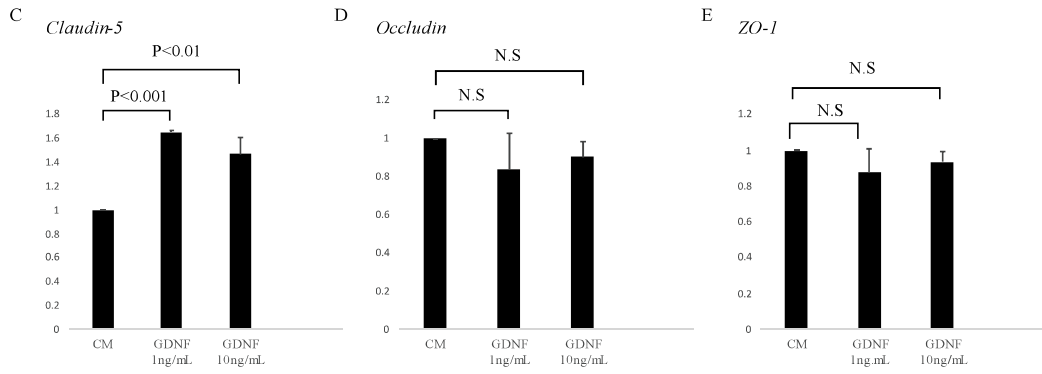


Figure 7

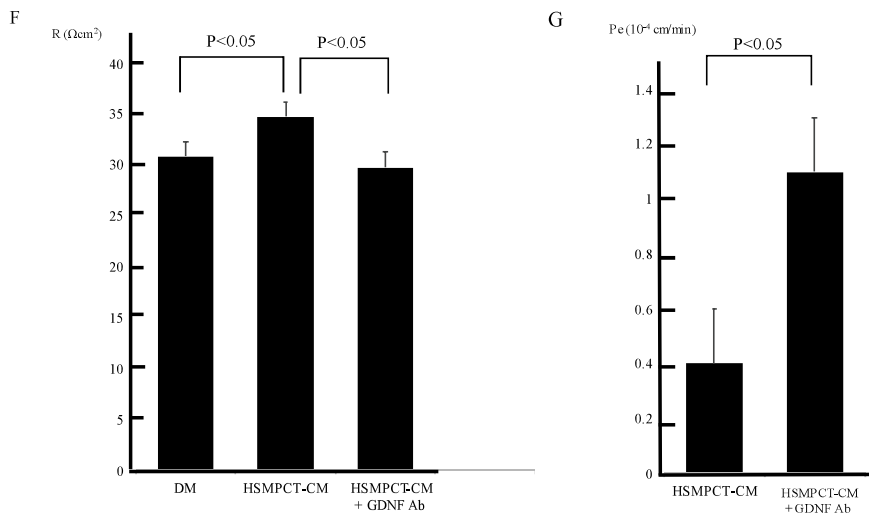


Fig.7.

A,B. GDNFがTSM15のバリア機能に与える影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). GDNF (0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 10ng/ml)はTSM15のTEER値を有意に増加させた(A). GDNF (0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 10ng/ml)はTSM15のPe値を有意に低下させた(B). C-E. TSM15にGDNFを24時間作用させた後のTJ分子のmRNAレベル. TSM15にお

ける *claudin-5* (C), *occludin* (D), *ZO-1* (E) の mRNA レベルを RT-PCR で定量化し、標的遺伝子/G3PDH 比で示した。データは 6 回の PCR の平均 ( $\pm$ SD) で示した。F,G. 抗 GDNF 中和抗体を添加した HSMPT-CM が TSM15 の TEER 値とデキストランの透過性に与える影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). 抗 GDNF 中和抗体を含む HSMPT-CM は有意に TEER 値を低下させ (F), 有意に Pe 値を増大させた(G).

Figure 8

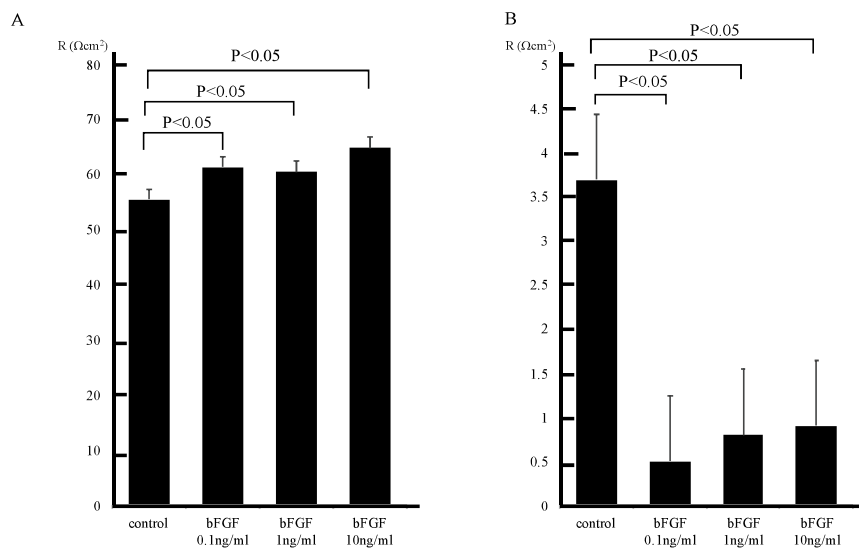


Figure 8

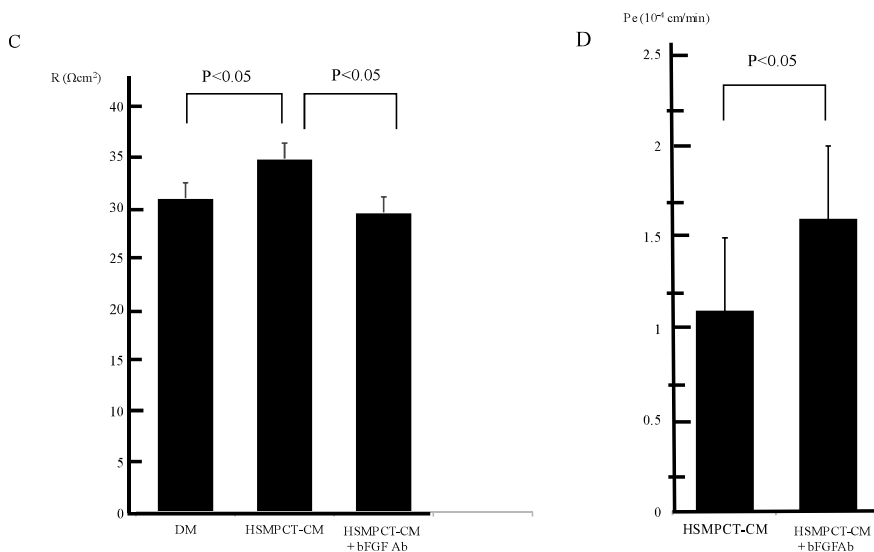




Fig.8.

A,B. bFGF が TSM15 のバリア機能に与える影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). bFGF (0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 10ng/ml) は TSM15 の TEER 値を有意に増加させた (A). bFGF (0.1ng/ml, 1.0ng/ml, 10ng/ml) は TSM15 の Pe 値を有意に低下させた (B). C,D. 抗 bFGF 中和抗体を添加した HSMPT-CM が TSM15 の TEER 値とデキストランの透過性に与える影響(mean  $\pm$  SD, n=6 in each condition). 抗 bFGF 中和抗体を含む HSMPT-CM は有意に TEER 値を低下させ (C), 有意に Pe 値を増大させた(D).

#### 第四章 考察

ペリサイトは隣接する微小血管内皮細胞と密接に結合し、内皮細胞の周囲を取り囲む血管周囲細胞である。骨格筋ペリサイトは骨格筋の再生、分化、血管形成、線維化、脂肪沈着、異所性骨形成に関与すると報告されており、多面的な機能があることが知られている (Birbrair et al, 2014)。本研究は、筋内鞘微小血管内皮細胞のバリア機能を高めるという骨格筋ペリサイトの新たな機能を提示することとなった。

線維芽細胞増殖因子 (FGFs) は主に中胚葉と神経外胚葉由来の細胞に働きかけ、細胞の増殖、分化、移動、生存を誘導する機能を有している (Itoh et al, 2011)。FGF family 蛋白の中で、bFGF は細胞分裂促進因子としての作用を持ち、組織の修復と再生において重要な生物学的役割を果たしている (Shi et al, 2016)。ラット骨格筋の深部組織障害モデルにおいて、障害された皮下の近傍に bFGF を注入すると細胞増殖と組織の血管新生を促進し、コラーゲンの沈着を抑制し、骨格筋マーカーの MyHC と myogenin の発現を増加させるとされている (Shi et al, 2016)。このことは bFGF が障害された筋の再生を促進していることを示唆している。一方、我々の結果は骨格筋ペリサイトが放出した bFGF が筋内鞘微小血管内皮細胞の障害された TJ を修復する可能性を示している。既報告と本研究の結果から、皮膚筋炎に罹患した骨格筋への bFGF の局所注入は、障害された TJ

