1型糖尿病モデルマウスの脳小血管における周皮細胞被覆率の低下

関 根 有 美
新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野
（主任：西澤正豊教授）

Decrement of the Pericyte Coverage of Brain Small Vessels in Type 1 Diabetes Mellitus Model Mice

Yumi SEKINE

Department of Neurology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science Cource for Molecular and Cellular Medicine/ Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology (Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要　旨

糖尿病は，糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症，糖尿病性末梢神経障害を引き起こす．この病態機序の背景には血液臓器関門機能の障害がある．一般に血液臓器関門は，内皮細胞，それを取り囲む周皮細胞，グリア細胞にて構成される．糖尿病性網膜症では，このうち，周皮細胞の喪失が重要とされる．神経系では主として末梢神経障害について論じられている．しかし，糖尿病が認知症や Alzheimer 病の発症リスクとなることから，血液脳関門も同様に障害されることが推定されるが，その研究，特に，周皮細胞の障害についての研究は進んでいない．そこで，本研究では，1型糖尿病モデルマウスを用い，脳小血管障害について，病理学的に検討した．

方法として，streptozotocin の投与により1型糖尿病モデルマウスを作成し，1か月後に脳標本を作製し，免疫蛍光染色を行った．大脳皮質・海馬・線条体でレーザー共焦点顕微鏡により画像を取得し，3次元画像を構築して定量解析を行った．周皮細胞障害は小血管内皮細胞を取り囲む周皮細胞の体積比率（被覆率）を，血管内皮細胞障害は形態学的変化と体積を，血液脳関門の機能障害は，血漿成分 fibrinogen の血管壁への沈着と，同部位の活性化ミクログリアを，定量的に解析した．

その結果，大脳皮質では，周皮細胞の被覆率が低下し，内皮細胞障害，fibrinogen の血管壁への沈着と活性化ミクログリアの肥大化を認めた．海馬でも，周皮細胞の被覆率の低下と，fibrinogen の血管壁への沈着を認めたが，内皮細胞障害と活性化ミクログリアの肥大化は認めなかった．一方，線条体では，いずれの変化も認めなかった．

以上の結果から，本研究では，1型糖尿病モデルマウスの脳小血管で，周皮細胞被覆率の低下と，fibrinogen の血管壁への沈着を伴うことを示し，周皮細胞の被覆率の低下が，本モデルの脳小血管障害の早期の変化であることを示した．周皮細胞の喪失は，糖尿病における網膜小血管

Reprint requests to: Yumi SEKINE
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585　新潟市中央区旭町通1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科学教室　　関 根 有 美

の障害でも早期に認めることから，高血糖による小血管障害の普遍的な機序である可能性がある．一方，脳の部位により，高血糖に対する小血管の脆弱性は異なり，小血管障害には脳内で多様性があることが示された．高血糖下での周皮細胞の脆弱性に関わる分子病態機序の解明は，糖尿病における小血管障害の治療標的に繋がることが期待される．

キーワード：pericyte coverage, cerebral small vessel, diabetes mellitus, blood brain barrier, active microglia, endothelial cell

はじめに

糖尿病では，糖尿病性網膜症，糖尿病性腎症，糖尿病性神経障害が3大合併症に挙げられる．これらの病理学的主病変は小血管であり，小血管の関門機能の障害があると考えられている．この中で糖尿病性網膜症では，小血管障害により，血液網膜関門（Blood - retinal barrier: BRB）の障害を来す[1]．網膜の小血管は，内皮細胞，周皮細胞，Müller細胞により構成されるが，この内，高血糖モデルマウスの網膜の小血管では，周皮細胞の障害が早期の指標とされる[1]．周皮細胞は，血管平滑筋細胞と同じく壁細胞に属し，血管内皮細胞の外周囲を取り囲むように存在する細胞であるが，この取り囲む体積の割合（被覆率）が低下するとされる．周皮細胞は内皮細胞とのN - cadherinによる接着により刺激され，angiopoietin1を分泌する．内皮細胞は，この刺激により血小板由来増殖因子受容体βを分泌する．これらが両者の生存，機能維持に寄与する[2]．周皮細胞の障害は，この相互の機能維持機構を破綻させ，関門の障害を引き起こす．

糖尿病性の神経障害については，主に末梢神経にて研究が進められてきた．末梢神経にも，周皮細胞と血管内皮細胞による血液神経関門（Blood - Nerve Barrier: BNB）が存在する．周皮細胞は，グリア細胞由来神経栄養因子や塩基性線維芽細胞増殖因子などのサイトカインを分泌し，BNB機能に関わるclaudin - 5の発現を亢進させる[3]．しかし，糖尿病性末梢神経障害では，周皮細胞が終末糖化産物に曝され，これらのサイトカインの分泌が減少しclaudin - 5の発現が低下する．さらに周皮細胞からのTGF - β等の分泌が亢進し，細胞外基質の産生が増加して，基底膜が肥厚する[4)5]．このように糖尿病では，周皮細胞の障害による関門機能障害が病態に深く関与している．

