

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15475

研究課題名(和文) 2大中枢関門の新規密着結合分子の寄与の解明と多発性硬化症の治療標的としての有用性

研究課題名(英文) Investigation of contribution of novel tight junction molecule at the two big central nervous system barriers and its usefulness as a therapeutic target for multiple sclerosis

研究代表者

内田 康雄(Uchida, Yasuo)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70583590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症は自己反応性リンパ球が中枢に浸潤し、神経を破壊する疾患である。中枢組織の関門の崩壊を阻止し、浸潤を食い止めることが重要な治療戦略である。このために、本研究では中枢関門の崩壊の分子メカニズムの解明を行った。Claudin-11が、複数の中枢関門の密着結合形成に重要であることがわかり、その発現低下が多発性硬化症における中枢関門の崩壊の原因の一つであることが本研究によってはじめて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Multiple sclerosis is a disorder that autoreactive lymphocytes invade into central nervous system (CNS) and destroy it. The inhibition of disruption of the CNS barriers (which allows the lymphocytes invade into the CNS) is an important therapeutic strategy. However, it remained to be elucidated for the molecular mechanism of CNS barrier breakdown. The present study was the first to clarify that "claudin-11" contributes to the tight junction formation of several CNS barriers and its down-regulation causes the breakdown of CNS barriers in multiple sclerosis.

研究分野：中枢関門科学

キーワード：Claudin-11 多発性硬化症 血液脳関門 血液脊髄関門 血液脳脊髄液関門 血液クモ膜関門 定量プロテオミクス 密着結合

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (MS) は、若年成人において最も患者数の多い神経障害性疾患である。中枢の関門組織の崩壊がきっかけで自己反応性リンパ球が中枢組織に浸潤し神経や脊髄の破壊 (脱髄) を引き起こす。関門崩壊の分子機構は未だ十分に解明されていない。最近、免疫反応を抑制する薬など少しずつ治療法が出つつあるが、対症療法に留まっている。疾病の根本原因である関門の破綻機構を解明し、破綻を防止できる根本的治療の確立が求められている。

関門組織は、細胞間が「密着結合」を行うことによって形成される。内皮系バリアーである血液脳関門 (BBB) や血液脊髄関門 (BSCB) では claudin5 が、上皮系バリアーである血液脳脊髄液関門 (BCSFB) では claudin3 が密着結合の形成に寄与することが機能レベルで実証されている (*J Cell Biol.* 2003, 161:653-660; *Acta Neuropathol.* 2014, 128:267-277)。しかし、これらの機能低下だけではまだ関門機能が維持されることから、他分子の関与が考えられてきた。

申請者は、独自開発したタンパク質絶対定量法を用いて、ヒト脳毛細血管と脈絡叢において Claudin11 蛋白質が発現することを初めて発見し、その絶対発現量は全密着結合分子の中で最大であり、Claudin5 や 3 よりも大きいことを示した (Uchida et al., *J Neurochem*, 134, 1104-1115, 2015)。ヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3 細胞) の claudin11 の発現を siRNA を用いて低下させると透過性が亢進する、という予備的検討結果も得ていた。また、多発性硬化症での自己リンパ球の中枢浸潤は、もう一つの中枢関門である血液クモ膜関門 (BAB) を形成する軟髄膜においても積極的に起こり、このクモ膜に claudin-11 が発現することが示されていた。

以上のことから、研究代表者は、「Claudin11 が、中枢関門において重要な密着結合分子であり、多発性硬化症の関門破綻の原因であるのではないか」との仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、「中枢関門における役割がわかっていない Claudin-11 分子が、中枢関門の密着結合形成に重要な役者であり、多発性硬化症における中枢関門のバリアー機能破綻の原因分子である」という仮説を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 改良型 SWATH 法による claudin サブタイプの探索:

脳組織から nylon mesh 法によって脳毛細血管を単離し、トリプシン消化し (Uchida et al., *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):21)、必要に応じてペプチド産物を等電点電気泳

動法によって分画し、Sciex 社製 nanoL-TripleTOF5600 の SWATH モードを用いて測定を行った。データ解析において、独自の in silico ペプチド/データ選別処理を行い、定量精度・感度・特異性が保証されたデータを選別し、全 claudin サブタイプの中で発現が認められたサブタイプをリストアップした。

(2) Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) 解析 (Uchida et al., *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):21):

同様に目的試料のトリプシン消化を行い、目的タンパク質定量用の安定同位体標識ペプチドを添加し、Sciex 社製 nanoL-TripleTOF5600 の PRM mode あるいは Sciex 社製 microLC-QTRAP5500 の SRM mode で定量分析を行った。検量線は、安定同位体標識ペプチドと同じ配列の非標識ペプチドの含有量が異なる試料を測定することによって得た。

