

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860669

研究課題名(和文) 神経免疫疾患におけるバリア破綻機序の解明：中枢，末梢神経のバリア機能の違いは何か

研究課題名(英文) Difference between the blood-brain barrier and blood-nerve barrier: Analyses using new human in vitro blood-brain barrier and blood-nerve barrier models.

研究代表者

安部 真彰 (ABE, Masaaki)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：80598748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳関門(BBB)と血液神経関門(BNB)は共に神経系のバリアとして各々の内部環境を維持している。BBBとBNBの相違点を明らかにすることで、免疫性神経疾患の分子レベルでの病態解明が期待できる。本研究は当教室で確立したBBB構成内皮細胞株(TY10)とBNB構成内皮細胞株(FH-BNB)の遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて比較した。その結果、hedgehog signaling pathwayに関わる遺伝子の発現が両者で異なっていた。蛋白レベルでの解析を行ったところ、特にdesert hedgehogが、BBBとBNBのバリア機能の違いに関与していることが明らかになった。

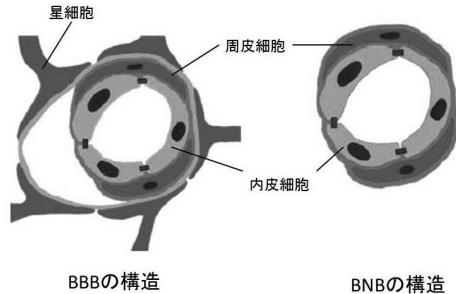
研究成果の概要(英文)：Both the blood-brain barrier (BBB) and the blood-nerve barrier (BNB) maintain their respective internal environments as barriers to the nervous system. BBB failure is thought to cause multiple sclerosis and optic neuromyelitis, and BNB failure to cause Guillain - Barre syndrome and CIDP. Clarifying the difference between BBB and BNB, it is considered to reveal the pathology of the autoimmune diseases of the nervous system. In this study, genes of the BBB cell line (TY10) and the BNB cell line (FH-BNB) were compared using DNA microarray. As a result, expression of genes related to hedgehog signaling pathway was different between both. Among the Hedgehog family, it became clear that desert hedgehog is involved in the difference in barrier function between BBB and BNB.

研究分野：神経免疫学，パーキンソン病

キーワード：Desert hedgehog

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) を末梢神経は血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) を構成している。ここでは内皮細胞が、隣接する細胞間で tight junction を構成し、物質の自由な往来を制限している。



BBB は内皮、周皮、星細胞の 3 者から構成され、BNB は内皮、周皮細胞の 2 者から構成されている。従来、BNB は BBB と比較してバリア機能が低いと考えられていた。しかし、近年 BNB も BBB と同等のバリア機能を有し、種々のトランスポーターによって末梢神経内の微小環境を維持していると考えられるようになった。我々もヒト由来脳微小血管内皮細胞株 (TY08)、ヒト神経内膜内微小血管内皮細胞株 (FH-BNB) の両者を確立し、これらの細胞株がほぼ同程度のバリア機能を有していることを証明した (Sano et al. J Cell Physiol 2010; Abe et al. Cell Struct Funct 2012)。一方で BBB 構成内皮細胞と BNB 構成内皮細胞では発現するトランスポーターが異なっており、この 2 者は異なる機能を有している可能性も報告した (Sano et al. Cell Struct Funct 2007)。同様に BBB と BNB の周皮細胞もそれぞれ異なる栄養因子を分泌していることを報告した (Shimizu et al. J Cell Physiol 2010)。このように、BBB と BNB は構成する細胞の種類だけでなく、それぞれの内皮、周皮細胞が異なる機能を有していると考えられる。

免疫性神経疾患では中枢、末梢共にバリアの破綻が、病態に大きく関わっている。多発性硬化症では、BBB を乗り越えて T リンパ球が中枢神経内に侵入することで神経障害を惹起するとされる。また、我々は視神経脊髄炎では、まず BBB が破綻することで自己抗体が中枢神経内へ侵入し、アストロサイト死を引き起こす可能性を報告した (Shimizu et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2012)。同様に免疫性末梢神経障害であるギラン・バレー症候群患者の腓腹神経生検像では BNB が破綻しているとされる。慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) の腓腹神経生検像では、神経内膜内微小血管の claudin-5 の染色性が低下し BNB の機能が低下している可能性が報告されている (Kanda et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004)。また、多発性