一方，糖尿病が中枢神経障害を引き起こすことも，疫学的な研究により推測されている．耐糖能異常および糖尿病患者では，思考速度や柔軟性が低下すること[6)7]，糖尿病が認知症やAlzheimer病の危険因子となることが報告されている[8)9]．しかし，その病態に関しては明らかにされていない．中枢神経にも関門組織として血液脳関門（Blood - brain barrier: BBB）が存在している．BBBは内皮細胞，周皮細胞，アストロサイトにより構成される．中枢神経系では，末梢神経系に比して，周皮細胞がより多く存在し，BBBの機能維持にBNBより重要な役割をはたしていると考えられている[10)－13]．実際，近年，遺伝子改変動物による研究で，周皮細胞の数の低下のみで血液脳関門の機能が低下することが示された[14)15]．しかし，糖尿病による脳の小血管の周皮細胞の変化，脳小血管病変については，十分に検討されていない．

本研究では，1型糖尿病モデルマウスを用い，脳小血管障害の有無を，脳小血管構成細胞である周皮細胞や内皮細胞の形態的変化，およびBBBの障害，ミクログリアの活性化の側面から，大脳皮質・海馬・線条体にて定量的に検討し，高血糖が中枢神経系の周皮細胞に与える影響と，その機能障害の有無について検討した．

材料と方法

１．モデルマウスの作製方法と組織サンプルの採取

１型糖尿病モデルマウスは，２か月齢の C57BL/6 JJcl 系統マウス（n＝3）に対し，streptozotocin (STZ) を投与することにより作製した．STZ は膵臓の β 細胞を破壊することにより，β 細胞のインスリン産生を障害し，１型糖尿病を誘発する．対照群として，３ヶ月齢の C57BL/6 JJcl マウス (n＝3) を日本クレア株式会社より購入した．本研究では，１型糖尿病モデルマウスを作製する際に，初回は STZ 60 mg/kg，その 10 日後に２回目の STZ 250 mg/kg を腹腔内投与した．２回目の STZ を投与した後，数日以内には全てのマウスの血糖値が 300 mg/dl 以上に上昇した．血糖の上昇後，持続的に多飲と多尿を呈した．インスリンによる血糖の補正は行わずに，高血糖状態を維持した．飼育用の固型飼料と飲水を常時，自由に摂取できる状態にした．室温は 21 ～ 26 ℃の間で推移し，照明は 12 時間毎に規則的に点灯・消灯する環境で飼育した．２回目の STZ を投与した１ヶ月後に，糖尿病モデルマウスと対照群のマウスを同時に灌流固定した．吸入麻酔薬のハロセンで痛み刺激に反応しなくなる深度まで麻酔した後に開胸し，ヘパリンを加えた Hank's Balanced Salt Solution（gibco）を用いて，流速 3 ml/min で潅流した．次に，4 % paraformaldehyde（Wako）を用いて，同じ流速 で潅流固定した．摘出した脳を，4 % paraformaldehyde で一晩後固定した．固定した脳をマウス用ブレインスライサーに入れ，冠状断方向に forebrain から midbrain までを 5mm の厚さで cutting した．この脳を 12 well dish に入れ，トリス緩衝生理食塩水（150mM NaCl, 10mM Tris - HCl, pH 7.5）で溶解した 4 %アガロースゲルを用いて包埋した．VT1000S Vibrating Blade Microtome（Leica）を用いて，40 μm の厚さに冠状断方向で薄切し，リン酸緩衝液（phosphate - buffered saline: PBS, pH 7.4）を分注した 24 well dish の中に入れた．使用しない切片は，不凍液 (40 % PBS, 30 % Ethylene Glycol, 30 % Glycerol) に入れ，－ 20 ℃で保存した．

２．免疫組織化学染色

一個体当たり線条体を含むレベルと海馬を含むレベルの，合計２枚の脳切片を用いて染色を行った．まず，不凍液を取り除くために，PBS の中で 10 分間の洗浄を６回繰り返した．ブロッキング剤 (1 % BSA（bovine serum albumin, SIGMA)，5 % normal swine serum（VECTOR)，0.5 % Triton X - 100）を PBS で希釈して作製した．抗体はこのブロッキング剤で希釈して調整した．洗浄した脳切片をブロッキング剤の中に浸漬させ，4 ℃で一晩ブロッキング処理を行った．１次抗体反応は，4 ℃で２晩１次抗体の中に浸漬させせて行った．血管内皮細胞マーカーとして，Dylight 594 conjugate tomato lectin（VECTOR, DL - 1177，希釈倍率 1: 100，この抗体は２次抗体反応時に使用）と Rat monoclonal anti - mouse CD31（PECAM - 1) antibody（histonova, DIA310，希釈倍率 1: 50)，周皮細胞マーカーとして，Rat monoclonal anti - mouse CD13 antibody（AbD, MCA2183，希釈倍率 1: 20)，ミクログリアマーカーとして，Rabbit anti Iba - 1 antibody（Wako, 019 - 19741，希釈倍率 1: 500)，血漿成分の血管外漏出を検出する目的で，polyclonal rabbit anti - Human fibrinogen antibody（Dako, A0080，希釈倍率 1: 250）を用いた．１次抗体反応後，PBS で 10 分間の洗浄を６回繰り返した．２次抗体は，PECAM1 と CD13 に対しては Dylight 488 anti rat IgG（Jackson Immuno Research, 712 - 545 - 153，希釈倍率 1: 100）を，fibrinogen と Iba - 1 に対しては Alexa 594 anti rabbit IgG（invitrogen, A - 11008，希釈倍率 1：200）をブロッキング剤で調整し，4 ℃で一晩２次抗体反応を行った．PBS で 10 分間の洗浄を６回繰り返し，Mounting medium with DAPI（VECTOR, H - 1200）を用いて封入した．全ての標本に対して，LSM510 レーザー共焦点顕微鏡 (ZEISS) を用いて，脳切片の大脳皮質・海馬・線条体の３部位を，拡大倍率 40 倍で観察した．Z - stack 機能を用いてレイヤー枚数 60 枚をスキャンし，画像を取得した．これらを用いて画像解析ソ