(3) 抗体を用いた発現・局在解析:

市販されている目的分子の特異抗体を用いて、定法に従い、免疫組織学的染色解析およびウェスタンブロット解析を行った。多発性硬化症モデル (EAE) マウスは、定法に従って作成し、臨床スコア 3.0~3.5 の間に達したマウスを使用した。ヒトの脳および脊髄切片は、市販のものを購入し、用いた。動物及びヒト組織は、東北大学の動物実験委員会およびヒト倫理委員会の承認およびルールのもとで使用した。

(4) パラセルラー透過性評価:

中枢の内皮系バリアーのモデルとしてヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3 細胞) を、中枢の上皮系バリアーのモデルとして脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB 細胞) を用いた。それぞれをトランスウェル上に培養し、単層膜を形成させた。Claudin-11 あるいは claudin-5 に対する siRNA を処理した後、一定期間後、タンパク質発現量の変化及び細胞間 (パラセルラー経路) の物質透過性を測定した。透過性は、細胞膜非透過物質である FITC-dextran (70 kDa) を用いて評価した。

4. 研究成果

血液脳関門の密着結合においてどの claudin サブタイプが重要な役割を果たしているかを調査するために、独自の網羅的定量プロテオミクス (改良型 SWATH 法) によってラット脳毛細血管画分を用いた発現探索を行った。その結果、claudin-5 (中枢の内皮系関門の密着結合形成に寄与することがすでに知られている分子) に加えて claudin-11 のタンパク質発現が検出された。その他の claudin サブタイプは検出されなかった。従来の mRNA 発現解析では、claudin-11 の発現量は他の claudin サブタイプに比べて低く着

目されてこなかった。独自の Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) 解析の結果、血液脳関門において、ラットでは claudin-5 と同程度、ヒトでは claudin-5 よりも有意に大きい発現量であることが明らかとなり (図 1)。本実験によってはじめて claudin-11 が中枢関門の密着結合形成において重要な役割を果たしている可能性が出てきた。Claudin-11 はオリゴデンドロサイトに発現することから、血管内皮細胞における発現を検証した結果、ヒト脳毛細血管内皮細胞株における高発現が観察され、また、ヒト脳切片において血管内皮マーカーの claudin-5 と血管においてシグナルがマージしたことから、血管内皮細胞に発現することが示された (図 1)。

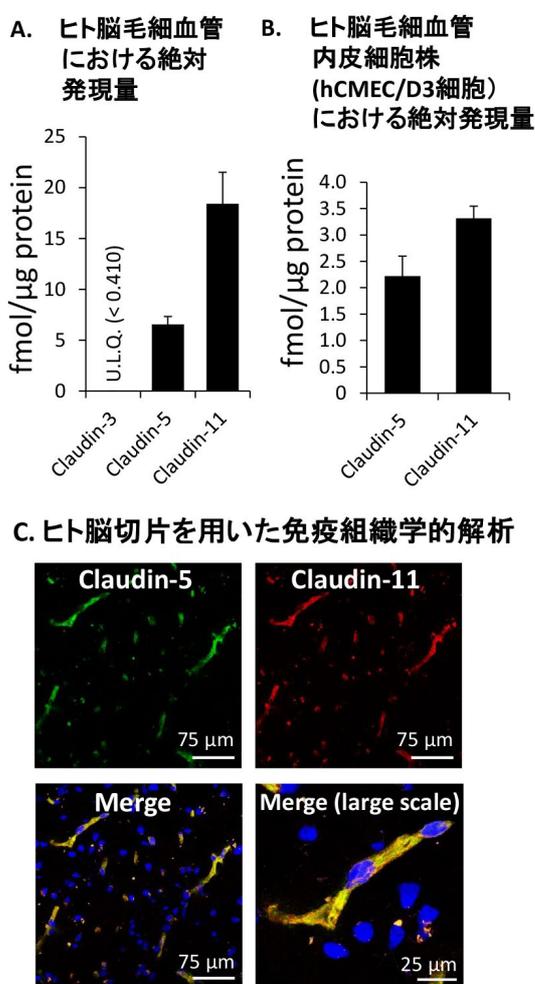


図1 血液脳関門における Claudin-11の発現

血液脊髄関門においても同様に claudin-11 の発現が示された。興味深いことに、claudin-11 のタンパク質発現量は、血液脳関門に比べて有意に小さいことが示された。これは、血液脊髄関門の密着結合の強度

