

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390268

研究課題名（和文） 血液神経関門の人為的改変：難治性末梢神経疾患新規治療法開発へのアプローチ

研究課題名（英文） Artificial control of blood-nerve barrier: an approach toward the novel therapeutics of intractable human peripheral nervous system disorders

研究代表者

神田 隆 (KANDA TAKASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40204797

研究成果の概要（和文）：研究代表者の教室で世界に先駆けて樹立したヒト血液神経関門構成細胞株を用い、ヒト末梢神経疾患での血液神経関門(BNB)破壊メカニズムを検討した。ヒト免疫性末梢神経疾患患者の一部では、血清成分に BNB を破壊させる因子が含まれることが証明された。また、糖尿病性ニューロパチーで血清に高値となる AGE は、VEGF と TGFβ を介して BNB を破壊することが明らかとなった。バリアー構成内皮細胞膜に局在するトランスポーターは、新規治療の標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the molecular mechanisms of blood-nerve barrier (BNB) malfunction in various neuropathies, using immortal cell lines of human BNB origin recently established in our laboratory. Sera from some group of patients with inflammatory neuropathies can destroy BNB. Advanced glycation end-products (AGE), the late products of non-enzymatic glycation increased in diabetic condition, are shown to impair BNB via upregulation of VEGF and TGFβ. Various transporters in the membrane of barrier-forming endothelial cells can be a appropriate target toward the novel therapeutics of intractable human peripheral nervous system disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：血液神経関門、トランスポーター、血管内皮細胞、血管周細胞、末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系のバリアーシステムである血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)は脳微小血管内皮細胞、血管周細胞、神経膠細胞の3者から構成されている。とくに BBB の首

座と考えられている脳微小血管内皮細胞については、研究代表者の施設をはじめ国内外の複数の研究施設から不死化細胞株が樹立されており、同細胞を用いた BBB の分子レベルの研究は臨床応用にまで達している。た

例えば、現時点で多発性硬化症に対し最も有効な薬剤の1つであるナタリズマブ (Tysabri®)は、リンパ球側に発現する接着因子である VLA-4 に対する抗体製剤であり、血液脳関門でのリンパ球侵入を阻止することが多発性硬化症の重要な治療戦略となりうることは、実験室レベルを超えて臨床の場ですでに明らかになっていることである。

一方、末梢神経系のバリアーである血液神経関門(blood-nerve barrier, BNB)は、分子的研究においても機能的・生理学的研究においても BBB 研究に大きく遅れをとっている。研究代表者は 90 年代半ばからウシ馬尾を材料として BNB 由来内皮細胞の分離を試み、いくつかの成果を上げてきたが、神経内科学の臨床家としてはヒト難治性自己免疫性末梢神経障害の治療への寄与が最終目的であり、*in vivo*の性質をよく把持したヒト BNB 構成細胞株の樹立は長い間の念願であった。10 年近くにわたる試行錯誤の末、ようやく 2007 年から 2008 年はじめにかけてラットおよびヒトの BNB 由来不死化細胞株 (末梢神経神経内膜微小血管由来内皮細胞と同血管周細胞) がすべて研究代表者の教室で確立したことを契機に、本研究計画を提案するに至った。BNB の細胞生物学的・分子生物学的研究は、研究代表者の業績を除いては国内外とも全く手をつけられていない領域であった。

2. 研究の目的

- (1) ヒト BNB 機能タンパクを解析し、各種末梢神経障害での BNB 障害機構を解明する。
- (2) ヒト BNB に発現するトランスポーターの解析とトランスポーター機能改変に基づく臨床応用を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 研究代表者の教室で樹立したヒト BNB 由来内皮細胞不死化株およびペリサイト不死化株を用いた。両者の共培養と単独培養の 2 条件を設定し、各種自己免疫性末梢神経疾患患者血清、AGE 等の同培養細胞株への影響を、①claudin-5, occludin の 2 者の蛋白量と各種サイトカインの発現を指標とした生化学的解析、②TEER を中心とした BNB バリアー機能解析、の 2 つの手法で評価した。
- (2) バリアー構成内皮細胞の細胞膜に発現する各種トランスポーター機能を、各種阻害薬を用いてアッセイした。BNB 構成細胞での実験結果が不安定であり、同じく研究代表者の教室で樹立したヒト BBB 由来内皮細胞不死化株 (TY09) を用いた実験を並行して行った。