運動性ニューロパチー患者の血清が BNB を破綻させることも証明した (Shimizu et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013)。このように自己免疫性末梢神経障害でもバリアの破綻や透過性の変化が病態に深く関わっていると考えられている。

近年では、中枢神経疾患である多発性硬化症における末梢神経障害の合併や、末梢神経疾患である CIDP における中枢神経障害の合併の可能性が報告されている。また、ピッカースタッフ型脳幹脳炎の患者血清は、BBB 構成内皮 (TY08) のバリアを破綻させるが、BNB 構成内皮 (FH-BNB) には影響を与えないことを報告した (Saito et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013)。

このように同じ神経系のバリアでありながら、BBB のみが破綻する疾患、BNB のみが破綻する疾患が存在している。よって、BBB と BNB の相違点を明らかにすることは、バリアの破綻する疾患の本態に迫り、免疫性神経疾患への特異的な治療法を生み出す可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の研究室で確立したヒト由来 BBB および BNB 構成内皮細胞株 (TY08, FH-BNB)、周皮細胞株を用いて、BBB と BNB の違いを遺伝子レベルから解析することである。具体的には、DNA マイクロアレイを用いて、TY08 と FH-BNB、BBB 構成周皮細胞と BNB 構成周皮細胞の遺伝子発現を比較する。中でもバリアを構成する tight junction 関連分子やトランスポーター、血管新生因子と、これらに関わるシグナル伝達経路の遺伝子を中心に比較検討する。こうして BBB と BNB のバリア機能を構成するにあたって、何が重要な遺伝子であるのかを明らかにする。

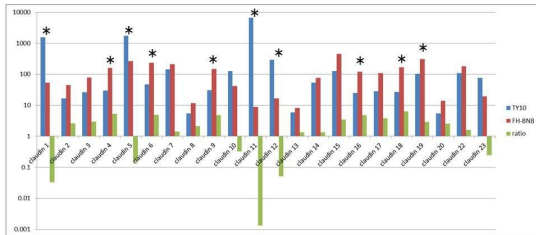
3. 研究の方法

ヒト脳微小血管内皮細胞株である TY08 細胞とヒト神経内膜内微小血管内皮細胞株である FH-BNB の比較、検討を行う。まず、これらの細胞を 37 で培養した後に RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて脳由来細胞と末梢神経由来細胞の遺伝子発現を比較する。DNA マイクロアレイは gene chip を使い、2 色の蛍光色素で標識し遺伝子発現の程度を検討する。得られたデータのうち、どのような遺伝子群に違いがあるかを、Cytoscape を用いた Enrichment Map (Merico D et al. PLoS One 2010) を作成して検討する。Tight junction 関連分子やトランスポーター、血管新生因子とこれに関わるシグナル伝達経路については、個々の遺伝子の発現を比較する。ここまでで、脳、末梢神経のバリア機能の違いに関係する遺伝子の候補が判明する。次に得られた候補遺伝子が蛋白レベルでも差があるかどうかを、ウエスタンブロットを用いて解析する。

4. 研究成果

H26 年度にヒト血液脳関門 (BBB) 構成内皮細胞とヒト血液神経関門 (BNB) 構成内皮細胞の網羅的な遺伝子解析・比較を行った。この結果、ヒト BBB 構成内皮細胞とヒト BNB 構成内皮細胞では tight junction 関連分子の発現が異なっており、BBB と BNB では異なる機序でバリア機能を維持していると考えられた。

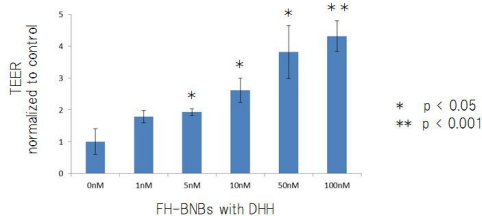
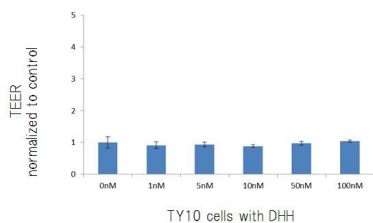
Claudin familyの遺伝子発現



* 発現に差のある遺伝子

また、GSEA (gene set enrichment analysis) を行い、hedgehog signaling family が BBB と BNB のバリア機能の違いに関与している可能性を明らかにした。