が血液脳関門に比べて弱いという過去の報告と一致した結果であった (細胞膜非透過性物質の脊髄内への移行量が脳よりも大きいことや多発性硬化症の神経傷害は脳よりも脊髄で顕著であるという報告)。

多発性硬化症患者 (図 2) および多発性硬化症モデルマウス (EAE マウス) の脳および脊髄の血管 (血管マーカーの Glut1 との共染色) において claudin-11 の発現が顕著に低下することが示された。複数の血管を用いて発現量の低下率を定量したところ、脊髄血管における低下率は脳血管に比べて大きかった。脊髄血管では、正常時における claudin-11 の絶対発現量も脳血管に比べて小さいため、多発性硬化症の病態では、脊髄関門における claudin-11 の発現量は極めて低いことが示唆された。これは多発性硬化症の神経傷害が脳よりも脊髄で顕著であることと相関しているため、多発性硬化症における関門崩壊に claudin-11 の発現低下が寄与している可能性を示唆している。

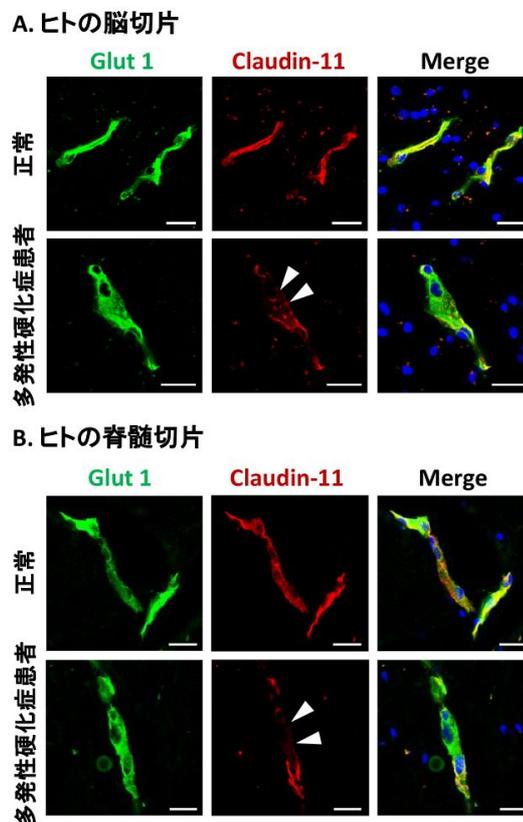


図2 多発性硬化症における claudin-11 の発現低下

中枢の上皮系バリアーである脳脊髄液関門 (脈絡叢上皮細胞) と血液クモ膜関門について、多発性硬化症モデル (EAE) マウスで claudin-11 の発現量が低下しているか否かを解析した結果、脳脊髄液関門では発現の変動は観察されなかった。対照的に、血液クモ膜関門については、脳・脊髄を問わず、正常

時に観察されていた軟髄膜上の claudin-11 のシグナルが、EAE マウスでは消失したことから (図 3)、多発性硬化症の病態において claudin-11 の発現が低下することが示唆された。発現が消失していた部位において細胞の浸潤が観察された (図 3、矢印部位)。CD3e 抗体を用いて染色した結果、その浸潤はリンパ球の浸潤であることが示された。

