

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07044

研究課題名(和文) 神経系血管バリアーの人為的調節に基づく難治性神経系疾患の新規治療法開発

研究課題名(英文) Establishment of new therapies for intractable neural diseases based on the artificial regulation of neural vascular barrier

研究代表者

池田 栄二 (Ikeda, Eiji)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30232177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞の細胞膜に局在するBasiginの詳細な解析により、高マンノース型糖鎖を有するBasiginのみを標的をすることにより、病的に開いた神経系血管バリアーを人為的に閉じることが可能であることが示された。一方、Basiginの内在性ligandであるCyclophilin A (CypA) の静脈内投与により、生理的状態の閉じた神経系血管バリアーが一過性かつ可逆性に開くことが示された。そして、CypA前投与により、水溶性薬剤の脳組織実質への到達が可能となることを示した。

上記研究成果は、副反応の少ない神経系血管バリアーの人為的調節戦略へと繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系血管バリアーの人為的調節により、血管バリアーが病的に開いた状態になることが病態悪化の中枢を担う多くの難治性神経疾患の病態解明と病態悪化阻害、閉じた状態にある血管バリアーの存在のため神経組織へ到達できない薬剤の神経組織への到達が可能となる。したがって、本研究成果は、いまだ有用な治療法のない多くの神経疾患に共通して適用可能な新規治療法開発へと繋がる意義ある知見であり、多くの神経疾患の難治性克服が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have focused our studies on Basigin to establish the procedure for artificial regulation of neural vascular barrier. As for the restoration of neural vascular barrier which is pathologically opened in neural diseases, we have obtained the data showing the availability of inhibitory reagents against Basigin. Furthermore, we were successful in narrowing down the target to Basigin with a specific type of glycan, which would lead to the artificial closing of pathologically opened barrier with minimal side effects. On the other hand, an intravenous injection of Cyclophilin A, a ligand of Basigin, has been shown to realize the transient as well as reversible opening of physiologically closed neural vascular barrier, which enhances the delivery of systemically administered drugs to parenchyma of neural tissues.

研究分野：病理学

キーワード：血液脳関門 Basigin Claudin-5

1. 研究開始当初の背景

神経組織の血管はバリアー機能を有し、組織微小環境を至適状態に維持している。その神経組織の血管が形成するバリアー(以下、神経系血管バリアー)の制御機構(「閉じた状態 開いた状態」の制御機構)については多くが不明のままであり、バリアーの人為的調節のための標的分子は特定されていなかった。我々は、神経系血管バリアーの制御機構解析を、まず低酸素刺激によりバリアーが開く機構に絞り解析を始めた。解析系としては、*in vitro*系では、マウス脳血管内皮細胞株 bEnd.3 を用い、その細胞単層の電気抵抗値(TEER)を血管バリアーの指標とした。*In vivo*系では、マウスに蛍光色素を投与し網膜組織内血管からの色素の漏れを透過性の指標とした。その結果、「低酸素刺激 血管内皮細胞の細胞膜からの Claudin-5 の消失 血管バリアーが開く」というカスケードを明らかにし報告した[Am. J. Pathol. 170, 1389-1397, 2007]。さらに解析を進め、「低酸素刺激 (*) 血管内皮細胞の細胞膜からの Claudin-5 の消失 血管バリアーが開く」に示す(*)に相当する分子として、バリアーを形成する血管内皮細胞に発現している細胞膜分子 a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 12、ADAM17、Basigin を特定し報告した[Sci Rep 5, 12796; doi: 10.1038/srep12796, 2015, 2016: Sci Rep 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445, 2016]。さらに、ADAM12 と ADAM17 は、低酸素刺激によって神経系血管バリアーが開く過程に比較的特化して働く分子であることが示された。一方、Basigin は、低酸素刺激のみならず炎症刺激など様々な刺激によって神経系血管バリアーが開く過程に共通して働く分子であることが明らかになった[Sci Rep 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445, 2016]。それらの解析結果に基づき、神経系血管バリアーを人為的に調節する手法確立を目指す我々は、Basigin が応用範囲の広い標的分子であると考え、Basigin を軸に研究を展開している。