4. 研究成果

- (1) ヒト BNB 機能蛋白の解析と BNB 構成ヒ

ト不死化細胞を用いた各種自己免疫性ニューロパチー血清の BNB に対する効果の検証

① multifocal motor neuropathy (MMN) 多数例に関する解析を行い、MMN 症例の血清は BNB 機能蛋白 (claudin-5) の量的減少をきたし、TEER を減少させる効果を有すること、これらの過程を通じて BNB 機能を脆弱化させる効果を有することを明らかにした。Claudin-5 の量的減少と TEER 減少は並行しており、BNB でのバリアー機能は claudin-5 によって規定されているものと考えられた。

② フィッシャー症候群患者血清、ピッカースタッフ型脳幹脳炎患者血清ともに BNB 構成細胞に対する影響はなく、この 2 疾患の臨床表現型はピッカースタッフ脳幹脳炎患者血清のみがもつ BBB 破壊効果によって規定されることが明らかとなった。

③ AGE をヒト BNB 構成細胞に投与し、糖尿病性ニューロパチーでの BNB 異常に関する以下の実験結果を得た。i)AGE は BNB 構成内皮細胞の VEGF を増加させる。また、血管周細胞から paracrine に放出される VEGF が近接する内皮細胞に作用し、BNB のバリアー機能が低下する。ii)AGE は血管周細胞からの TGFβ を介して基底膜肥厚をきたす。VEGF と TGFβ が糖尿病性ニューロパチーにおける BNB 破壊の key molecule であることが証明された。

これらの一連の実験から、研究代表者の教室で樹立したヒト BNB 由来不死化細胞株は、ヒト末梢神経障害での BNB 機能異常を鋭敏に捉える bioassay システムとして極めて有用であることが立証できた。

(2) トランスポーター蛋白の機能的阻害による BNB 機能の改変

研究代表者らが開発した BBB 由来内皮細胞を用いて、ABCG2 の阻害剤である novobiocin、MRP-1 の阻害剤である MK-571 および p-glycoprotein (p-gp) の阻害剤である verapamil を用い、これらの transporter が Aβ40 の BBB 由来内皮細胞からの汲みだしに関与しているか否かを解析する予備実験を施行した。MK-571 および verapamil は Aβ40 の輸送に影響を及ぼさなかったが、novobiocin 使用下で Aβ40 の BBB 由来血管内皮細胞への取り込みの増大が認められた。ABCG2 は Aβ の脳側から血液側への BBB を介した排出に関与していると考えられた。

本実験の結果から、トランスポーターを操作する事による BBB 機能改変は可能であること、同技術は BNB にも直接応用が可能であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 29 件)