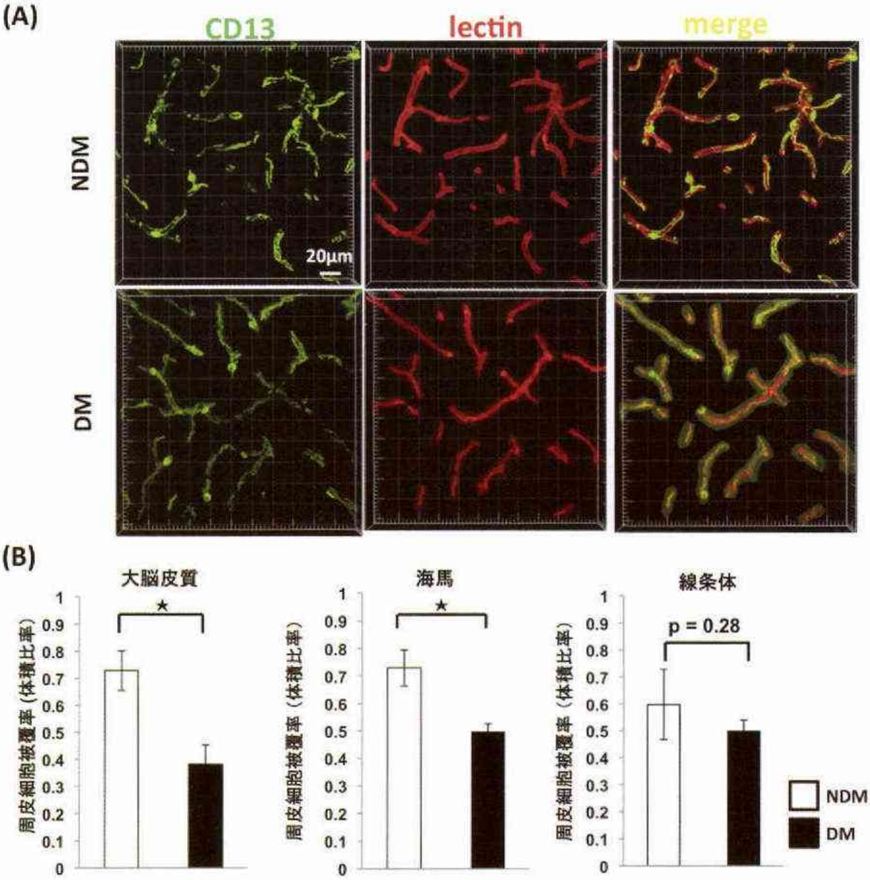

図1　高血糖下では脳小血管の周皮細胞被覆率が低下する

（A）免疫組織化学染色による，高血糖状態で1ヶ月間経過した3ヶ月齢の1型糖尿病モデルマウス（diabetes mellitus: DM mice, n = 3）と，対照となる同月齢のマウス（nondiabetes mellitus: NDM mice, n = 3）の大脳皮質の脳小血管における，血管内皮細胞（lectin; red）と，血管内皮細胞を取り巻く周皮細胞（CD13; green）の観察. Scale bar は 20 μm に相当する.

（B）大脳皮質と海馬における脳小血管の周皮細胞被覆率は，DM mice（black bar）が NDM mice（white bar）に比べて有意に低下していた. 血管内皮細胞（lectin 陽性領域）の体積に対する，血管内皮細胞を覆う周皮細胞の体積（CD13 陽性領域）の比率を周皮細胞被覆率として算出した. マウス一個体につき，大脳皮質・海馬・線条体部位を左右両半球で1ヶ所ずつ，合計2ヶ所を共焦点顕微鏡で撮影し，画像解析ソフトで3D画像を構築して解析を行った. 結果は，平均値±標準誤差で表記した. DM と NDM の各群とも n = 3 で，Student's t-test により検定を行い，DM と NDM の各群で有意差のついた結果に対し，*$p < 0.01$ と表記した.

フト Imaris（v6.2.0, Bitplane）により，3D画像を作製した.

3．定量的解析

周皮細胞の定量的解析は，3D画像内の血管内皮細胞（lectin 陽性領域）の体積と，その血管内皮細胞を覆う周皮細胞（CD13 陽性領域）の体積を測定し，内皮細胞体積に対する周皮細胞体積の比率を求め，周皮細胞被覆率を算出し，対照群と比較した. 内皮細胞は3D画像当たりの PECAM-1 陽性領域を内皮細胞体積として測定し，対照群と比較した. 血漿成分の漏出の定量化については，

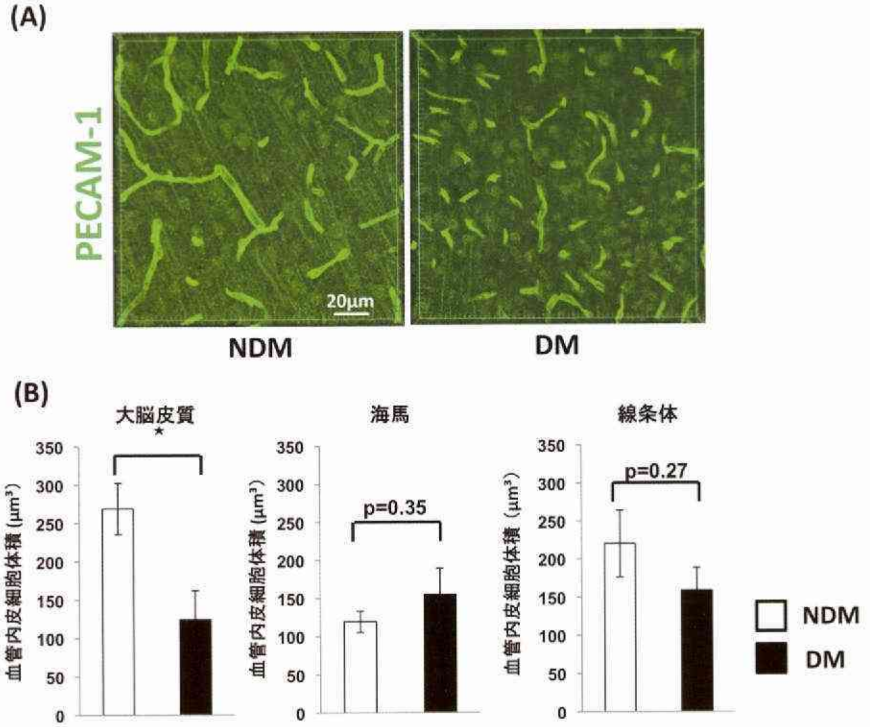

図２　高血糖下では脳小血管の内皮細胞が障害される

(A) 免疫組織化学染色による，高血糖状態で１ヶ月間経過したDM mice（n＝3）と，NDM mice（n＝3）の大脳皮質の脳小血管における，血管内皮細胞（PECAM1; green）の形態の観察．NDM（左）とDM（右）で，脳小血管の血管径，血管壁の形状と血管長に違いを認めた．Scale barは20 μmに相当する．

(B) 大脳皮質における脳小血管の体積（μm^3）は，DM mice（black bar）がNDM mice（white bar）に比べて有意に減少していた．脳小血管の体積は，血管内皮細胞（PECAM－1陽性領域）の体積（μm^3）を計測した．マウス一個体につき，大脳皮質・海馬・線条体部位を左右両半球で１ヶ所ずつ，合計２ヶ所を共焦点顕微鏡で撮影し，画像解析ソフトで3D画像を構築して解析を行った．結果は，平均値±標準誤差で表記した．DMとNDMの各群ともn＝3で，Student's t－testにより検定を行った．DMとNDMの各群で有意差のつく結果に対し，*$p < 0.05$と表記した．

3D画像内の脳小血管壁に沈着したfibrinogen陽性領域の体積を測定し，対照群と比較した．ミクログリアの活性化については，3D画像内のIba－1陽性領域の体積を測定し，そこに存在するミクログリアの数で割り，ミクログリアの一細胞当たりの体積として算出し，対照群と比較した．

４．統計解析

糖尿病モデルマウスと対照群各々の組織のデータは，student's t－testで検定を行い，$p < 0.05$を有意差ありとした．データは平均値±標準誤差で表示した．