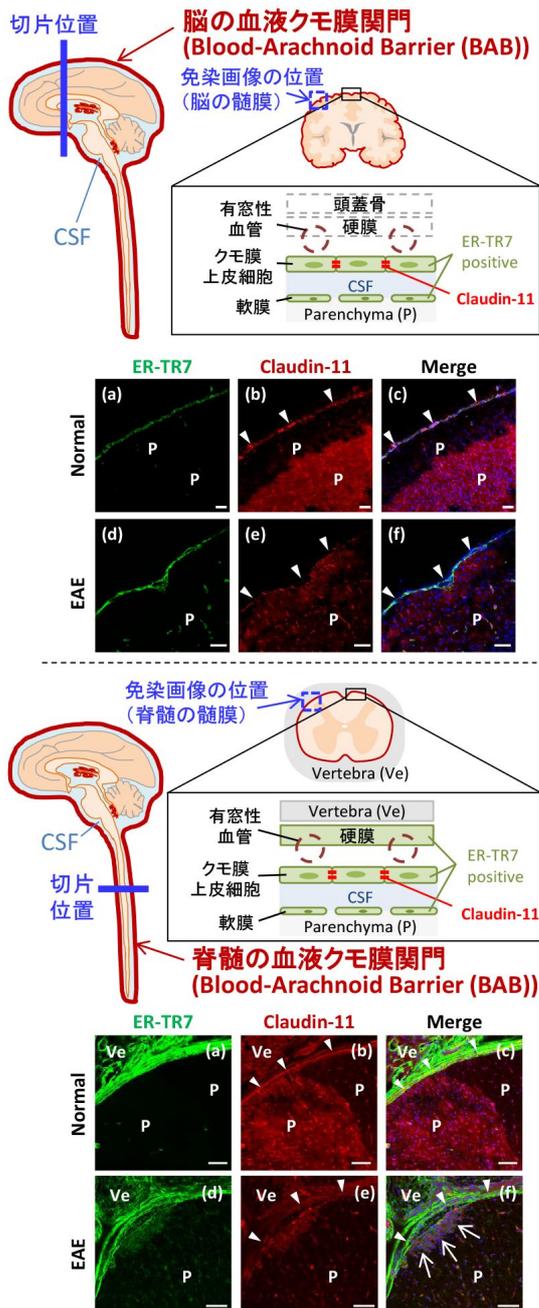
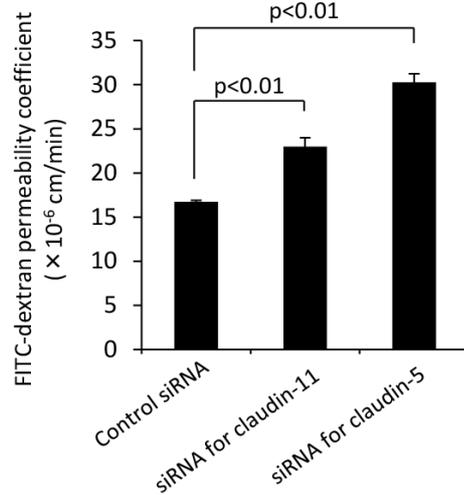


図3 多発性硬化症モデルマウスの血液-クモ膜関門におけるclaudin-11の発現低下

これらの内皮系および上皮系の中樞関門における claudin-11 の発現低下によって関門の強度が低下しているか否かを明らかにするために、siRNA による発現低下処理によって細胞膜非透過性物質 FITC-dextran のパラセルラー透過性が亢進するか否かを検証

した。その結果、内皮系バリアーである脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) および上皮系バリアーである脈絡叢上皮細胞 (TR-CSFB 細胞) の単層膜において、ともに FITC-dextran の透過性が有意に上昇した (図 4)。従って、claudin-11 は、中樞関門の密着結合形成に寄与する分子であり、その発現低下は関門のバリアー強度を低下させることが明らかとなった。In vitro 系と in vivo のヒト脳毛細血管の claudin-11 のタンパク質絶対発現量の違いに基づいて in vivo 血液脳関門での密着結合形成に対する claudin-11 の寄与を算出した結果、claudin-5 とほぼ同等のレベルで高いことが示された。

A. [中枢内皮系バリアー] 脳毛細血管内皮細胞単層膜におけるパラセルラー透過性



B. [中枢上皮系バリアー] 脈絡叢上皮細胞単層膜におけるパラセルラー透過性

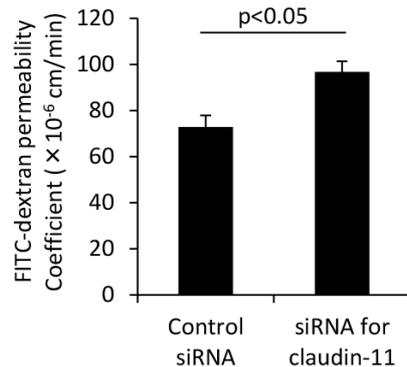


図4 中枢の内皮系と上皮系バリアーの密着結合形成にclaudin-11が関与

多発性硬化症の関門崩壊の程度は、生体内のアンドロジェンのレベルに反比例する。ア

ンドロジェンによる関門崩壊抑制メカニズムに claudin-11 が関与しているか否かを明らかにするために、アンドロジェン処理によって claudin-11 の発現と細胞膜局在が回復するか否かを hCMEC/D3 細胞を用いて検証した結果、EAE マウス血清の処理で観察された claudin-11 の内在化・発現消失は、アンドロジェンの追加処理によって有意に阻害された。

【まとめ】

本研究によって、Claudin-11 分子が、内皮系および上皮系の中枢関門の密着結合形成に寄与し、その発現低下（血液脳関門、血液脊髄関門、血液クモ膜関門）が多発性硬化症における中枢関門のバリアー機能破綻の重要な原因のひとつであることが初めて明らかとなった。

