

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670443

研究課題名(和文) 血液神経関門を構成するペリサイトを標的とした末梢神経内部環境改变の試み

研究課題名(英文) Novel strategy to alter the internal milieu of peripheral nervous system targeting BNB-forming pericytes

研究代表者

神田 隆 (KANDA, Takashi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40204797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトBNB由来内皮細胞とヒトBNB由来ペリサイトをポリカーボネート膜上に単層に重畳し、直接の細胞接着を保持して培養する *in vivo* のヒトBNBにより近い細胞モデルが完成した。内皮細胞とペリサイトをポリカーボネート膜を挟んで離して培養する旧来の非接触共培養モデルよりも、電気抵抗値の上昇、デキストラン透過性の低下のいずれの点においても優れていることを確認した。また、BNB由来ペリサイト活性化の surrogate マーカーとしての GDNF のほか、電気抵抗値、デキストラン透過性を組み合わせることで、内皮細胞層を通過し、ペリサイトを活性化する物質をスクリーニングするシステムがより効率化できた。

研究成果の概要(英文)：We construct a novel blood-nerve barrier (BNB) model incorporating bi-cultured system of conditionally immortalized human BNB cell lines (microvascular endothelial cells and pericytes). In this system, pericytes were cultured onto the luminal side of insert (3 μ m pores). Sheet-like confluent EC cultured on the UpCell plate, which achieves detachment of cell layer by changes of temperature, was transferred onto the pericyte monolayer. As compared with the conventional co-culture system employing pericytes on abluminal side of the insert and endothelial cells on luminal side, the values of permeability were significantly low in our new BNB model. Using this novel model, a screening system to find hydrophobic substances which can activate BNB pericytes and enhance BNB properties was successfully established.

研究分野：神経内科学

キーワード：血液神経関門 ペリサイト 内皮細胞 脂溶性分子

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の教室では一貫して神経系バリアーの細胞学的研究を行っており、とくに血液神経関門(blood-nerve barrier, BNB)の研究では、国際的にも自他ともに認めるトップランナーであることを自負している(Kanda *JMNP* 2013; Shimizu et al. *JMNP* 2013 他多数)。過去数年の間に齧歯類、ヒトの BNB 構成不活化細胞株を次々に樹立してきたが、研究開始当初の時点でヒト BNB 由来微小血管内皮細胞、ペリサイトの安定した細胞株の樹立が達成できていた。ヒト BNB 由来ペリサイトが BNB 機能のコントローラーであること、多様な神経栄養因子・サイトカインを放出する multipotent cell であること等がこれらの細胞株を用いた当教室の研究で明らかになった。このことから、ペリサイトが人為的に操作できれば BNB 機能は比較的容易に制御できるという確信を得るに至った。

一方、中枢神経では、BNB の counterpart である血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)レベルでの炎症細胞浸潤をコントロールする治療法(natalizumab)が再発寛解型多発性硬化症の治療法として確立、華々しい治療効果を上げており、バリアーのレベルで疾患治療を行うという戦略はすでに現実のものとなっている。その一方で、本薬使用中の患者に300例(研究計画時点)を超える進行性多巣性白質脳症(PML)が発生していることは看過できない。バリアーの主役はバリアー構成内皮細胞であることは言うまでもなく、BBB をコントロールすることを主眼とした研究は、natalizumab に代表される内皮細胞に接着する単核球を制御する方法、もしくは siRNA やウイルスベクターを介した直接的な内皮細胞操作が現在主流である。画期的新薬である natalizumab もこの範疇に入る薬物である。しかし、バリアーの“場”そのものである内皮細胞の人為的な操作は、きわめて効果的である一方で PML のような致死性の副作用をきたす可能性がある。より生理的狀態に近い形でのバリアー機能のコントロール技術の確立が現在待たれているところであり、ペリサイトを制御することで間接的に、かつ生理的狀態に近い BNB コントロール法の確立は、この目的に極めてふさわしいプロジェクトであると考えた。また、BNB は BBB と違ってアストロサイトの関与のないよりシンプルな系であり、ペリサイトのコントロール BNB の人為的改変 各種末梢神経疾患への治療へとつながる研究はより現実的な成果を結ぶ可能性があるものと考えた。以上が本研究課題を着想する契機となった過程である。

2. 研究の目的

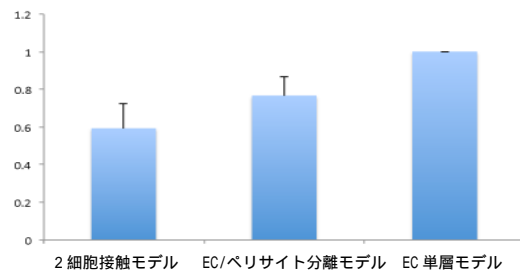
(1) ヒト BNB の体外モデルとなる、ヒト不活化 BNB 由来内皮細胞と BNB 由来ペリサイトからなる良好な in vitro 共培養系を確立する。

(2) 同モデルを用いて、BNB 構成内皮細胞を通過してペリサイトに作用し、ペリサイトを活性化する物質を同定する。

3. 研究の方法

(1) ヒト不活化内皮細胞/ペリサイト直接接触型 BNB in vitro モデルの作成

ポリカーボネート膜(孔径 3.0 μm)に型コラーゲンを塗布したものを作成し、その上面にヒト BNB 由来ペリサイト不活化細胞株を播種する。これとは別に UpCell dish (Nunc) 上にヒト BNB 由来内皮細胞を単層培養したものを作成、confluent になった後に 20°C に冷却、1 枚のシート状に剥がれた内皮細胞膜を hygroscopic sheet にくっつけて、上記の confluent になった pericyte 層上に重畳する。これで内皮細胞/ペリサイト直接接触型 BNB in vitro モデルが完成する。



上図は FITC 付加 10kDa デキストランの透過性を EC 単層モデル(右 bar)を 1 として比較したものの。今回完成した 2 細胞直接接触型モデル(左 bar)が最も優れたバリアー機能を有することが明らかになった。

(2) 内皮細胞を通過し、ペリサイトを活性化する物質の同定

将来の医薬品としての発展の可能性を考慮して、目的とする物質は血中投与によって活性をもつことを前提とする。したがって、本研究で扱うペリサイトを活性化する物質は、BNB を構成する内皮細胞を通過し得ることが必須となる。BNB 通過の条件としては 1) 低分子量であり、かつ 2) hydrophobic であること、を満たすものの中からスクリーニングすることとした。この低分子脂溶性物質のスクリーニングにあたっては、小野薬品工業が所有する脂溶性物質ライブラリを中心に探索を行うこととした。

a) ヒト BNB 構成ペリサイトを collagen type I でコートした 60mm plastic dish に confluent に播種したものと、b) collagen type I を両側に塗布した Boyden chamber の上面に BNB 由来内皮細胞(孔径 0.4 μm)を confluent に播種し、3 日後に chamber を倒立させ、下面にペリサイトを confluent に播種した非接触分離モデル、c) 今回完成した 2 細胞直接接触型モデル、の 3 者を用い、GDNF を BNB 由来ペリサイト活性化の surrogate marker としてアッセイ系を構築した。

第1段階としてモデルa)を用い、ペリサイトを活性化する物質のスクリーニングを試みた。培養液中に濃度を振った候補物質(A1, A2, A3...)を加え、各種栄養因子、サイトカインの発現プロフィールを検索した。重点的にチェックする分子としては、内皮細胞バリアーを強力に regulate する因子(VEGF、Ang-1、bFGFの3つ)、神経栄養因子(BDNF、GDNFなど)、プロテアーゼとその阻害因子(MMP-2、MMP-9、TIMP-1など)を選択し、とくに surrogate marker としての GDNF を upregulate する候補物質を複数選択、新規 BNB モデル c)を用いた実験へと移行した。

4. 研究成果

(1) ヒト BNB 由来内皮細胞とヒト BNB 由来ペリサイトをポリカーボネート膜上に共培養する in vivo のヒト BNB により近い細胞モデルが完成した。内皮細胞、ペリサイトそれぞれの単層培養よりも電気抵抗値が高く、デキストランなどの透過性も低いことが確認された。また、内皮細胞とペリサイトをポリカーボネート膜を挟んで離して培養する旧来の非接触共培養モデルよりも、電気抵抗値の上昇、デキストラン透過性の低下のいずれの点においても優れていることを確認した。このモデルは現在国内特許出願中である。

本直接接触モデルの完成により、ヒト BNB 由来内皮細胞/BNB 由来ペリサイトのクロストークが vivo に近い形で明らかになり、本研究提案の主眼である、ペリサイトを操作することによる末梢神経バリアー機能の改変、という課題を達成する上での実験基盤が確立したと考えている。

(2) BNB 由来ペリサイト活性化の surrogate marker としての GDNF のほか、バリアー機能の指標としての電気抵抗値、デキストラン透過性を組み合わせることで、内皮細胞層を通過し、ペリサイトを活性化する物質をスクリーニングするシステムがより効率化できた。低分子物質のスクリーニングにあたっては、小野薬品工業株式会社との共同研究が現在進行中である。同社が所有する脂溶性物質ライブラリーを中心に探索が進行中であり、いくつかの候補物質の絞り込みに至っている。

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)

Takeshita Y, Omoto M, Fujikawa S, Kanda T. Immunohistochemical analysis of laminin components in blood-nerve barrier and blood-brain barrier. Clin Exp Neuroimmunol 8: 49-53, 2017. (査読有)

DOI: 10.1111/cen3.12359

竹下幸男、神田 隆. 血液脳関門・血液

神経関門の視点からみた自己免疫性神経疾患の病態. Modern Physician 36: 635-638, 2016 (査読無)
DOI: なし

Shimizu F, Sawai S, Sano Y, Beppu M, Misawa S, Nishihara H, Koga M, Kuwabara S, Kanda T. Severity and pattern of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlations with clinical subtypes. PLoS One 9: e104205, 2014. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0104205

Furukawa T, Maatsui N, Fujita K, Miyashiro A, Nodera H, Izumi Y, Shimizu F, Miyamoto K, Takahashi Y, Kanda T, Kusunoki S, Kaji R. Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. J Neurol Sci 346: 75-79, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.jns.2014.07.059

神田 隆. 血液神経関門の破綻と末梢神経障害. Peripheral Nerve 25: 201-206, 2014. (査読有)
DOI: なし

〔学会発表〕(計 9 件)

Takeshita Y, Tomoe Y, Sano Y, Nishihara H, Maeda T, Kanda T. Construction of a new in vitro blood-brain barrier (BBB) model that incorporates triple culturing system of BBB components. Neuroscience 2016, 2016.11.11-16. San Diego, USA

神田 隆. シンポジウム 2: 慢性免疫性ニューロパチーのメカニズム: BNB. 第 27 回日本末梢神経学会学術集会. 2016.8.26-27. 大阪国際会議場、大阪府、大阪市

神田 隆. シンポジウム: 100 年目のギラン・バレー症候群: 病理. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016.5.18-21. 神戸コンベンションセンター、兵庫県、神戸市

尾本雅俊、神田 隆. 糖尿病性末梢神経障害の BNB を構成する非細胞性バリアーの組織学的検討. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016.5.18-21. 神戸コンベンションセンター、兵庫県、神戸市

Takeshita Y, Tomoe Y, Sano Y, Nishihara H, Maeda T, Kanda T. Construction of a new in vitro blood-brain barrier (BBB)

model that incorporates triple culturing system of BBB components. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016.5.18-21. 神戸コンベンションセンター、兵庫県、神戸市

なし

(4)研究協力者
なし

神田 隆. パネルディスカッション 3:末梢神経障害と血流:血流が神経機能に及ぼす影響. 第 26 回日本末梢神経学会学術集会. 2015.9.18-19. ホテルブエナビスタ、長野県、松本市

Takashi Kanda. Cellular properties of pericytes in human blood-brain barrier and blood-nerve barrier. 第 38 回日本神経科学大会. 2015.7.28-31. 神戸国際会議場、兵庫県、神戸市

Takashi Kanda. Immune-mediated disruption of neuro-vascular units in neuroimmunological disorders. 第 37 回日本神経科学大会. 2014.9.13. パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

神田 隆. 血液神経関門の破綻と末梢神経障害. 第 25 回日本末梢神経学会学術集会. 2014.8.29. ルビノ京都堀川、京都府、京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

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

取得状況(計 0 件)

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)研究分担者

なし

(3)連携研究者