結　　果

１．高血糖下における脳小血管の周皮細胞被覆率の検討

まず，脳小血管での周皮細胞の被覆率（周皮細胞が内皮細胞を取り囲んでいる割合）を検討した（図1A）．周皮細胞の被覆率は，大脳皮質と海馬に

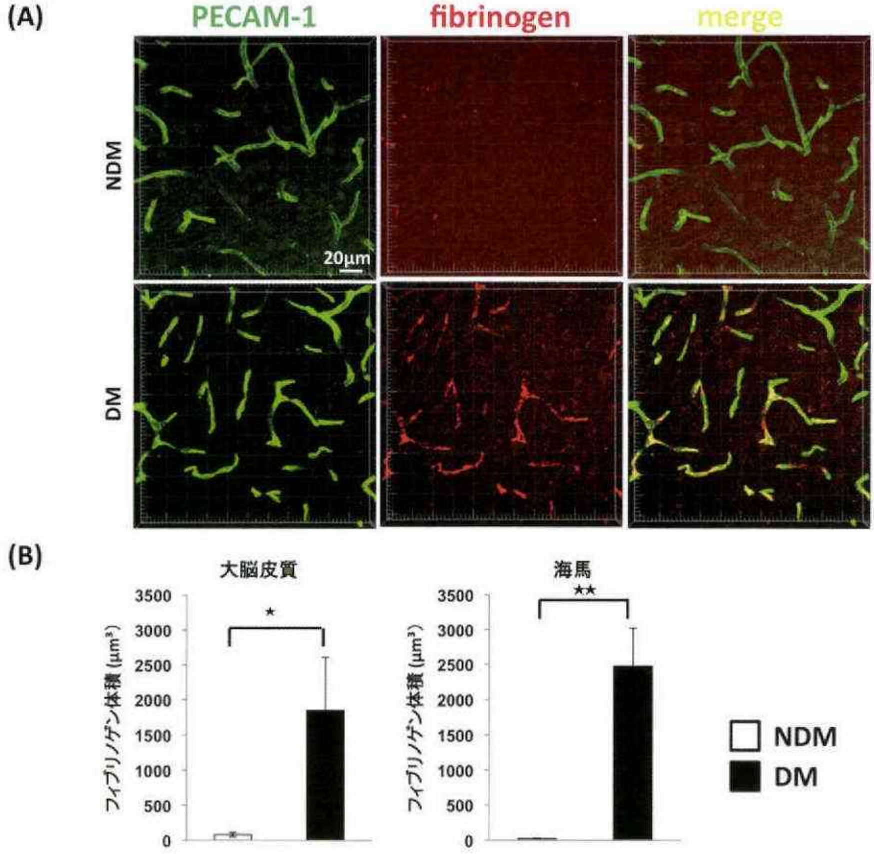

図3　高血糖下では脳小血管壁に血漿成分が沈着する

(A) 免疫組織化学染色による，高血糖状態で1ヶ月間経過したDM mice（n = 3）とNDM mice（n = 3）の，脳小血管壁への血漿成分フィブリノゲンの沈着を観察した．内皮細胞（PECAM1; green）が成す血管壁に血漿成分（fibrinogen; red）が沈着する様子が，DM mice（n = 3）で認められた．Scale barは20 μmに相当する．

(B) 大脳皮質・海馬の2部位の脳小血管において，脳小血管壁に沈着するフィブリノゲンの体積（μm^3）は，DM mice（black bar）がNDM mice（white bar）よりも優位に増加していた．フィブリノゲンの体積は，fibrinogen陽性領域の体積を計測した．マウス一個体につき，大脳皮質と海馬部位を左右両半球で1ヶ所ずつ，合計2ヶ所を共焦点顕微鏡で撮影し，画像解析ソフトで3D画像を構築して解析した．結果は，平均値±標準誤差で表記した．DMとNDMの各群ともn = 3で，Student's t-testにより検定を行った．DMとNDMの各群で有意差のつく結果に対し，$*p < 0.05$，$**p < 0.01$と表記した．

おいて，糖尿病モデルマウスで対照マウスに比して有意に低下していた（$p < 0.01$）．しかし線条体では，有意差を認めなかった（$p = 0.28$）（**図1B**）．

2．高血糖下における脳小血管の形態的変化の有無の検討

次に，脳小血管の形態的な変化を内皮細胞の蛍光免疫染色にて血管壁を染色し検討した．糖尿病モデルマウスの大脳皮質内の脳小血管では，血管壁に凹凸があり，血管径は不均一となり，血管の先端に途絶や先細りが見られ，血管長が短くなっていた．一方，対照群では，血管壁に凹凸はなく血管径が均一で，血管長が保たれていた（**図2A**）．両群の内皮細胞の密度を比較するため，取得した

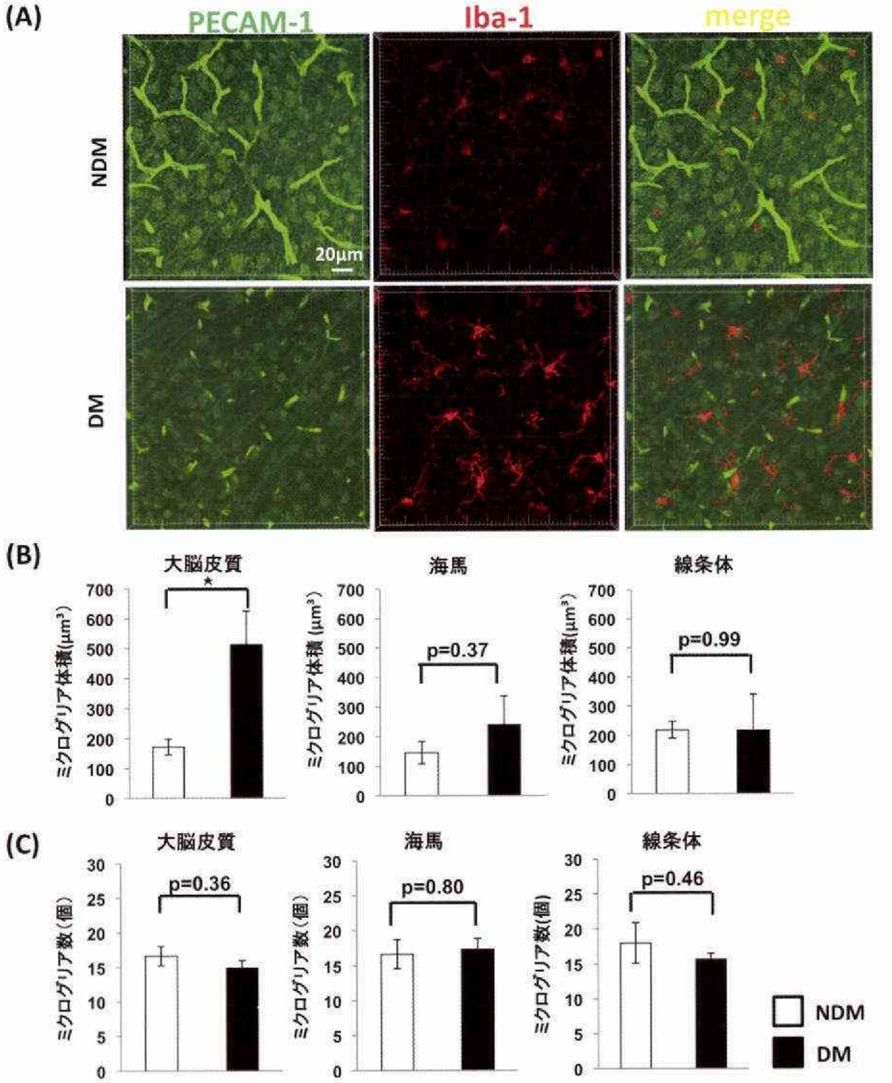

図4　高血糖下では脳小血管周囲のミクログリアが活性化される

(A) 免疫組織化学染色による，高血糖状態で1ヶ月間経過したDM mice（n = 3）とNDM mice（n = 3）の，脳小血管周囲のミクログリアの活性化を観察した．血管内皮細胞（PECAM1; green）の周囲に，DM miceの大脳皮質では，活性化ミクログリア（Iba - 1; red）を認めた．Scale barは20 μmに相当する．

(B) 大脳皮質部位の脳小血管の周囲において，活性化ミクログリアの体積（μm^3）は，DM mice（black bar）の方が，NDM mice（white bar）に比べて，有意に増加していた．活性化ミクログリアの体積は，一つの3D画像上に存在するIba1陽性領域の体積を計測し，その画像内に存在するミクログリアの個数を数え，その個数で画像全体のIba1陽性領域の体積を割り，算出した．大脳皮質・海馬・線条体部位の左右両半球で1ヶ所ずつ，合計2ヶ所を共焦点顕微鏡で撮影し，画像解析ソフトで3D画像を構築して解析した．結果は，平均値±標準誤差で表記した．DMとNDMの各群ともn = 3で，Student's t - testにより検定を行った．DMとNDMの各群で有意差のつく結果に対し，$^*p < 0.05$と表記した．

(C) ミクログリア細胞の個数を数えると，大脳皮質・海馬・線条体部位のいずれにおいても，DM mice（black bar）とNDM mice（white bar）で差は認められなかった．

一つの3D画像あたりのPECAM1陽性領域の体積を測定した（**図2B**）．糖尿病モデルマウスの脳小血管の体積は，大脳皮質において，対照に比べ46％と有意に減少していた（$p < 0.05$）．海馬，線条体領域では両群に差は認めなかった（海馬：$p = 0.35$，線条体：$p = 0.27$）．

3．高血糖下でのBBB機能障害の検討

脳小血管のBBB機能の障害の有無について検討した．血漿成分であるfibrinogenで免疫染色を行い，脳組織に漏出し沈着したfibrinogenの体積を対照群と比較した．その結果，糖尿病モデルマウスの脳小血管壁にはfibrinogenが沈着していたが，対照群ではほぼ沈着していなかった（**図3A**）．脳小血管壁に沈着したfibrinogenの体積は，大脳皮質では24倍（$p < 0.05$），海馬では105倍（$p < 0.01$）と対照群に比べて有意に増加していた（**図3B**）．

4．高血糖下での脳小血管周囲でのミクログリアの活性化の検討

BBBが機能障害に陥り，fibrinogenが漏出すると，ミクログリアがそれを感知し，活性化される[16]．そこで，活性化ミクログリアマーカーであるＩba-1により蛍光免疫染色を行い，活性化ミクログリアを観察した．糖尿病モデルマウスの脳小血管周囲には，対照群と比べＩba-1に対する染色性の高い活性化ミクログリアが認められ，その胞体は大きく，分枝は太く変化していた（**図4A**）．ミクログリア一細胞あたりの体積は，大脳皮質において，糖尿病モデルマウスが対照群に比べて増大していた（$p = 0.015$）（**図4B**）．しかし，脳単位体積当たりのミクログリアの数は，いずれの部位でも対照群と比べて差はなかった（**図4C**）．

考　　察

本研究は，高血糖モデルマウスの脳小血管で，周皮細胞の被覆率が低下し，BBB機能が低下することを初めて示した．周皮細胞の異常は，糖尿病モデルマウスの網膜小血管でも早期に生じる所見であり，高血糖による小血管障害の普遍的な機序である可能性がある[17]．高血糖が周皮細胞の被覆率の低下を引き起こす分子病態機序としては，網膜の小血管の研究から次の様な経路が唱えられている．①高血糖により引き起こされる活性酸素種がNF-κBの活性化を介しp38αMAPKを活性化し，周皮細胞のapoptosisを導く[18]，②プロテインキナーゼCδの活性化，p38αMAPKの活性化，プロテインチロシンキナーゼホスファターゼSHP-1の発現の増加により，血小板由来増殖因子受容体βの不活化を来し，周皮細胞死を導く[18]，③終末糖化産物に曝された周皮細胞が，TGFβを自己分泌し，細胞外マトリックスが増加し，周皮細胞の変性および基底膜の肥厚を生じる[19]．今後，脳小血管においても，これらの可能性につき検討を加える必要がある．

次に本研究では，脳の部位によって，高血糖に対する小血管の脆弱性が異なることを示した（**表1**）．この3部位の中で，大脳皮質が高血糖に対して最も脆弱であり，線条体が最も抵抗性が高かった．この理由について，解剖学的，分子生物学的に考察を加える．まず，解剖学的側面から考察すると，大脳皮質の小血管は，中大脳動脈，前大脳動脈，後大脳動脈，内頚動脈から分岐した軟膜血管より枝分かれする浅在性穿通枝に由来する．軟膜血管は脳表において，複雑な吻合ネットワークを形成する．さらに，軟膜血管と浅在性穿通枝は密接な神経支配を受けている[20]．一方，海馬，及び線条体の小血管は，大血管から直接分枝される．海馬は後大脳動脈から分岐する穿通枝が分布し，線条体は中大脳動脈から分岐する穿通枝より供給を受ける[21]．結果として，線条体の方が，海馬よりも短い穿通枝により供給されている．これらの解剖学的な相異が，高血糖下における脆弱性の差を生み出す可能性がある．

次に，周皮細胞の系統の違いの面から考察すると，周皮細胞は，脳の部位により2種類の起源をもつ．周皮細胞は，前脳部は神経外胚葉，それ以外の部位は神経中胚葉を起源とする[22)23]．今回検討した部位では，海馬の小血管のみが神経中胚葉起源とされる．つまり，同じ大血管から分岐す

表1 3部位の比較

	大脳皮質	海馬	線条体
1.血管内皮細胞変性	+	-	-
2.フィブリノゲン沈着	+	+	N.D.
3.ミクログリア活性化	+	-	-
4.周皮細胞被覆率低下	+	+	-

る穿通枝ではあるが，線条体と海馬では，周皮細胞の起源が異なり，その性質も異なる可能性がある．このことが，高血糖に対する脆弱性の相違に関与している可能性がある．

最後に，分子生物学的側面から考察すると，中枢神経系の血管内皮細胞のBBB機能は古典的Wntシグナルにより維持されている[24]．血管内皮細胞の古典的Wntシグナルが低下すると，血管内皮細胞のfenestrationが増加し，タイトジャンクション蛋白が減少し，BBB機能が低下する．一方，Wntシグナルが亢進すると，血管内皮細胞からPDGF-Bの分泌が亢進し，周皮細胞の増加とBBB機能の亢進を来す[25]．この古典的Wntシグナルの受容体は，脳の部位により多様性をもつ[24]．大脳皮質ではFrizzeled 4受容体のみを介する．一方，海馬や線条体では，Frizzeled 4受容体に加え，他の受容体も関与するため，Wntシグナルの低下を来しにくい．実際，Frizzeled 4受容体をノックアウトしたマウスでは，線条体ではBBB機能が保たれる[24]．このことも，皮質が高血糖に対して最も脆弱であり，線条体で最も抵抗性が強かった本研究の結果と合致する．これらの小血管の解剖学的，分子生物学的な多様性から，高血糖下における脳小血管の脆弱性の違いが生じる可能性がある．

周皮細胞の被覆率の低下を，大脳皮質と海馬で認めたのに比して，内皮細胞の障害は，大脳皮質のみで認めた．このことから周皮細胞の障害は，内皮細胞の障害に先行して生じると推察した．高血糖下における周皮細胞と内皮細胞の密接な関係は，網膜小血管にて指摘されている[26]．内皮細胞は，自身の生存を維持するために，血管内皮細胞増殖因子などの生存因子を自己分泌する．この分泌は周皮細胞との接触により誘導される．糖尿病性網膜症では，周皮細胞の喪失により，この内皮細胞生存因子の自己分泌が減弱し，内皮細胞死に陥る[26]．これらの事実は，脳においても，周皮細胞が内皮細胞の生存維持に重要である可能性を示唆している．

また，本研究で用いた糖尿病モデルマウスでは，形態的に内皮細胞の障害が明らかになっていない海馬の脳小血管においても，fibrinogenの沈着が認められた．fibrinogen等の血漿タンパク質の血管壁への沈着は，一般にBBBの障害の初期病変と考えられ[27]，内皮細胞の形態的な障害のない海馬でもBBB機能障害は既に始まっていると考えた．海馬では，既に周皮細胞の被覆率の低下が認められた．このことは，BBBの機能障害が，周皮細胞の被覆率の低下のみで生じることを示している．BBB機能における周皮細胞の重要性については，近年，内皮細胞特異的にヒトの変異型pdgfbを発現させたトランスジェニックマウスを用いた研究により明らかになってきた[14]．本マウスの脳小血管では，病理学的に周皮細胞の減少

のみが起こる早期の障害を示すが，既にBBBの機能障害を来し，周皮細胞の障害のみでBBB機能が障害されることが示された[14)15)]．今回の研究結果は，遺伝子改変を行わないマウスにおいても同様に，周皮細胞がBBB機能維持に重要な役割を果すことを示すとともに，高血糖状態における脳の小血管障害の機序として周皮細胞の喪失が重要であることを示した．

BBBの機能障害は，ミクログリアの活性化を引き起こすと考えられる．しかし，本研究で使用した糖尿病マウスでは，fibrinogenの脳小血管壁への沈着を大脳皮質と海馬で認めたが，ミクログリアの活性化は大脳皮質においてのみ認めた．このことから，①ミクログリアの活性化は，fibrinogenの血管壁への沈着のみでは誘導されず，更にBBBの機能障害が進行し，他の物質の漏出が関与する可能性，もしくは，② fibrinogenの血管壁への沈着に対するミクログリアの反応性が脳の部位によって異なる可能性が推測される．後者については，実際，ミクログリアは脳の部位により，形態やmRNAの発現プロファイルが異なることが指摘されており，この仮説を支持する[28)]．ミクログリアは，炎症に寄与する一方で，brain - derived neurotrophic factorや glial cell - derived neurotrophic factorなどの神経栄養因子の分泌による神経保護作用を持つ[29)30)]．本研究で使用した糖尿病モデルマウスの大脳皮質で，活性化ミクログリアがどのように機能しているか，今後，検討を加える必要がある．

結　論

本研究では1型糖尿病モデルマウスの大脳において，周皮細胞被覆率の低下が早期に生じることにより，内皮細胞が変性し，BBBの透過性が亢進することを示した．またその反応性が部位により異なり，脳の小血管は多様性を示した．周皮細胞が高血糖により喪失するメカニズムの解明は，糖尿病の合併症に対する新たな治療標的に繋がると考えられる．

謝 辞

最後に，本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所　神経内科学分野　西澤正豊教授，野崎洋明先生，加藤泰介先生，同　分子神経疾患資源解析学分野　小野寺理教授に深謝致します．

参 考 文 献

1）Kim YH, Kim YS, Roh GS, Choi WS and Cho GJ: Resveratrol blocks diabetes - induced early vascular lesions and vascular endothelial growth factor induction in mouse retinas. Acta ophthalmol. 90: e31 - e37, 2012.

2）Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg - Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron - Maguire M, Gridly T, Wolburg H, Risau W and Qin Y: Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie - 1 and Tie - 2 in blood vessel formation. Nature 376: 70 - 74, 1995.

3）Shimizu F, Sano Y, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T and Kanda T: 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, 2010.

4）Shimizu F, Sano Y, Haruki H and 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 - β and vascular endothelial growth factor（VEGF）by pericytes. Diabetologia 54: 1517 - 1526, 2011.

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

6）Wessels AM, Rombouts SARB, Simsek S, Kuijer JPA, Kostense PJ, Barkhof F, Scheltens P, Snoek FJ and Heine RJ: Microvascular disease in Type 1 diabetes alters brain activation. A functional magnetic resonance imaging study. Diabetes 55: 334 - 340, 2006.

7）Jones DT: Neural networks, cognition, and diabetes: What is the connection? Diabetes 61:

1653 - 1655, 2012.
8) Kerti L, Witte AV, Winkler A, Grittner U, Rujescu D and Flöel A: Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. Neurology 81: 1 - 7, 2013.
9) Kondo F, Asanuma M, Miyazaki I, Kondo Y, Tanaka K, Makino H and Ogawa N: Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. Neurosci. Res. 39: 339 - 346, 2001.
10) Winkler EA, Bell RD and Zlokovic BV: Central nervous system pericytes in health and disease. Nature neuroscience 14: 1398 - 1405, 2011.
11) Benjamin LE, Hemo I and Keshet E: A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF - B and VEGF. Development 125: 1591 - 1598, 1998.
12) Dalkara T, Gursoy - Ozdemir Y and Yemisci M: Brain microvascular pericytes in health and disease. Acta Neuropathol 122: 1 - 9, 2011.
13) Daneman R, Zhou L, Kebede AA and Barres BA: Pericytes are required for blood - brain barrier integrity during embryogenesis. Nature 468: 562 - 568, 2010.
14) Armulik A, Genovë G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR and Betsholtz C: Pericytes regulate the blood - brain barrier. Nature 468: 557 - 562, 2010.
15) Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R and Zlokovic BV: Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. Neuron 68: 409 - 427, 2010.
16) Davalos D, Ryu JK, Merlini M, Baeten KM, Moan NL, Petersen MA, Deerinck TJ, Smirnoff DS, Bedard C, Hakozaki H, Murray SG, Ling JB, Lassmann H, Degen JL, Ellisman MH and Akassoglou K: Fibrinogen - induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. Nat. commun. 3: 1227 - 1241, 2012.
17) Hammes HP, Feng Y, Pfister F and Brownlee M: Diabetic retinopathy: Targeting vasoregression. Diabetes 60: 9 - 16, 2011.
18) Geraldes P, Hiraoka - Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS and King GL: Activation of PKC - δ and SHP - 1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. Nat med 15: 1298 - 1307, 2009.
19) Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414: 813 - 820, 2001.
20) Hamel E: Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. J Appl Physiol 100: 1059 - 1064, 2006.
21) Scremin OU and Holschneider DP: Chapter 14 Vascular supply. Watson C, Paxinos G and Puelles L: The Mouse Nervous System, Academic Press: 459 - 472, 2012.
22) Etchevers HC, Vincent C, Douarin NML and Couly GF: The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. Development 128: 1059 - 1068, 2001.
23) Kurz H: Cell lineages and early patterns of embryonic CNS vascularization. Cell Adhesion & Migration 3: 205 - 210, 2009.
24) Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM and Nathans J: Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. Cell 151: 1332 - 1344, 2012.
25) Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, Devraj K, Zinke J, Seidel S, Heck R, Thom S, Macas J, Bockamp E, Fruttiger M, Taketo MM, Dimmeler S, Plate KH and Liebner S: Endothelial Wnt/β - catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF - B expression. J Exp Med 209: 1611 - 1627, 2012.
26) Durham JT and Herman IM: Microvascular modification in diabetic retinopathy. Curr Diab Rep 11: 253 - 264, 2011.
27) Grinberg LT and Thal DR: Vascular pathology in the aged human brain. Acta Neuropathol. 119: 277 - 290, 2010.
28) Ren L, Lubrich B, Biber K and Gebicke - Haerter

PJ: Differential expression of inflammatory mediators in rat microglia cultured from different brain regions. Mol Brain Res 65: 198 - 205, 1999.
29) Nimmerjahn A, Kirchhoff F and Helmchen F: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308: 1314 - 1318, 2005.
30) Noda H, Takeuchi H, Mizuno T and Suzumura A: Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. J Neuroimmunol 256: 13 - 18, 2013.

（平成26年1月15日受付）