中枢組織の関門の崩壊は、多発性硬化症の発症の原因であり、中枢のあらゆる関門組織で生じることから、本研究では世界で初めて、すべての中枢関門組織（血液脳関門、血液脊髄関門、血液脳脊髄液関門、血液クモ膜関門）に着目し、多発性硬化症の病態の部位差と照らし合わせながら関門崩壊のメカニズムを分析した。本研究で着目した claudin-11 は、あらゆる中枢関門に発現し、多発性硬化症の病態で発現低下することが明らかとなったが、このようなタイプの密着結合分子はこれまでに同定されていない。従って、claudin-11 は、多発性硬化症の関門崩壊を説明する代表的な分子である可能性が示唆される。本発見は、多発性硬化症の根本的治療の実現に向けた重要な第一歩であり、多発性硬化症の治療研究を加速することが期待される。

なお、本研究成果をまとめた論文は、現在、査読中である。

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 2 件)

- (1) Zhang Z, Uchida Y, Hirano S, Ando D, Kubo Y, Auriola S, Akanuma SI, Hosoya KI, Urtti A, Terasaki T, Tachikawa M. Inner Blood-Retinal Barrier Dominantly Expresses Breast Cancer Resistance Protein: Comparative Quantitative Targeted Absolute Proteomics Study of CNS Barriers in Pig. *Mol Pharm*. 査読有、2017; 14(11): 3729-3738. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00493.
- (2) Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T. Actin filament-associated protein 1 (AFAP-1) is a key mediator in inflammatory signaling-induced rapid attenuation of

intrinsic P-gp function in human brain capillary endothelial cells. *J Neurochem*. 査読有、2017; 141(2): 247-262. doi: 10.1111/jnc.13960.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 内田康雄, 住谷智仁, 立川正憲, 山川達也, 村田将, 八木悠太, 佐藤和貴, 伊藤克彰, 大槻純男, Pierre-Olivier Couraud, 鈴木貴, 寺崎哲也: 多発性硬化症における中枢関門の破綻への新規密着結合分子 claudin-11 の寄与の解明、日本薬学会第 33 年会、2018 年、静岡
- (2) 住谷智仁, 内田康雄, 山川達也, 村田将, 八木悠太, 佐藤和貴, 伊藤克彰, 立川正憲, 大槻純男, 鈴木貴, 寺崎哲也: 中枢関門の密着結合形成における claudin-11 の寄与と多発性硬化症におけるその発現低下の解明、日本薬学会第 138 年会、2018 年、金沢
- (3) Uchida Y, LC-MS/MS-based research for Blood-Brain Barrier and Malignant Brain Tumor. Seminar in Institute for Research in Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, 2017(招待講演)
- (4) 張正宇, 内田康雄, 平野誠巳, 安藤大介, 久保義行, Seppo Auriola, 赤沼伸乙, 立川正憲, 細谷健一, Arto Urtti, 寺崎哲也: プラ BRB, BBB 及び BCSFB の輸送担体の絶対発現量解析: BCRP の重要性、日本薬学会第 32 年会、2017 年、さいたま (最優秀発表賞受賞)
- (5) 平野誠巳, 内田康雄, 立川正憲, 後藤諒平, 寺崎哲也: Development of label free comprehensive absolute quantification method by SWATH-MS combined with in silico peptide selection criteria ~Its application for the hepatic drug delivery~, 日本薬物動態学会第 32 回年会、2017 年、東京 (優秀口頭発表賞受賞)
- (6) 八木悠太, 立川正憲, 内田康雄, 寺崎哲也: Proteomics based characterization of the blood-spinal cord barrier transporters in rats: Comparison with the blood-brain barrier、日本薬物動態学会第 32 回年会、2017 年、東京
- (7) 陳瓊芳, 内田康雄, 黒田広樹, 梅津美奈, 八木悠太, 立川正憲, 寺崎哲也: 脳転移性メラノーマ細胞由来 exosomes によるヒト脳毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 のエネルギー代謝抑制制御、日本薬学会第 137 年会、2017 年、仙台
- (8) 住谷智仁, 内田康雄, 山川達也, 村田将, 張正宇, 立川正憲, 大槻純男, 寺崎哲也: 中枢関門における androgen 刺激に応答した claudin-11 発現調節作用の解明と血液クモ膜関門における claudin-11 の発現解析、日本薬学会第

137 年会、2017 年、仙台 (**優秀発表賞受賞**)

- (9) 内田 康雄 : Next generation quantitative proteomics “SWATH 法”の基礎と応用、第 12 回 東北大学学際科学フロンティア研究所 FRIS セミナー、2016 年、仙台 (**招待講演**)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究業績:

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/profile/uchida.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 康雄 (UCHIDA, Yasuo)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 70583590

(3) 連携研究者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 00401810

寺崎 哲也 (TERASAKI, Tetsuya)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 60155463