

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19513

研究課題名(和文) In vitroモデルによる自己免疫性中枢・末梢神経疾患の炎症細胞浸潤機構の解明

研究課題名(英文) Construction of new in vitro blood-brain barrier (BBB) and blood-nerve barrier (BNB) model that incorporates multi-culturing system of BBB or BNB components.

研究代表者

竹下 幸男 (TAKESHITA, Yukio)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：70749829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が樹立した温度条件不活化ヒト血液脳関門(BBB)・血液神経関門(BNB)構成細胞株を使用し、同一インサート上でのマルチ培養法を確立し、国内外で特許申請を行なった。さらに流速負荷型in Vitro系BBBモデルを使用し、視神経脊髄炎の患者血清が、アストロサイトから種々のサイトカインの発現を促進させ、それらのサイトカインが内皮細胞からのケモカイン産生を誘導し、リンパ球がBBBを浸潤する病態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We construct new Blood-Brain Barrier (BBB) and Blood-Nerve Barrier (BNB) model incorporating multi-cultured system of BBB or BNB specific laminin isoform and conditionally immortalized human BBB or BNB cell lines. Our models are the first in vitro BBB model to evaluate the crosstalk between BBB specific laminin and other BBB components. Next, we successfully generated the first multi-cultured BBB model that allows the transmigration of leukocytes under shear forces.

Using these models, we evaluated how Neuromyelitis optica (NMO)-IgG induced the leukocyte transmigration. NMO-IgG induces IL-6 in astrocytes via AQP4 and IL-6 signaling to ECs increases chemokines and drives leukocyte migration.

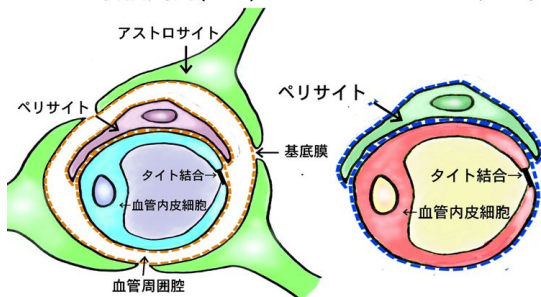
研究分野：神経免疫学

キーワード：Blood-Brain Barrier Blood-Nerve Barrier laminin Neuromyelitis optica transmigration

1. 研究開始当初の背景

中枢神経、末梢神経にはそれぞれ Blood-Brain Barrier (BBB), Blood-Nerve Barrier (BNB) が存在し、恒常的に異物や外敵の侵入を防いでいる。BBBは、脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトによって形成され、BNBは末梢神経内の血管内皮細胞とペリサイトで構成されている(図1)。多発性硬化症(MS)、視神経脊髄炎(NMO)をはじめとする自己免疫性中枢疾患や慢性炎症性脱髄性多発神経根炎(CIDP)などの自己免疫性末梢神経疾患では、様々な液性因子、自己反応性リンパ球により中枢・末梢神経のバリア機能が破壊され、中枢・末梢神経内に炎症が惹起される。しかし、こうした疾患では、十分な*In vitro*の実験系が確立されておらず、バリア機能の破壊機序や炎症細胞浸潤の具体的機序について不明な点が多く、新規治療法の開発には至っていない。

図1 血液脳関門(BBB) 血液神経関門(BNB)



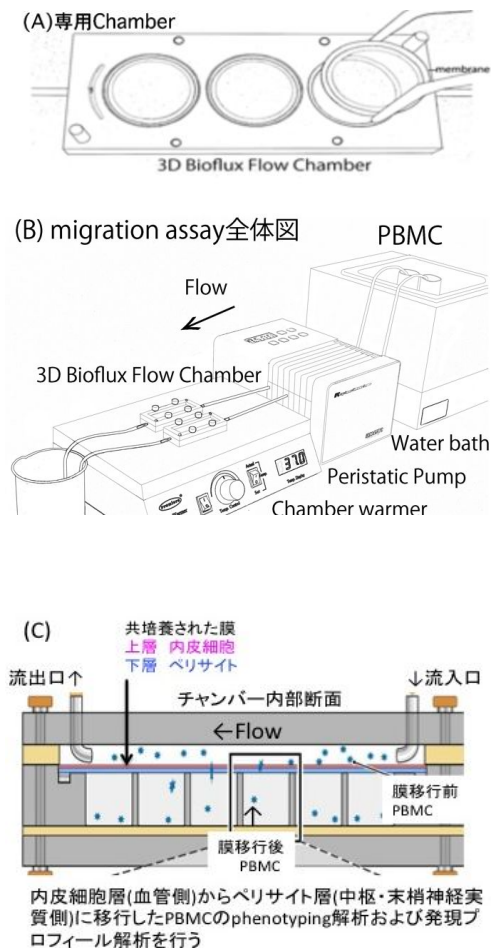
2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来のBBB、BNB構成細胞株(内皮細胞株、ペリサイト、アストロサイト)を用いて流速負荷型*In Vitro*系BBB、BNBモデルの構築を行い、それらのモデルを用いて代表的な難治性自己免疫性神経疾患である視神経脊髄炎の患者血清・白血球が炎症細胞浸潤やバリア機能に与える影響を検証し、疾患特異的な炎症細胞浸潤とバリア機能破壊の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