- ①Fumitaka Shimizu, Takashi Kanda他5名 (7番目) : Sera from neuromyelitis optica patients disrupt blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 288-297, 2012. 査読有
- ②Fumitaka Shimizu, Takashi Kanda他2名 (4番目) : Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase in the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res* 37: 401-409, 2012 査読有
- ③Masatoshi Omoto, Takashi Kanda他9名 (11番目) : Autosomal dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation. *Neurology* 2012, in press. 査読有
- ④清水文崇、齋藤和幸、神田 隆 : 多発筋炎・皮膚筋炎の発症機序と動物モデル. *血管内皮異常*. *Clinical Neuroscience* 30: 306-308, 2012. 査読無
- ⑤ Fumitaka Shimizu, Tetsuya Terasaki, Takashi Kanda 他 4 名 (6, 7 番目) : 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, 2011. 査読有
- ⑥Yasuteru Sano, Takashi Kanda: Isolation and properties of endothelial cells forming the blood-nerve barrier. *Methods Mol Biol* 686: 417-425, 2011. 査読有
- ⑦Yoko Kashiwamura, Takashi Kanda 他 6 名 (8 番目) : Hydrocortisone enhances the function of blood-nerve barrier through the up-regulation of claudin-5. *Neurochem Res* 36: 849-855, 2011. 査読有
- ⑧Fumitaka Shimizu, Takashi Kanda他2名 (4番目) : 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. 査読有
- ⑨Michiaki Koga, Takashi Kanda他3名 (5番目) : A serological analysis of viral and bacterial infections associated with neuromyelitis optica. *J Neurol Sci* 300: 19-22, 2011. 査読有
- ⑩西原秀昭、神田 隆他4名 (6番目) : IgG4 関連自己免疫性膵炎による膵腫大を呈した POEMS症候群. *臨床神経学*51: 417-421, 2011. 査読有
- ⑪竹下幸男、神田 隆他4名 (6番目) : 感覚障害を主徴とし、免疫グロブリン静注療法によ
- りすみやかに改善した遠位型慢性炎症性脱髄性ニューロパチーの46歳男性例. *臨床神経学*51: 478-482, 2011. 査読有
- ⑫清水文崇、安部真彰、神田 隆 : 糖尿病性末梢神経障害の病態解明に向けたヒト血液神経関門in vitroモデルの作製. *Peripheral Nerve* 22: 57-63, 2011. 査読有
- ⑬神田 隆 : 慢性脱髄性多発神経炎(CIDP)の治療. *日本医事新報* 4523: 26-27, 2011. 査読無
- ⑭古賀道明、神田 隆 : 免疫性末梢神経障害の抗体療法. *神経治療学* 28: 139-143, 2011. 査読無
- ⑮神田 隆 : 血液神経関門 update. *BRAIN and NERVE* 63: 557-569, 2011. 査読無
- ⑯神田 隆 : 血液脳関門・血液神経関門の破綻. *Neuroinfection* 16: 87-95, 2011. 査読無
- ⑰清水文崇、神田 隆 : ここまでわかった多発性筋炎、皮膚筋炎. *血管内皮異常*. *医学のあゆみ* 239: 58-62, 2011. 査読無
- ⑱柏村陽子、神田 隆他4名 (6番目) : Thalidomide単独投与が奏効し、血中M蛋白が消失したPOEMS症候群の55歳男性例. *神経治療* 27: 585-590, 2010. 査読有
- ⑲Yasuteru Sano, Tetsuya Terasaki, Takashi Kanda他9名 (7, 12番目) : 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 2010. 査読有
- ⑳神田 隆 : 血液脳関門・血液神経関門. 特集免疫性神経疾患—新たな治療戦略へ向けて. *内科* 105: 846-851, 2010. 査読無
- ㉑神田 隆 : 血液脳関門の分子機構. *内皮細胞を中心に*. *分子脳血管病* 9: 251-256, 2010. 査読無
- ㉒神田 隆 : CIDP の治療選択. *Current Insights in Neurological Science* 18(2): 8-9 2010. 査読無
- ㉓Michiaki Koga, Takashi Kanda 他 3 名 (5 番目) : Neuromyelitis optica with HTLV-1 infection: different from acute progressive HAM? *Int Med* 48: 1157-1159, 2009. 査読有
- ㉔Sonobe Y, Kanda T 他 9 名 (9 番目) : Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase Cepsilon-dependent manner. *J Biol Chem* 284: 31834-31842, 2009. 査読有
- ㉕Tetsuo Kubota, Takashi Kanda 他 7 名 (4 番目) : Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome. An attractive

target for the NF-k-B-specific inhibitor DHMEQ. Ann NY Acad Sci 1173: 137-145, 2009. 査読有

②⑥ Takashi Kanda: Usefulness of sural nerve biopsy in genomic era. Neuropathology 29: 502-508 2009. 査読無

②⑦ 佐野泰照, 神田 隆: 血液神経関門の形態と機能. 臨床脳波 51: 32-36, 2009. 査読無

②⑧ 神田 隆: 血液神経関門の破綻と修復のメカニズム. 神経免疫学 17: 269-275 2009. 査読無

②⑨ 神田 隆: 末梢神経疾患と血液神経関門. 臨床神経学 49: 959-962, 2009. 査読無

〔学会発表〕(計40件)

① Shimizu F, Kanda T: Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. ECTRIMS, Oct 21-23, 2011. Amsterdam, Nederland.

② Haruki H, Kanda T: NMO sera and astrocyte cell death: an in vitro study. ECTRIMS, Oct 21-23, 2011. Amsterdam, Nederland.

③ 古賀道明, 神田 隆. ビッカースタッフ型脳幹脳炎における感染症の関与: ギラン・バレー症候群との差異. 第23回日本神経免疫学会学術集会. 2011年9月15-17日, 東京, 京王プラザホテル.

④ 清水文崇, 神田 隆: 多巣性運動ニューロパチー血清が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第22回日本末梢神経学会学術集会. 2011年9月2-3日. 沖縄, 沖縄コンベンションセンター.

⑤ Koga M, Kanda T: GQ1b-seronegative Fisher syndrome: serological study. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society Potomac, June 25-29, 2011. Maryland, USA.

⑥ 清水文崇, 神田 隆: 視神経脊髄炎血清での血液脳関門破綻メカニズムの解析. 第52回日本神経学会学術大会. 2011年5月18-20日. 名古屋, 名古屋国際会議場.

⑦ 古賀道明, 神田 隆. ギラン・バレー症候群発症におけるカンピロバクター・シアル化の意義. 第52回日本神経学会学術大会. 2011年5月18-20日, 名古屋, 名古屋国際会議場.

⑧ Haruki H, Kanda T: Establishment of gliovascular unit model to reveal of pathogenesis of neuromyelitis optica. The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting, April 14, 2011 Honolulu, U.S.A.

⑨ Shimizu F, Kanda T: The effect of advanced glycation end-products on blood-nerve barrier. Neuroscience 2010. Nov 13, 2010. San-Diego, U.S.A.

⑩ 清水文崇, 神田 隆: AGEによる血液神経関門破綻メカニズムの解析. 第21回日本末梢神経学会学術集会. 2010年9月4日. 仙台, フォレ

スト仙台.

⑪ Haruki H, Kanda T: Department of integrated neuroscience: Establishment of gliovascular unit model to reveal of pathogenesis of neuromyelitis optica. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010. August 21, 2010. Kyoto, Kyoto Garden Palace

⑫ 春木明代, 神田 隆: NMOの病態解析のためのヒト gliovascular unit modelの作製. 第114回山口大学医学会学術講演会. 2010年7月17日. 宇部, 山口大学霜仁会館

⑬ Sano Y, Kanda T: Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. The First International Conference on Neural Tissue Culture. June 25, 2010. Seoul, Korea,

⑭ 古賀道明, 神田 隆. Neuromyelitis optica 発症における感染症の関与. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20-22日, 東京, 東京国際フォーラム.

⑮ 清水文崇, 神田 隆: AGEが血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20-22日. 東京, 東京国際フォーラム.

⑯ 春木明代, 神田 隆: NMOの病態解析のためのヒト gliovascular unit modelの作製. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20-22日. 東京, 東京国際フォーラム.

⑰ 柏村陽子, 神田 隆: 副腎皮質ステロイド薬が血液神経関門に及ぼす影響の解析. 第51回日本神経学会総会. 2010年5月20-22日. 東京, 東京国際フォーラム.

⑱ 古賀道明, 神田 隆: 視神経脊髄炎の発症における感染症の関与. 第22回日本神経免疫学会学術集会. 2010年3月17-19日. 東京, 日経ホール

⑲ 清水文崇, 神田 隆: Neuromyelitis optica (NMO)患者血清が血液脳関門(BBB)に及ぼす影響の解析. 第22回日本神経免疫学会学術集会. 2010年3月17-19日. 東京, 日経ホール

⑳ 神田 隆: 神経系のバリアーと自己免疫性神経疾患. 第6回新潟県神経免疫研究会. 2009年10月29日. 新潟, ホテルオークラ新潟

㉑ Sano Y, Kanda T: Effect of amyloid β on tight junction of the new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line. Neuroscience 2009. October 21, 2009. Chicago, USA.

㉒ Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. Special Lecture in Medical College of Georgia, October 16, 2009. Augusta GA, USA.

㉓ 神田 隆: 血液脳関門の破綻と修復のメカニズム. 第28回ニセコカンファレンス. 2009年9月26日. 北海道, 中村記念病院講堂

㉔ 清水文崇, 寺崎哲也, 神田 隆: AGEが血

液神経関門に及ぼす影響の解析. 第20回日本末梢神経学会学術集会. 2009年9月4-5日. 大宮, 大宮ソニックシティ.

②⑤ 柏村陽子, 寺崎哲也, 神田 隆: 副腎皮質ステロイド薬が血液脳関門に及ぼす影響の解析. 第20回日本末梢神経学会学術集会. 2009年9月4-5日. 大宮, 大宮ソニックシティ.

②⑥ 神田 隆: Molecular mechanisms of BBB breakdown. 第8回MSワークショップ. 2009年8月1日. 福岡, JALシーホークホテル

②⑦ 神田 隆: 血液脳関門の破綻と修復のメカニズム. 第11回脳教カンファレンス. 2009年7月25日. 岩国, 岩国国際観光ホテル

②⑧ 柏村陽子, 寺崎哲也, 神田 隆: ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立. 第112回山口大学医学会学術講演会. 2009年7月18日. 宇部, 山口大学霜仁会館

②⑨ Kanda T: A New Model for Studying Blood-Brain Barrier and Blood-Nerve Barrier. The 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium. July 9, 2009, Eibsee, Germany.

③⑩ Kanda T: Immortalized Human Cells Composing Blood-Nerve Barrier. The 8th Cerebral Vascular Biology. June 30, 2009. Sendai, Excel Hotel Sendai

③⑪ Sano Y, Kanda T: The effect of IFN-β1b on the human in vitro blood-brain barrier model. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. June 28-July 2, 2009. Sendai, Excel Hotel Sendai

③⑫ Shimizu F, Terasaki T, Kanda T: Pericyte forming blood-brain and blood-nerve barriers express tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. June 28-July 2, 2009. Sendai, Excel Hotel Sendai

③⑬ Kashiwamura Y, Terasaki T, Kanda T: Establishment and characterization of a stable immortalized human brain microvascular endothelial cell line. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference. June 28-July 2, 2009. Sendai, Excel Hotel Sendai

③⑭ 神田 隆: 末梢神経疾患と血液神経関門. 第50回日本神経学会総会シンポジウム12 末梢神経疾患研究の現在. 2009年5月22日. 仙台, 仙台国際センター.

③⑮ 古賀道明, 神田 隆: サルモネラ属菌によるギラン・バレー症候群発症への関与. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

③⑯ 佐野泰照, 神田 隆: 血液脳関門のバリア機能を増強させる薬物の作用機序の検討. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

③⑰ 清水文崇, 神田 隆: PericyteはBNB維持のkey playerである. 第50回日本神経学会総会.

2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

③⑱ 柏村陽子, 寺崎哲也, 神田 隆: ヒト脳微小血管内皮細胞の安定細胞株の樹立. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

③⑲ 安部真彰, 寺崎哲也, 神田 隆: 高血糖が血液神経関門に及ぼす影響. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

④⑰ 前田敏彦, 寺崎哲也, 神田 隆: アミロイドトランスポーターの発現に及ぼすエストロゲンの影響. 第50回日本神経学会総会. 2009年5月20-22日. 仙台, 仙台国際センター.

〔図書〕(計4件)

① 神田 隆: 南江堂、慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (CIDP). 小林祥泰、水澤英洋編、神経疾患最新の治療 2012-2014. 2012、pp282-285.

② 神田 隆: 医学書院、神経筋疾患の血液浄化療法. 山口 徹、北原光夫、福井次矢総編集、今日の治療指針 2011、2011、pp766-767.

③ 神田 隆: 技術情報協会、ギラン・バレー症候群. 各疾患領域の治療の現状とメディカル・ニーズ DATA BOOK. 2010、pp249-255.

④ 古賀道明, 神田 隆: 南江堂、多巣性運動性ニューロパチー. 小林祥泰、水澤英洋編、神経疾患最新の治療 2009-2011、2009、pp261-263.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 隆 (KANDA TAKASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40204797

(2) 連携研究者

寺崎 哲也 (TERASAKI TETSUYA)

東北大学・薬学部薬学研究科・教授

研究者番号: 60155463