2. 研究の目的

神経系血管バリアーが病的に開いた(破綻した)状態になることが病態悪化の中枢に位置する種々の難治性神経疾患が存在する。それらの神経疾患においては、病的に開いた神経系血管バリアーを人為的に閉じる(修復する)戦略が難治性克服に繋がる。一方、生理学的状態において閉じた状態にある神経系血管バリアーの存在は、治療薬の神経組織への到達のバリアーともなり、神経疾患治療一般において治療の障壁となっている。したがって、閉じた状態の神経系血管バリアーを人為的に開く戦略は神経組織への薬剤の到達を可能とし、多くの神経疾患の難治性克服に繋がる。本研究では、Basigin を標的分子とし神経系血管バリアーの人為的調節手法を確立し、難治性神経疾患の克服を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウス脳血管内皮細胞 bEnd.3 細胞(ATCC より購入)を正常酸素濃度下(20%O₂, 5%CO₂)あるいは低酸素濃度下(1%O₂, 5%CO₂, 30 min)、Endoglycosidase H(Endo H)刺激下(500 units/ml)、Peptide-N-Glycosidase F(PNGase F)刺激下(500 units/ml)、Cyclophilin A(CypA)刺激下(300 ng/ml)に培養した。培養液はDMEM/10%FBSを用いた。低酸素濃度下での培養には Oxygen-regulated incubator (ASTECC)を用いた。

(2) ウェスタンブロット解析

タンパク質 sample を Laemmli sample buffer (2-mercaptoethanol を含む)にて処理後、SDS-PAGE (12.5%)にて展開し、polyvinylidene difluoride membrane に転写した。Membrane を、1次抗体 rabbit polyclonal antibody against Basigin(1 µg/ml; Scrum)と反応させた。2次抗体は、horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG(1/1000 dilution; Dako)を用いた。そして、Amersham ECL prime (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) と反応させ、chemiluminescence signal を Amersham Imager AI600 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)にて検出した。

(3) 遺伝子導入

Basigin 特異的 small interfering RNA (siRNA) の導入には、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いた。培養 bEnd.3 細胞への siRNA 導入では、confluent 状態の bEnd.3 細胞の培養液に、siRNA の最終濃度が 10 nM となるように、混合液を添加した。

(4) 培養 bEnd.3 の蛍光免疫染色

bEnd.3 細胞を PBS で洗浄後、100% methanol で 5 分間、室温にて固定した。続いて、10% normal goat serum で 30 分間、室温にて前処理を行った。Claudin-5 単染色には、1次抗体 rabbit polyclonal antibody against Claudin-5(1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific)と一晚、4℃にて反応させた。その後、2次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(1/200; Thermo Fisher Scientific)と遮光下で 1 時間、室温にて反応させた。染色結果は、細胞膜における Claudin-5 発現レベルの定量解析も含め、焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss)にて評価した。

(5) bEnd.3 単層培養層の電気抵抗(TEER)測定

bEnd.3 単層培養層のバリアー機能の指標として電気抵抗(TEER)を測定した。bEnd.3 細胞を 0.4 mm 孔を有する cell insert 上にて培養し、細胞層の TEER を Millicell ERS Voltohmmeter (Millipore)を用いて測定した。

(6) Endo H 投与動物実験

マウス(C57BL/6J, 7 週齢、オス)の尾静脈内に Endo H (187,500 units/kg)を投与し、4 時間後からマウスを正常酸素濃度下あるいは低酸素濃度下(7-8% O₂)に 36 時間飼育し、網膜血管の透過性

を評価した。低酸素濃度下の飼育には、酸素濃度調節機能付き動物飼育装置 (DEUCE, Co., LTD.) を用いた。山口大学動物使用委員会の承認を得て行った。

(7) CypA 投与動物実験

マウス (C57BL/6J, 7 週齢, オス) の尾静脈内に CypA (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与し、3、6、24 時間後に網膜血管の Claudin-5 発現および透過性を評価した。また、CypA 投与の 3 時間後に Doxorubicin (DOX) (6.25 mg/kg) を尾静脈内投与し、3 時間後に脳組織、肝組織、腎組織への DOX の取り込みを評価した。山口大学動物使用委員会の承認を得て行った。