視神経脊髄炎患者の保存血清を、構築したBBBのモデル(図2A,B,C)に作用させた後、健常者の末梢血単核球細胞(PBMC)を専用のチャンバーに生理的流速負荷で流入させ migration assay を行った。膜外移行した免疫細胞をフローサイトメトリー法による phenotyping 解析と ELISA 法を用いたサイトカイン、ケモカインの発現プロファイル解析を行なった。最後に患者血清を用いた血管内皮細胞での接着因子の発現比較、バリア機能の評価、サイトカイン、ケモカインの発現プロファイル解析を行なった。

図2 流速負荷型 *In Vitro* 系 BBB モデル



4 . 研究成果

我々が樹立した温度条件不死化ヒトBBB・BNB構成細胞株を使用し、Nunc UpCell technologyによる同一インサート上でのマルチ培養法を確立し、国内外で特許申請を行なった。さらに流速負荷型in Vitro系BBBモデルを使用し、視神経脊髄炎の患者血清がアストロサイトから種々のサイトカインの発現を促進させ、それらのサイトカインが内皮細胞からのケモカイン産生を誘導し、リンパ球がBBBを浸潤する病態を明らかにした。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Effects of Neuromyelitis optica (NMO)-IgG at the blood-brain barrier in vitro.
Y Takeshita ,B Obermeier, AC Cotleur, SF Spampinato, F Shimizu, E Yamamoto, Y Sano, YJ Kryzer, VA Lennon, T Kanda, and R.M. Ransohoff. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 2017 4 (1) e311 査読有
- 2) Glucose-regulated protein 78 autoantibody associates with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica.
F shimizu, KL Schaller , GP Owens, AC Cotleur, D Kellner, Y Takeshita, (13 人中 6 番目) Sci Transl Med 2017 9 (397) e9111 査読有
- 3) Establishment of a new conditionally immortalized human skeletal muscle microvascular endothelial cell line.
H Sano, Y Sano, E Ishiguchi, F shimizu, M Omoto, T Maeda, H Nishihara, Y Takeshita, (11 人中 8 番目) J Cell Physiol 2017 232 (12) 3286-3295 査読有

4) Immunohistochemical analysis of laminin components in blood-nerve barrier and blood-brain barrier.

Y Takeshita, M Omoto, S Fujikawa, and T Kanda. Clin Exp Neuroimmunol 2017: 8; 49-53 査読有

5) Identification of galectin-3 as a possible antibody target for secondary progressive multiple sclerosis.

H Nishihara, F Shimizu, T Kitagawa, N Yamanaka, J Akada, Y Kuramitsu, Y Sano, Y Takeshita (13 人中 8 番目) Mult Scler. 2017:23; 382-394. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 竹下幸男 血液神経関門(BNB)におけるBNB特異的基底膜ラミニンの効果について第29回日本神経免疫学会総会 2017年

2) Yukio Takeshita The effect of blood-brain barrier (BBB)-specific laminins for barrier function with a new in vitro BBB model incorporating multi-culturing system of BBB components. XXIII World Congress of Neurology 2017年

3) Yukio Takeshita Construction of a new in vitro blood-brain barrier (BBB) model that incorporates triple-culturing system of BBB components. 69th American Academy of Neurology 2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称：血液脳関門インビトロモデルおよび血液脳関門インビトロモデルの作成方法

発明者：竹下 幸男、神田 隆

権利者：山口大学

種類：特許

番号：2016-081995

出願年月日：2016年4月15日

国内外の別：国内

名称：血液神経関門インヴィトロモデルおよびその製作方法
発明者：竹下 幸男、神田 隆
権利者：山口大学
種類：特許
番号：2016-081996
出願年月日：2016年4月15日
国内外の別：国内

名称：血液脳関門インヴィトロモデルおよび血液脳関門インヴィトロモデルの製作方法
発明者：竹下 幸男、神田 隆
権利者：山口大学
種類：特許
番号：PCT/JP2017/011361
出願年月日：2017年3月22日
国内外の別：国外

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 幸男 (TAKESHITA, Yukio)
山口大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：70749829

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし