

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790526

研究課題名（和文）生物学的製剤による白質脳症発症機序

研究課題名（英文）Monoclonal antibody against tumour necrosis factor alpha-associated leukoencephalopathy in rheumatoid arthritis

研究代表者

西奥 剛 (NISHIOKU TSUYOSHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90435115

研究成果の概要（和文）：関節リウマチにおける脳血管内皮障害は、脳梗塞の発症リスクを上昇させ、また、血液脳関門（BBB）機能の脆弱化による治療薬物の中枢有害作用発現の危険因子ともなる。そこで、関節リウマチのモデル動物としてコラーゲン誘導関節炎（CIA）マウスを使用しBBB機能障害について解析を行った。CIAマウスでは、脳血管透過性が亢進ならびにTJsタンパク質発現の減少が観察され、BBB機能が障害されていることが判った。さらに、関節リウマチ病態下において発現増加するS100A4が、脳血管内皮細胞に作用し、TJsタンパク質の発現を減少させ、脳血管透過性を亢進させることが示唆された。以上、本研究は、関節リウマチにおけるS100A4の増加がBBB機能を脆弱化させることを示唆する実験証拠を提示し、関節リウマチの薬物治療における白質脳症の発症に関与する可能性を示唆するのである。

研究成果の概要（英文）：Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease associated with chronic inflammation of the joints. RA has been shown to increase the morbidity of and mortality due to cardiovascular and cerebrovascular diseases. This study was aimed at evaluating a role of S100A4 in the mediation of blood-brain barrier (BBB) dysfunction in CIA mice. Cerebrovascular permeability and serum levels of S100A4 were increased in CIA mice. Increased S100A4 levels in the serum are closely correlated with hyperpermeability of the cerebrovascular endothelium. S100A4 increased paracellular permeability of the mouse brain capillary endothelial cells (MBECs). S100A4 reduced the expression of occludin, a tight junction protein in MBECs. These findings suggest that S100A4 increases paracellular permeability of MBECs by decreasing expression levels of occludin. The present study highlights a potential role for S100A4 in BBB dysfunction underlying cerebrovascular diseases in patients with RA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬理学

科研ひの分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：生物学的製剤、白質脳症、関節リウマチ、血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

免疫・炎症性疾患の病態形成にかかわる特定分子の機能制御を目的として開発されたモノクローナル抗体などの生物学的製剤は、難治性の自己免疫疾患の治療に画期的な効果を示している。特に関節リウマチの薬物治療においてTNF- α を標的としたインフリキシマブ・エタネルセプト・アダリムマブの台

頭は、関節破壊の進行抑制、寛解導入を可能とし、治療目標にパラダイムシフトをもたらした。今後、様々な分子を標的とした新しい免疫抑制剤ならびに適応症の追加承認により、免疫抑制剤の使用が増加することは明確である。しかし、免疫抑制剤はその優れた有効性の反面、副作用も多様で重篤な場合もあり、薬物治療上大きな問題となる。最

近、国内外において免疫抑制剤の使用による白質脳症（脱髄疾患）の有害事象が報告された。その症状としては言語障害・認知障害・運動障害が起き、進行すると意識障害により昏睡状態になることもある。さらにその診断には頭部 MRI 検査を必要とし、他の病態（脳血管障害など）との判別など容易ではない。しかし、白質脳症の発症機構については不明である。従って、このリスクを最小限にとどめ、有効性を最大限に発揮させるためにも、免疫抑制剤による白質脳症の発症予測・回避対策の構築は、医療薬学研究的緊急課題である。

白質脳症はシクロスポリン、タクロリムス、メトトレキサートなどの免疫抑制薬でも発症する。関節リウマチの治療において免疫抑制剤はメトトレキサートと併用使用されることが多く、さらに免疫抑制剤使用の拡大を考慮すると白質脳症発症機序の解明は急務である。米国において、免疫抑制剤の使用により致死的で非可逆的な進行性白質脳症の発症が報告されており、原因として JC ウィルスの感染が指摘されているが、免疫抑制剤による白質脳症の所見の多くは可逆性であり、JC ウィルスも検出されていない。そこで本研究は、生物学的製剤によって誘発される白質脳症の発症機序を明らかにし、生物学的製剤による中枢性副作用発現の予測・回避策の基盤を提示する。