(8) マウス網膜組織の蛍光免疫染色

摘出した眼球を 4%PFA で 1 時間、4 にて固定した。1% Triton X-100 を含む 10% normal goat serum で 1 時間、室温にて前処理を行った後、1 次抗体 rabbit polyclonal antibody against Claudin-5 (1/25 dilution; Thermo Fisher Scientific) と一晚、4 にて反応させた。その後、2 次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1/200; Thermo Fisher Scientific) と遮光下で 3 時間、室温にて反応させた。染色結果は、焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) にて評価した。

(9) マウス網膜血管の透過性の評価

血管透過性評価のトレーサーとして、tetramethylrhodamine-conjugated lysine-fixable dextran (10 kDa) (Molecular Probes) および Hoechst stain H33258 (534 Da) (Sigma-Aldrich) を用いた。マウスの左心室内に上記トレーサーを投与後、網膜の進展標本を作製し、焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) で観察した。

(10) 組織への DOX 取り込みの評価

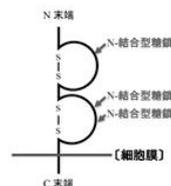
DOX 自家蛍光を利用し、組織実質 (脳、肝、腎) への DOX 取り込みを可視化するとともに定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 病的に開いた (破綻した) 神経系血管バリアーを人為的に閉じる (修復する) 手法の確立

我々は、Basigin に対する阻害戦略が、病的に開いた神経系血管バリアーを閉じる手法となることを既に報告している [Sci Rep 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445, 2016]。

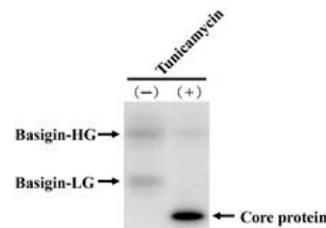
しかし、Basigin には、神経系血管バリアーへの関与とともに、神経細胞機能への関与など複数の重要な生理機能が知られている。したがって、Basigin 分子の非特異的な抑制や刺激は、重篤な副反応を生じる可能性が懸念される。そこで我々は、神経系血管バリアーという側面から Basigin 分子構造の詳細な解析を行った。



(図1) Basigin 分子の構造

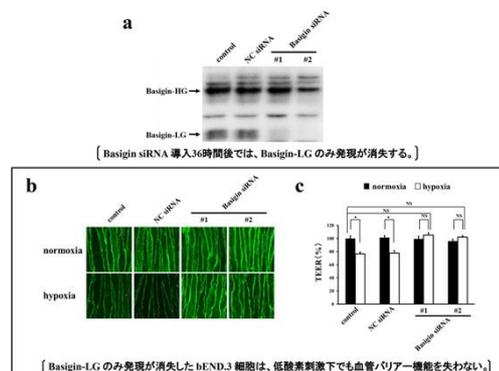
Basigin は、細胞外ドメインに 3 個の N-結合型糖鎖修飾部位 (図1) を有する糖タンパク質であり、Western blot 解析のバンドパターンとして高糖鎖修飾型 Basigin (Basigin-HG) と低糖鎖修飾型 Basigin (Basigin-LG) の存在が知られている。Basigin は、タンパク分解酵素 Matrix metalloproteinase (MMP) の発現誘導、白血球の血管内皮細胞への接着と血管外への遊走などいくつかの機能を有するが、それらは主として Basigin-HG に担われることが報告されている。

まず、我々が *in vitro* 実験系として用いた脳血管内皮細胞 bEnd.3 における Basigin 発現を解析したところ、Western blot 解析にてサイズの異なる 2 つの比較的幅のあるバンドが検出され、ともに糖鎖修飾阻害剤である Tunicamycin 存在下の bEnd.3 細胞では消失し core protein と判断される 1 つのバンドに集束したことから、各々が Basigin-HG と Basigin-LG に対応することが示され、両者の発現が確認された (図2)。



(図2) bEnd.3 細胞における Basigin 発現

我々は、*in vitro* 実験系において、Basigin 特異的 siRNA (#1, #2 の 2 種) の導入による Basigin 発現抑制系を用い、神経系血管バリアー制御への Basigin の関与を解析している。まず、siRNA 導入による Basigin 発現抑制状態を確認したところ、siRNA 導入 36 時間後では Basigin-LG の発現はほぼ完全に消失するのに対し Basigin-HG の発現レベルの有意な低下はみられなかった (図3a)。そして興味深いことに、その Basigin-LG のみ発現が消失した bEnd.3 細胞では、低酸素刺激下 (1% O_2 , 1 時間) においても細胞膜 Claudin-5 の有意な減少が検出されないこと (図3b)、バリアー形成能が失われないこと (図3c) が示された。

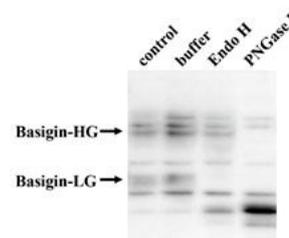


(図3) Basigin-LG のみ発現抑制された bEnd.3 細胞の低酸素刺激に対する反応

上記の結果から我々は、神経系血管バリアーの調節には少なくとも Basigin-LG は必須の分子であるという仮説を立てた。Basigin-LG が必須分子であれば、Basigin-LG のみを特異的標的とした神経系血管バリアーの人為的調節手法の確立が可能となり、Basigin の多くの生理機能を担っている

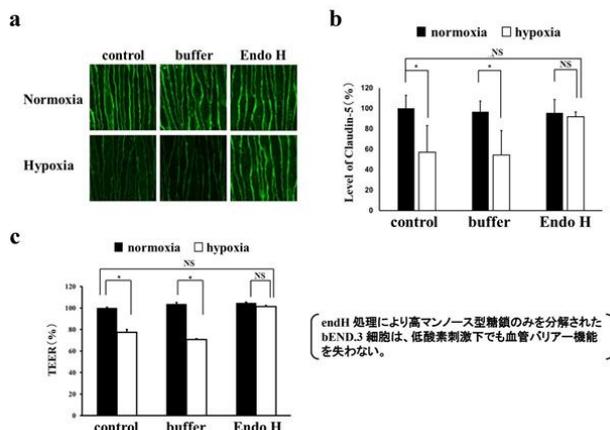
Basigin-HG の発現抑制により懸念される副反応を回避できる。

続いて我々は、Basigin-HG および Basigin-LG の糖鎖構造の検索を行った。bEnd.3 細胞に発現する Basigin の糖鎖構造について、Endoglycosidase H (Endo H) (高マンノース型糖鎖を分解する酵素) および Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) (N-結合型糖鎖を全て分解する酵素) を用い解析を行った結果、Basigin-HG の糖鎖は PNGase F により分解されるが Endo H では分解されないこと、Basigin-LG の糖鎖は PNGase F と Endo H の両方により分解されることが示された(図4)。すなわち、Basigin-HG と Basigin-LG の糖鎖はともに N-結合型糖鎖であること、Basigin-LG の糖鎖は高マンノース型糖鎖であることを明らかにした。



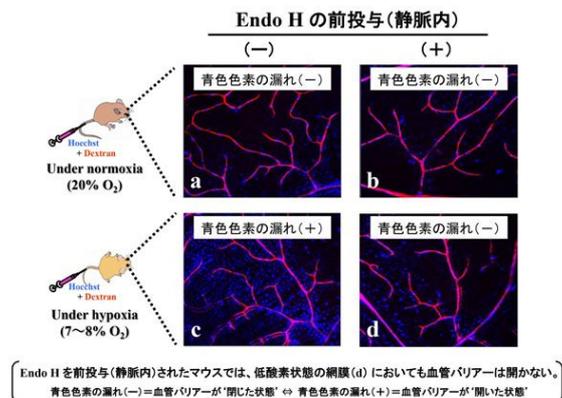
(図4) Basigin-LG = 高マンノース型糖タンパク質

Basigin-LG が、神経系血管バリアーの制御に必須の糖鎖修飾型 Basigin であるか否かを特定するため、*in vitro* 実験系において bEnd.3 細胞単層を Endo H と反応させた 1 時間後、低酸素刺激 (1% O₂, 1 時間) を加え、細胞膜の Claudin-5 発現レベルおよび細胞単層のバリアー形成能 (TEER 値) を解析した。その結果、Endo H 前処理された bEnd.3 細胞単層では、低酸素刺激下においても細胞膜 Claudin-5 の有意な減少が検出されないこと(図5a,b)、バリアー形成能が失われないこと(図5c)が示された。Basigin-LG が、神経系血管バリアーの制御に必須の分子であるということが証明された。



(図5) Endo H 処理された bEnd.3 細胞の低酸素刺激に対する反応性

さらに、上記の *in vitro* 実験系の解析結果が、*in vivo* 実験系でも再現されるかについて解析を行った。マウス尾静脈から Endo H を投与し、対照 (Endo H 投与なし) マウスとともに正常酸素環境下あるいは低酸素環境下 (7~8% O₂) で飼育後 (40 時間)、網膜血管の透過性の変化を観察した。Endo H 非投与マウスでは、低酸素状態の網膜において血管からの色素の漏れが検出された (血管バリアーが '開いた状態') のに対し、Endo H 投与マウスでは、低酸素状態の網膜においても血管からの有意な色素の漏れは検出されなかった (血管バリアーが '閉じた状態') (図6)。*In vivo* 実験系においても、Basigin-LG が神経系血管バリアー制御の必須分子であることが示された。



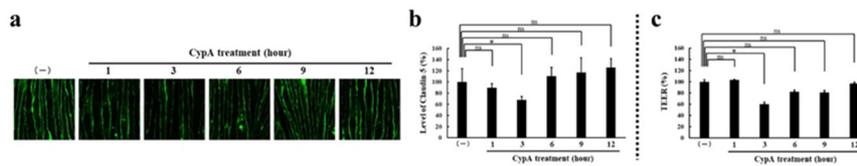
(図6) Endo H を前投与 (静脈内投与) されたマウスの網膜血管の低酸素刺激に対する反応性

上記解析結果からは、Basigin-LG を特異的標的とすることにより、副反応を極力抑え、'開いた状態'の神経系血管バリアーを人為的に '閉じた状態' にする (修復する) 手法の確立が期待される。興味深く有意義な研究成果と考えられる。

(2) 神経系血管バリアーを人為的かつ可逆的に開く手法の確立

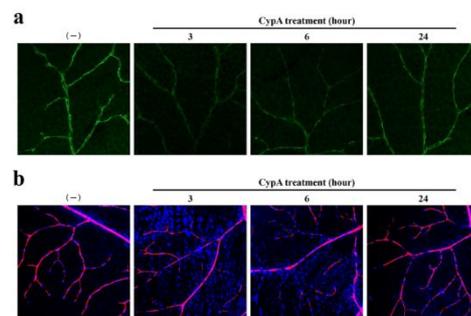
我々は、Basigin が、低酸素刺激のみならず炎症刺激など様々な刺激によって神経系血管バリアーが開く過程に共通して働く分子であることを明らかにし報告した [Sci Rep 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445, 2016]。そして、Basigin の阻害により、'開いた状態'の神経系血管バリアーを人為的に '閉じた状態' にすることが可能であることを示した。本解析では、逆に Basigin の刺激により、'閉じた状態'の神経系血管バリアーを人為的に '開いた状態' にすることが可能ではないかとの仮説を立て研究を進めた。単層培養した bEnd.3 細胞の培養上清に Basigin の ligand である Cyclophilin A (CypA) を添加し、bEnd.3 細胞における Claudin-5 の発現変化を蛍光免疫染色にて経時的に観察し(図7a)、その細胞膜上の Claudin-5 シグナルを定量化した(図7b)。その結果、CypA 投与 3 時間後に細胞膜上の Claudin-5 レベルが有意に低下すること、しかし 6 時間後には CypA 刺激前のレベルまで回復することが示された(図7a,b)。さらに、bEnd.3 細胞単層の電気抵抗 (TEER; 血管バリアー機能の指標) を経時的に測定したところ、細胞膜上の Claudin-5 レベルと相関を示し、CypA 投与 3 時間後にバリア

一形成能の有意な低下が起こり、6時間後には CypA 刺激前の状態まで回復した(図7c)。これらの結果は、CypA の1回投与と刺激により、一過性かつ可逆的に bEnd.3 細胞単層のバリアーが開くという興味深い知見と考えられる。