を修復し、筋線維の再生を促進するという点で、新たな皮膚筋炎の治療法開発の足掛かりになりうることが示された。

グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) はトランスフォーミング増殖因子  $\beta$  の一つであり、当初、中脳のドーパミン作動性ニューロンの生存因子として同定された (Lin et al, 1993)。GDNF の添加が神経の生存期間延長に関与していること、またパーキンソン病におけるドーパミンニューロンや、さらに筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) における運動ニューロンを保護し修復していることが報告されている (Gill et al, 2003; Shere et al, 2006; Wang et al, 2002; Klein et al, 2005)。一方で、GDNF は BBB や血液網膜関門 (blood-retinal barrier: BRB) においてアストロサイトから分泌されているという報告がある (Utsumi et al, 2000; Igarashi et al, 2000)。さらに、GDNF は脳および末梢神経のペリサイトから分泌され、ヒト BBB および BNB において内皮細胞のバリア機能を高めると報告されている (Shimizu et al, 2012)。今回の実験で我々は GDNF が骨格筋ペリサイトから分泌され、筋内鞘微小血管内皮細胞のバリア機能を高めることを示した。障害された骨格筋への局所的な GDNF の注入も、皮膚筋炎のような筋疾患において有用であるかもしれない。単層の内皮細胞を通過し、ペリサイト膜に到達し、GDNF 分泌活性を増強させる小さな疎水性物質が見つければ、皮膚筋炎の新たな薬剤の候補になるであろう。

第一章で述べた通り、骨格筋微小血管内皮細胞株である TSM15 は BBB や BNB を構成する内皮細胞と同様に TJ 分子を発現しており、BBB から得られた血管内皮細胞株である TY10 と同程度のバリア機能を有していた (Sano et al, 2017)。しかし、Kennedy らは、骨格筋微小血管は末梢神経の神経内膜内微小血管に比し高い透過性を示す、すなわち骨格筋微小血管のバリア機能は BBB や BNB を構成する微小血管のバリア機能より脆弱であると報告している (Kennedy et al, 1979)。骨格筋微小血管内皮細胞株である TSM15 と BBB 由来の TY10 株のバリア機能が同等であるとする我々の *in vitro* の実験

結果と、*in vivo*での骨格筋微小血管のバリア機能がより脆弱であるという齟齬はどこから生じるのであろうか。我々は、骨格筋と脳や末梢神経では微小血管内皮細胞を取り巻く細胞や環境が異なることがその原因になっているものと推察する。アストロサイトは液性因子を分泌することで脳微小血管内皮細胞株のバリア機能を強めると報告されている (Kim et al, 2006; Balabanov et al, 1998)。加えて、最近の報告ではペリサイトもまた BBB と 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; Shimizu et al, 2012)。BBB を構成する血管は内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトから構成されているが、神経内膜および筋内鞘の微小血管は内皮細胞、ペリサイトから構成されている。また、重要なことは、ラットにおいてペリサイトと内皮細胞の数の比は網膜では 1 : 3、脳では 1 : 5、肺では 1 : 10 であり、バリア構成組織でのペリサイトの内皮細胞に対する比率が多いことが知られている (Balabanov et al, 1998.)。一方で、骨格筋ペリサイトと内皮細胞の比は約 1 : 100 であったと報告されている (Shepro et al, 1993)。本研究で骨格筋ペリサイト自体は BBB や BNB のペリサイトと同様に微小血管内皮細胞のバリア機能を高める作用があることが明らかになった。しかし、骨格筋では内皮細胞に対するペリサイトの数が圧倒的に少ないことが、骨格筋微小血管が BNB 構成微小血管よりもバリア機能が脆弱な原因になっているものと考えられた。

骨格筋の微小循環障害は皮膚筋炎以外の様々な筋疾患でも重要視されている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは血管内皮細胞の腫脹と基底膜の肥厚が観察され、酸素や溶質の筋線維への拡散・供給が障害されていると報告されている (Miike et al, 1987)。筋内鞘の微小血管の障害が疾患の進行過程に關与するこれらの筋疾患の病態解明には、我々が樹立した TSM15 や HSMPTCT といった *in vitro* ヒト筋内鞘微小血管内皮モデルは必須のツールであり、筋ジストロフィーや皮膚筋炎のような様々な筋疾患の新たな治療法の確立に有用であると考えられた。

## 第五章 結語および将来への展望

ヒト骨格筋ペリサイトから放出される GDNF や bFGF という液性因子が、筋内鞘の微小血管内皮細胞のバリア機能を高めることが明らかになった。罹患筋への GDNF や bFGF の注入は皮膚筋炎の新たな治療法になりうる可能性がある。

その一方で、骨格筋微小血管にも TJ は存在し、かつ P 糖蛋白を発現している (Sano et al, 2017) ことから、骨格筋への薬物送達に関する研究も進展させていく必要がある。骨格筋ペリサイトの機能を脂溶性の低分子化合物を通じて無力化させ、骨格筋微小血管内皮細胞同士の TJ を破綻させる、あるいは微小血管内皮細胞に発現する P 糖蛋白などのトランスポーターを siRNA などで阻害する、などの戦略を用い、罹患した筋肉により多くの薬物を届けるという試みも想定される。

筋内鞘の微小血管の障害が疾患の進行過程に関与する難治性筋疾患の病態解明には、我々が樹立した TSM15 や HSMPCCT といった *in vitro* ヒト筋内鞘微小血管モデルは必須のツールであり、筋ジストロフィーや皮膚筋炎のような様々な筋疾患の新たな治療法の確立に重要な役割を担うことが期待される。

## 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前田敏彦先生、清水文崇先生、藤澤美和子先生、本田真也先生、竹下幸男先生、古賀道明先生、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. 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.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010; 468:557-61.
- Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res.* 1998; 53: 637-44.
- Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, et al. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 245.
- Emslie-Smith AM, Engel AG. Microvascular changes in early and advanced dermatomyositis: a quantitative study. *Ann Neurol.* 1990; 27: 343-56.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003; 9: 589-95.
- Haruki H, Sano Y, Shimizu F, et al. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J Neurol Sci.* 2013; 331: 136-144.
- Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem.* 2004; 89: 503-13.
- Hosoya K, Takashima T, Tetsuka K, et al. 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.* 2000; 8: 357-370.
- Igarashi Y, Chiba H, Utsumi H, et al. Expression of receptors for glial cell line-derived

neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struct Funct.* 2000; 25: 237-41.

Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem.* 2011; 149: 121-30.

Kennedy WR, Yoon KS. Permeability of muscle spindle capillaries and capsule. *Muscle Nerve.* 1979; 2:101-8.

Kim JH, Kim JH, Park JA, et al. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39: 339-45.

Klein SM, Behrstock S, McHugh J, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther.* 2005; 16: 509-21.

Kusters YH, Barrett EJ. Muscle microvasculature's structural and functional specializations facilitate muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016; 310: E379-87.

Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurones. *Science.* 1993; 260: 1130-1132.

Maeda M, Shimizu J. Pathological features in polymyositis and dermatomyositis. *J Clin and Exp Med.* 2011; 239: 41-46 (in Japanese).

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

Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, et al. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J Cell Physiol,* 2007; 210: 81-86

Sano Y, Shimizu F, Abe M, 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: 519-28.

Sano H, Sano Y, Ishiguchi E et al. Establishment of a new conditionally immortalized human skeletal muscle microvascular endothelial cell line. *J Cell Physiol.* 2017; 232: 3286-95.

Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993; 11: 1031-8.

Sherer TB, Fiske BK, Svendsen CN, Lang AE, Langston JW. Crossroads in GDNF therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006; 21: 136-41.

Shi H, Xie H, Zhao Y, et al. Myoprotective effects of bFGF on skeletal muscle injury in pressure-related deep tissue injury in rats. *Burns Trauma.* 2016; 4: 26.

Shimizu F, Sano Y, Maeda T 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.

Shimizu F, Sano Y, Abe M, 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: 255-66.

Shimizu F, Sano Y, Saito K, et al. 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; 37:401-09.

Tigges U, Welser-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res.* 2012; 84: 74-80.

Utsumi H, Chiba H, Kamimura Y, et al. Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279: C361-8.

Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, et al. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2002; 22:6920-8.