2. 研究の目的

血液脳関門 (BBB) は、末梢循環から脳への物質の遮断と取り込みという二律相反を、その構成単位である脳微小血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトの3種類の細胞が機能的に一体となって克服した高度機能分化システムである。BBB は脳微小血管内皮細胞同士が密着結合 (TJs) を形成することにより細胞間が隙間なく閉じられおり、多くの物質の脳内移行を制限している。TJs は、occludin や claudine-5 といった膜貫通型タンパク質および、ZO-1 などの細胞質内の膜裏打ちタンパク質からなる複合体で、これらのタンパク質により TJs 構造は保持され、脳への物質移行を厳密に制御している。また、BBB においては、P-糖タンパク質やI型グルコーストランスポーター等の基質特異性、輸送方向性、発現極性を有する多様なトランスポーターが脳血管内皮細胞に発現しており、糖・アミノ酸・ヌクレオチド等の選択的取り込み、薬物・毒物等の血液側への汲み出しを行うことによっても関門機能維持を担っている。BBB 機能はアルツハイマー病、脳虚血などの中枢神経変性疾患において障害されることが知られている。また近年、BBB 障害は中枢神経変性疾患以外の痛みや炎症によっても誘導

されることが報告された。さらに我々は、リポポリサッカライドの末梢投与により誘発した急性の全身性炎症マウスにおいて BBB 機能が破綻し、脳内炎症反応が惹起されることをすでに報告した。しかし、関節リウマチなどの慢性炎症における BBB 機能病態については不明な点が多い。

関節リウマチは関節炎と進行性関節破壊を主症状とする慢性炎症疾患であり、罹患年数とともに関節破壊・機能障害が進行して、重篤な運動機能障害に陥り、ADL の阻害・QOL の低下を惹き起こす。関節リウマチは、免疫機能亢進を基盤とする慢性炎症性自己免疫疾患であることは明らかであるが、いまだに病因・病態は明らかでない。関節リウマチ患者において心筋梗塞や脳梗塞のリスクが有意に高いことが報告されている。この関節リウマチにおける心筋梗塞、脳梗塞の高い発症リスクの背景には血管内皮障害が挙げられる。また、関節リウマチにおける脳血管内皮障害は、脳梗塞の発症リスクを上昇させるだけでなく、BBB 機能の脆弱化により治療薬物の中核有害作用を惹起する危険性をも孕んでいる。この薬物中核有害作用を最小限にとどめ治療薬物の有効性を最大限に発揮させるためにも、関節リウマチにおける BBB 機能病態の解析は医療薬学研究的の重要課題である。本研究では、関節リウマチのモデル動物としてコラーゲン誘導関節炎マウスを使用し、BBB 機能障害について解析を行った。さらに、関節リウマチ病態下において BBB 機能障害を惹き起こす因子について、関節リウマチ患者において発現増加する S100A4 に着目し解析を行った。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン誘導関節炎 (CIA)

コラーゲン誘導関節炎は、II型コラーゲンと完全フロイントアジュバントを1:1に混ぜ安定なエマルジョンとし、その0.1mLをマウスの尾の付け根に皮内注射した。II型コラーゲンを免疫しないマウスを対照群として使用した。II型コラーゲン免疫後21日目から2日おきに四肢の関節炎を評価した。関節炎は0から4の5段階でスコア化し、四肢の関節炎スコアを合計したトータル関節炎スコアで評価した。

(2) 脳血管透過性の定量

ハロタン麻酔下においてコラーゲン誘導関節炎マウス及び対照群マウスの鎖骨下静脈を露出し、フルオレセインナトリウム (Na-F) を鎖骨下静脈から投与した。PBS で全身を灌流脱血し、脳を摘出後、ホモジナイズして蛍光強度を測定した。

(3) マウス血清中 S100A4 濃度測定

マウス血清中 S100A4 濃度測定には ELISA を用いた。イムノモジュールに抗 S100A4 抗体を 100 μ L 入れ、4 $^{\circ}$ C で一晩処理した。ブロッキング後、TBS で洗浄し、希釈した血清とビオチン化した抗 S100A4 抗体を入れ、90 分間処理した。T-TBS で洗浄した後、HRP 標識ストレプトアビジンを入れ、室温で 1 時間処理した。発色基質を入れ吸光度を測定した。

(4) TJs タンパク質の蛍光免疫染色

コラーゲン誘導関節炎マウスおよび対照群マウスを PBS で灌流脱血後、脳を摘出し、 -25° C のイソペンタンで凍結させ、凍結冠状切片 (10 μ m) を作成した。切片作成後、 $-$ アセトンにて固定し、組織試料とした。組織試料は、ブロッキング後、1 次抗体 (抗 Occludin 抗体、抗 CD31 抗体) を一晩処理した。1 次抗体処理後、2 次抗体を処理した。染色した組織標本は Biozero (KEYENCE BZ-8000) を用いて観察・解析した。なお、血管腔の直径が 50 μ m 以下のものを脳微小血管と定義し観察した。

(5) マウス脳血管内皮細胞 (MBEC)

ICR マウスの大脳皮質を単離し、タイプ II コラゲナーゼと DNase I にて処理した。20% BSA-DMEM を加え遠心分離後、ペレットをコラゲナーゼ-ディスペーゼと DNase I にて処理した。33% パーコール溶に重層し、1 遠心分離後、脳毛細血管片を回収した。得られた脳毛細血管片を 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂/95% 大気下で 4 日間培養後、Transwell[®] (Costar) インサートにて 7 日間培養して MBEC を得た。

(6) MBEC 細胞透過性

MBEC 細胞透過性は Na-F 透過係数を指標とした。Na-F をインサートに添加した後、30、60、90、120 分後にサンプルを採取し、サンプルの蛍光強度を用いて測定し、クリアランスと透過係数を算出した。

(7) 経内皮電気抵抗値 (TEER) 測定

TEER は Endohme と EVOM resistance meter (World Precision Instruments) を使用して測定した。

(8) ウェスタンブロッティング

コラーゲン誘導関節炎マウスの脳ならびに MBEC よりサンプルを調製し、還元条件化にて SDS-PAGE を行なった。泳動後、分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写した後、ブロッキングし、1 次抗体 (抗 Occludin 抗体、抗 ZO-1 抗体) を処理した。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体処理後、ECL 法により可視化した。

4. 研究成果

(1) CIA

関節炎は II 型コラーゲン免疫後 21 日目

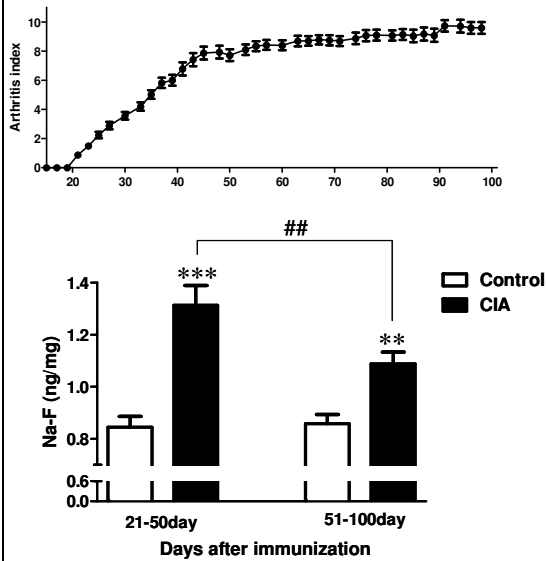


図 1 CIA マウスにおける脳血管透過性の亢進

より発症し始め (発症率 55.9%)、35 日目にはすべてのマウスにおいて関節炎が発症した (発症率 100%)。関節炎は免疫後 50 日目まで急激に上昇し、最大となった後、最終評価の 100 日目まで継続した (図 1)。

(2) CIA マウスにおける脳血管透過性の亢進

脳血管透過性は、脳内 Na-F 蓄積量により評価した。脳内 Na-F 蓄積量は、対照群と比較して CIA マウスで有意に増加していた。CIA マウスにおける脳内 Na-F 蓄積量の増加を免疫後 21~50 日目 (進行期) と 51~100 日目 (継続期) に分けてみると、継続期よりも進行期で脳内 Na-F 蓄積量が有意に増加していた (図 1)。関節炎の進行期において BBB 機能障害が顕著に発現することを示唆するものと考えられる。

(3) CIA マウスにおける TJs タンパク質発現の減少

CIA マウスにおける occludin の発現は対照群と比較して有意に減少していた (図 2)。また、マウス脳微小血管における occludin の発現を脳血管内皮細胞との蛍光 2 重免疫染色によって解析した。対照群において occludin は血管に沿った典型的な連続した染色像を示したのに対し、CIA における occludin の染色像は非連続的なパターンを示した (図 2 矢印)。CIA マウスにおいては、occludin が減少し、BBB 機能が障害されていることが示唆された。

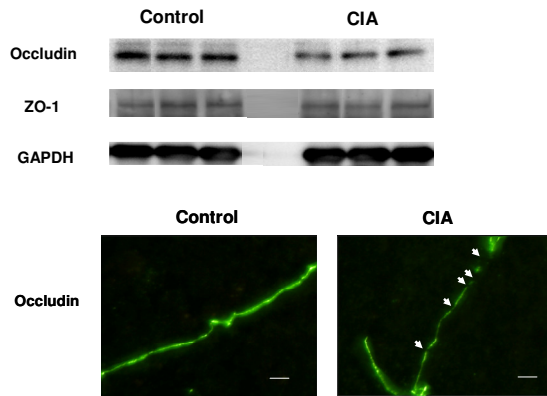


図2 CIA マウスにおける TJs タンパク質発現の減少

(4) CIA マウスにおける BBB 機能障害と S100A4 との関連

血清中 S100A4 濃度は CIA マウスで有意に増加していた(図3)。脳内 Na-F 蓄積量と血清中 S100A4 濃度をプロットすると、両者に強い正の相関が認められた(図3)。関節リウマチにおいて発現増加する S100A4 が BBB 機能障害に関与する可能性が示唆された。

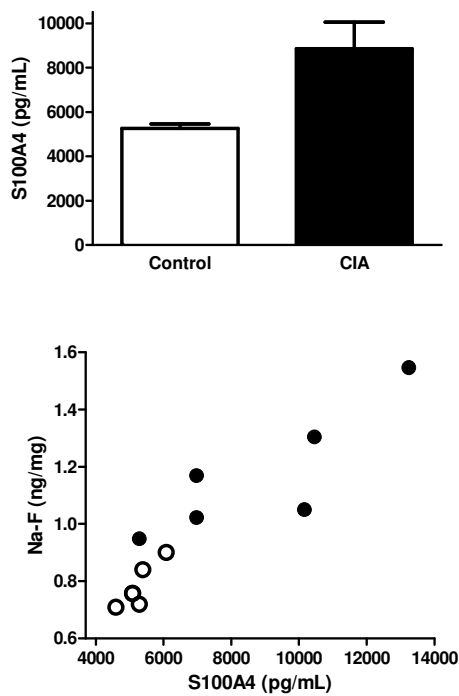


図3 CIA マウスにおける BBB 機能障害と S100A4 との関連

(5) MBEC の TJs に対する S100A4 の影響

MBEC を用いて、TJs に対する S100A4 の影響を調べた。S100A4(1000、2000 ng/mL) 刺激により MBEC の Na-F 透過係数は有意に増加し(図4 上)、TEER 値は有意に低下した(図4 下)。また、MBEC における occludin の発現量

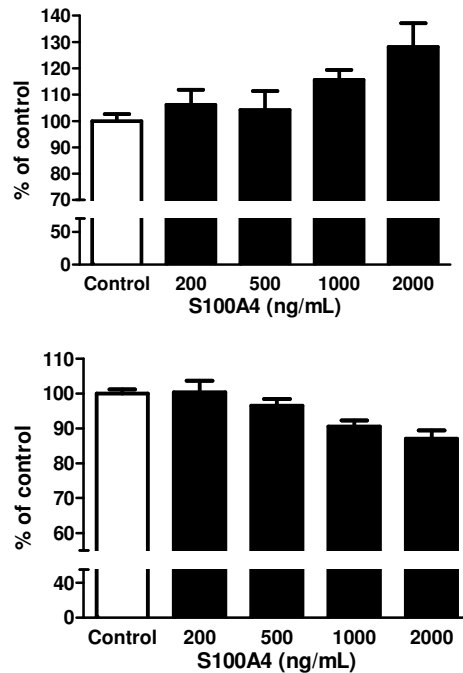


図4 MBEC 透過性に対する S100A4 の影響

は、S100A4 刺激により有意に低下した(図5)。関節炎症病態において発現増加する S100A4 が、脳血管内皮細胞に作用し、occludin の発現を減少させ、脳血管透過性を亢進させることが示唆された。

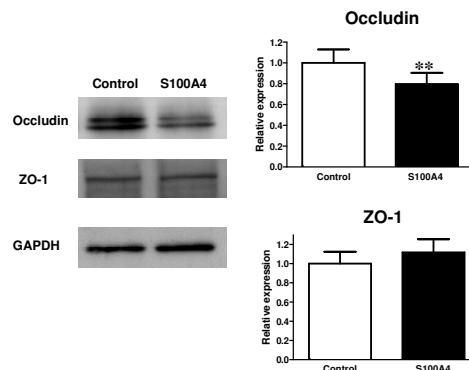


図5 MBEC の TJs に対する S100A4 の影響

以上、CIA マウスの BBB 機能は障害されていること、その BBB 機能障害は関節炎の進行期において顕著に発現することが示唆された。また CIA マウスの BBB 機能障害における S100A4 の関与について解析した結果、BBB 機能障害と血清中 S100A4 濃度に強い相関が認められ、関節リウマチにおいて発現増加する S100A4 が BBB 機能障害に関与する可能性が示唆された。また、S100A4 は MBEC 透過性を有意に亢進させ、occludin の発現量を減少させた。関節炎症病態において発現増加する S100A4 が、脳血管内皮細胞に作用し、occludin の発現を減少させ、脳血管透過性を亢進させることが示唆された。以上、本研究

は、関節リウマチにおける S100A4 の増加が BBB 機能を脆弱化させることを示唆する実験証拠を提示し、本疾病患者の薬物治療における中枢有害作用発現の危険性に注意を喚起するべく根拠となるものである。

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 8 件)

1. Partial hepatectomy aggravates cyclosporin A-induced neurotoxicity by lowering the function of the blood-brain barrier in mice. Yamauchi A, Dohgu S, Takata F, Watanabe T, Nishioku T, Matsumoto J, Ohkubo Y, Shuto H, Kataoka Y. *Life Sci.* 2011; 88(11-12):529-34. 査読有
2. Autocrine and paracrine up-regulation of blood-brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Oda M, Harada E, Watanabe T, Nishioku T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. *Microvasc Res.*, 2011; 81(1):103-7. 査読有
3. Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice. Nishioku T, Yamauchi A, Takata F, Watanabe T, Furusho K, Shuto H, Dohgu S, Kataoka Y. *Neurosci Lett.*, 482(3):208-11. 2010. 査読有
4. Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function. Dohgu S, Sumi N, Nishioku T, Takata F, Watanabe T, Naito M, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. *Eur J Pharmacol.*, 644(1-3):5-9. 2010. 査読有
5. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y. *J Pharmacol Sci.*, 112(2):251-4. 2010 査読有
6. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y.

Cell Mol Neurobiol., 30(2):247-53. 2010. 査読有

7. Angiotensin II AT1 blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Larrayoz IM, Zhou J, Baliova M, Nishioku T, Saavedra JM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 296(5):R1376-84. 2009. 査読有
8. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama K.B, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y. *Cell Mol Neurobiol.*, 29(3):309-16. 2009. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. コラーゲン誘導関節炎マウスのパンナスにおける Cyclophilin A と CD147 の発現増加とその局在
三浦哲平、西奥剛、大石裕晃、津曲康輔、山内淳史、首藤英樹、片岡泰文
第 131 回日本薬学会年会，2010 年 3 月 30 日，誌上
2. 関節炎モデルマウスの血液脳関門機能障害における S100A4 の役割
富田彩乃、西奥剛、大石裕晃、三浦哲平、道具伸也、山内淳史、首藤英樹、片岡泰文
第 84 回日本薬理学会年会，2010 年 3 月 24 日，誌上
3. 関節炎モデルマウスにおける血液脳関門障害
古庄弘宜、西奥剛、三浦哲平、富田彩乃、道具伸也、高田芙友子、渡辺拓也、山内淳史、首藤英樹、片岡泰文
第 83 回日本薬理学会年会，2010 年 3 月 17 日，大阪市
4. Activation of microglia and migration of brain pericytes are involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide
Tsuyoshi Nishioku, Noriko Sumi, Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Takashi Machida, Hideki Shuto, Atsushi Yamauchi and Yasufumi Kataoka
第 1 回アジア神経精神薬理学会，2009 年 11 月 14 日，京都市
5. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice.
Tsuyoshi Nishioku, Shinya Dohgu, Fuyuko

o Takata, Shinsuke Nakagawa, Hideki Sh
uto, Atsushi Yamauchi, Masami Niwa, Ya
sufumi Kataoka
8th Cerebral Vascular Biology, 2009年6月
30日, 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西奥 剛 (NISHIOKU TSUYOSHI)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号 : 90435115