(図7) CypA 刺激下の bEnd.3 細胞における Claudin-5 発現および TEER の経時的変化

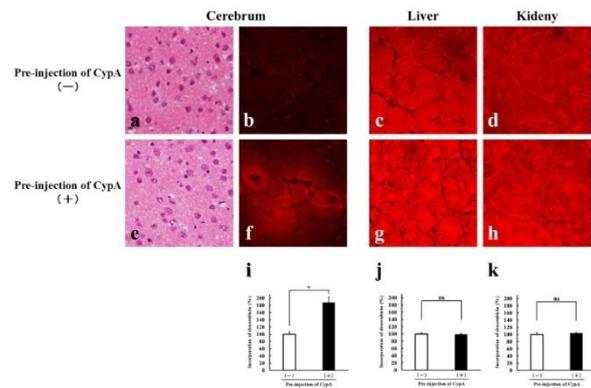
続いて、*in vitro* 系において得られた上記知見が、*in vivo* 系においても再現されるかについて解析を進めた。マウスの尾静脈から CypA (200 μg/kg) を投与し、網膜微小血管内皮細胞における Claudin-5 の発現変化を蛍光免疫染色にて経時的に観察した(図8a)。さらに、CypA 投与後、蛍光色素投与により網膜微小血管の透過性(血管バリアーが開いた指標)を経時的に評価した(図8b)。CypA 投与3時間後には微小血管内皮細胞の細胞膜における Claudin-5 発現レベルが有意に低下し、6時間後には回復傾向がみられ、24時間後には CypA 投与前のレベルまで回復した(図8a)。微小血管の透過性の変化についても、Claudin-5 発現動態と良く相関していた。すなわち、CypA 投与3時間後には微小血管からの色素(青色)の有意な漏れ(血管バリアーが開いたこと)が観察されたが、24時間後には有意な色素の漏れは検出されず CypA 投与前の状態まで回復した(図8b)。



(図8) CypA を静脈内投与されたマウスの網膜血管における Claudin-5 発現および透過性の経時的変化

上記から、CypA を静脈内に1回投与することにより、一過性かつ可逆的に神経系血管バリアーを開くことが可能であることが示された。

上記の知見に基づき、我々は、CypA 投与を併用することにより、静脈内投与された Doxorubicin (DOX; 神経系血管バリアーは通過できない薬剤)を神経組織実質に到達させるかについて検討した。‘CypA 前投与なしのマウス’および‘前投与ありのマウス’に、DOX を静脈内投与し、3時間後に DOX の大脳組織実質への取り込みを観察した(図9)。CypA 前投与は、DOX 投与の3時間前に行った。また、DOX の神経組織実質への取り込みの評価には、DOX が放つ蛍光を利用した。その結果、血管にバリアー機能がない肝(図9c, g)および腎(図9d, h)では、‘CypA 前投与なしのマウス’‘前投与ありのマウス’ともに顕著な DOX 蛍光シグナルが検出され、両マウス間では DOX 蛍光シグナルに有意な差はみられなかった(図9j, k)。一方、‘CypA 前投与なしのマウス’の大脳組織実質(図9a, HE 染色所見; b, DOX 蛍光所見)には有意な DOX 蛍光シグナルが検出されないのに対して、‘前投与ありのマウス’の大脳組織実質(図9e, HE 染色所見; f, DOX 蛍光所見)には有意な DOX 蛍光シグナルが検出された。これらの結果は、CypA 前投与により、静脈内投与された DOX が神経系血管バリアーを通過し神経組織実質に到達したことを示すものである。



(図9) CypA 前投与による DOX(静脈内投与)の脳、肝、腎への取り込み変化

上記解析結果は、CypA の併用により、通常では神経系血管バリアーを通過できない薬剤を神経組織実質に到達させることが可能であることを示す興味深く意義ある知見と考えられる。

< 引用文献 >

Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E: Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* 170:1389-1397, 2007

Cui D, Arima M, Takubo K, Kimura T, Horiuchi K, Minagawa T, Matsuda S, Ikeda E: ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. *Sci Rep* 5:12796, 2015 doi:10.1038/srep12796

Arima M, Cui D, Kimura T, Sonoda KH, Ishibashi T, Matsuda S, Ikeda E: Basigin can be a therapeutic target to restore the retinal vascular barrier function in the mouse model of diabetic retinopathy. *Sci Rep* 6, 38445; doi: 10.1038/srep38445,2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田栄二、崔 丹、白濱つづり、仲田成美
2. 発表標題 神経系血管バリアー機能異常と疾患
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 崔 丹、仲田一本田成美、松田達志、池田栄二
2. 発表標題 Cyclophilin A による神経系血管バリアーの人為的開口
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田栄二
2. 発表標題 神経系血管バリアー機能の人為的制御への挑戦 - 難治性神経疾患の病態解明と新規治療法確立に向けて -
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	崔 丹 (Cui Dan) (40346549)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------