H27・28 年度は上記の結果を基に研究を継続した。ヒト脳微小血管内皮細胞株 (TY10) 及びヒト末梢神経内微小血管内皮細胞株 (FH-BNB) に対し sonic hedgehog, desert hedgehog を作用させ、バリア機能と tight junction 関連分子発現の変化を検討した。Sonic hedgehog は TY10, FH-BNB のそれぞれのバリア機能を変化させなかった。Desert hedgehog は TY10 のバリア機能を変化させない一方で、FH-BNB のバリア機能を上昇させた。



Tight junction 関連分子については、desert hedgehog を FH-BNB に反応させたときにのみ claudin-5 の蛋白量が増加した。FH-BNB, ヒト末梢神経微小血管周皮細胞株 (HPnPCTs) に対し RT-PCR を行ったところ、desert hedgehog は検出されなかった。Desert

hedgehog は末梢神経内でシュワン細胞が産生し、その knockout mouse は末梢神経障害を呈することが報告されている。FH-BNB, ヒト末梢神経微小血管周皮細胞株 (HPnPCTs) に対し RT-PCR を行ったところ、desert hedgehog は検出されなかった。従来、BNB は内皮細胞、周皮細胞の 2 者から構成されていると考えられていた。しかし、今回の研究で BNB のバリア機能維持に、シュワン細胞が産生する desert hedgehog が重要な働きをしている可能性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Nishihara H, Shimizu F, Kitagawa T, Yamanaka N, Akada J, Kuramitsu Y, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Nakamura K, Kanda T. Identification of galectin-3 as a possible antibody target for secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 査読有. 23, 2017,382-394.

Nishihara H, Shimizu F, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Kanda T. Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 査読有. 10, 2015, e0121488.

Shimizu F, Nishihara H, Sano Y, Takeshita Y, Takahashi S, Maeda T, Takahashi T, Abe M, Koga M, Kanda T. Markedly increased IP-10 production by blood-brain barrier in neuromyelitis optica. *PLoS One*. 査読有. 10, 2015, e0122000.

Tasaki A, Shimizu F, Sano Y, Fujisawa M, Takahashi T, Haruki H, Abe M, Koga M, Kanda T. Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 査読有. 85, 2014, 419-430.

[学会発表](計 10 件)

Maeda T. Autocrine MMP-9 secretion disrupt the blood-nerve barrier in CIDP. 第 57 回日本神経学会学術大会。神戸国際会議場 (神戸市), 2016 年 5 月 18-21 日。

Abe M. Effects of zonisamide for overall non-motor symptoms with Parkinson's disease patients. The XII World Congress of Neurology, Santiago (Chile), Oct 21-Nov 5, 2015.

安部真彰. Desert hedgehog が血液神経関門のバリア機能を制御する。第 26 回日本末梢神経学会学術集会。ホテルブエナビスタ (松本市), 2015 年 9 月 18-19

日 .
安部真彰 . ゾニサミド内服がパーキンソン病のすくみ足と非運動症状に及ぼす影響 . 第 56 回日本神経学会学術大会 . 朱鷺メッセ (新潟市), 2015 年 5 月 20-23 日 .

Sano Y. Role of ATP-binding cassette transporters in efflux of amyloid- β at the human blood-brain barrier. American Academy of Neurology (AAN) 67th Annual Meeting. Washington DC (U.S.A), 2015 Apr 18-25.

Abe M. Difference between the blood-brain barrier and blood-nerve barrier: Analyses using new human in vitro blood-brain barrier and blood-nerve barrier models. American Academy of Neurology (AAN) 67th Annual Meeting. Washington DC (U.S.A), Apr 18-25, 2015.

Abe M. Difference between the blood-brain barrier and blood-nerve barrier: Analyses using new human in vitro blood-brain and blood-nerve barrier models. 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience2014 . パシフィコ横浜 (横浜市), 2014 年 9 月 11-13 日 .

安部真彰 . 血液脳関門, 血液神経関門構成内皮細胞の遺伝子発現の比較 . 第 25 回日本末梢神経学会学術集会 . ホテルルビノ京都堀川 (京都市), 2014 年 8 月 29-30 日 .

安部真彰 . パーキンソン病の非運動症状, 疲労症状と嚥下障害の関係 . 第 51 回日本リハビリテーション医学会学術集会 . 名古屋国際会議場 (名古屋市), 2014 年 6 月 8-10 日 .

安部真彰 . DNA マイクロアレイを用いた血液脳関門, 血液神経関門構成内皮細胞の比較 . 第 55 回日本神経学会学術大会 . 福岡国際会議場 (福岡市), 2014 年 5 月 21-24 日 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

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

安部 真彰 (ABE, Masaaki)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号 : 8 0 5 9 8 7 4 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし