

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04197

研究課題名(和文) 血液脳関門構成細胞のクロストークを利用した中枢神経自己免疫疾患新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy for the development of therapeutics against autoimmune disease of the central nervous system, utilizing the crosstalk of cells forming blood-brain barrier.

研究代表者

神田 隆 (KANADA, Takashi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40204797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性化合物ライブラリーから血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)に作用する化合物を選定し、該当する脂質メディエーター受容体リガンド20種類をBBBマルチ培養モデルに投与した結果、2種類の化合物EP4 agonistとS1P5 agonistで、BBBの調節因子である神経栄養因子BDNFの産生能が亢進した。これらの化合物は、AST単培養群でも有意に神経栄養因子BDNFの産生能を亢進させることから、候補化合物がEC/PCTを通過しASTに直接作用することでBDNFの産生分泌を亢進する可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回同定した2種類の脂溶性化合物は、中枢神経内での神経栄養因子の産生を促すことによって中枢神経実質の内部環境を神経再生の方向に改変する神経変性疾患治療薬のリード化合物としての可能性があるだけでなく、BBB調節のための栄養因子の分泌を人為的に制御できる可能性があり、高分子治療薬を中枢神経内に流入させる際の補助治療薬となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Twenty selective lipid mediator receptor agonists, screened to be permeable through blood-brain barrier (BBB), were analyzed. After adding in the culture media for BBB multi-culture model composed of human endothelial cell, pericyte and astrocyte, upregulation of BDNF in aliquot was observed in two compounds, EP4 agonist and S1P5 agonist. Since these two compounds also increase the production of BDNF in astrocyte monoculture, we concluded that they may go through endothelial cell/pericyte layer, and affect astrocyte directly to enhance the production of BDNF.

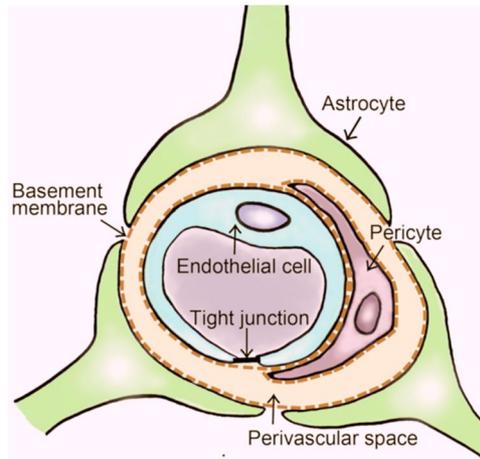
研究分野：神経内科学

キーワード：血液脳関門 ペリサイト 内皮細胞 低分子化合物 アストロサイト 脂質メディエーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)は、脳血管内皮細胞(EC)、ペリサイト(PCT)、アストロサイト(AST)、基底膜で形成され、これらの密接なクロストークにより強固なバリアを形成する(図1)¹⁾。しかしその強力なバリア機構のため、これまで神経栄養因子や他臓器で使用される治療薬が中枢神経系に作用させることができなかった。近年、我々はBBB構成成分であるヒト由来の温度条件不死化PCT株とAST株の樹立に成功し²⁻³⁾、PCT,ASTが様々な神経栄養因子を分泌し、BBBの強力な調節因子であることを明らかにしてきた⁴⁾。しかしながら、これまで複数の技術的な問題点からヒト*in vitro*系BBBモデルが確立困難な状況であり、中枢神経系に対する創薬研究は全く進んでこなかった。そこで我々は、EC,PCT,ASTによるマルチ培養下での生理条件に近い*in vitro*BBBモデルを作成し、PCT,ASTからのBBB調節のための栄養因子の分泌を制御する化合物の同定法を確立できれば、治療薬を中枢神経内に流入させる補助治療薬の候補化合物の効率的なスクリーニングが可能となり、中枢神経疾患の新規治療薬の開発につながるのではないかと考えた。近年我々はこれらの技術的な問題を解決した理想的なBBBモデルの作成に成功し、ようやくPCT,ASTを用いたBBB調節因子のスクリーニングが可能な段階となった。



2. 研究の目的

本研究では、生理活性化化合物ライブラリーから血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)に作用する化合物を選定する。さらに、それらの化合物を当科で開発した*in vitro*BBBマルチ培養モデルに作用させ、BBBの調節因子である複数の神経栄養因子を測定し、栄養因子を増加させる候補化合物を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PCT、ASTでの神経栄養因子の測定系の確立

代表的な神経栄養因子であるBDNF,GDNF,VEGFの産生能をPCT,ASTを保持しているかを確認するために代表的な神経栄養因子を誘導するhydrocortisoneをPCT,ASTに作用させ、それらの産生能を検証した。

PCTでの検証

- ・ヒト脳由来不死化PCT培養細胞を細胞培養プレートに培養した。
- ・測定的确立のため、PCTにHydrocortisone($276 \times 10^3 \text{ nM}$)を投与し、投与後12時間、24時間後のBDNF, GDNF, VEGFのm-RNAの発現をreal-time PCR法で評価した。
- ・PCTに各濃度のHydrocortisone($276 \times 10^2 \text{ nM}$, $276 \times 10^3 \text{ nM}$, $276 \times 10^4 \text{ nM}$)を投与し、24時間、48時間後のBDNF, GFNF, VEGFの発現量をELISA法で測定した。

ASTでの検証

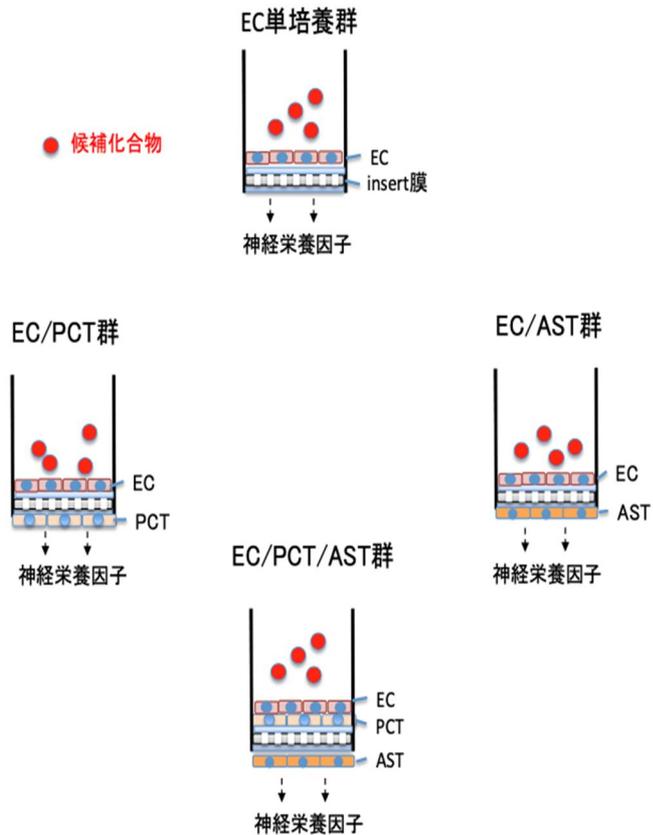
- ・ヒト脳由来不死化AST培養細胞を細胞培養プレートに培養した。
- ・測定的确立のため、ASTに各濃度のhydrocortisone($276 \times 10^2 \text{ nM}$, $276 \times 10^3 \text{ nM}$, $276 \times 10^4 \text{ nM}$)を投与し、24時間、48時間後のBDNF, VEGFの発現量をELISA法で測定した。

(2) PCT、ASTからのBDNFの分泌を促進させる化合物を探索

製薬会社 A から提供された 20 種類の脂溶性化合物(A-T)を Dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解し、FBS 未添加の AM に 1%DMSO となるように希釈した。ヒト脳由来不死化 PCT または AST 培養細胞を細胞培養プレートに培養した。Hydrocortisone $276 \times 10^4 \text{ nM}$ + 反応時間 48 時間 positive control とし、培養液に 薬物(IC50 から算出した濃度 + 1/10 量 + 10 倍量)を添加し、37 48 時間で反応させた。培養上清中に分泌された BDNF を ELISA 法で測定した。

(3) EC,PCT, AST の共培養、マルチ培養下での BDNF の分泌を促進させる化合物を探索

次に EC を 24-well plate 用 cell culture insert の表側に培養した一層のサンプル(EC)と、insert の表側に EC、裏側に PCT または AST を共培養した二層のサンプル(EC/PCT、または EC/AST)、insert に EC,PCT,AST のマルチ培養したサンプル (EC/PCT/AST)の計 4 種類の insert を作製した。評価対象化合物を含有する、FBS 未添加の AM で培地を置換した(各対象化合物の濃度は実験 2 で最も PCT,AST で産生能を認めた濃度を使用した)。Control 群には 0.1%DMSO を含む、FBS 未添加の AM を用いた。各サンプルを 48 時間、37 培養後、評価対象化合物を 24 時



間作用させ、lower well の培養液を回収し、ELISA 法で BDNF を合計 3 回測定し、Control 群と比較し 1.5 倍以上の産生亢進がみられた化合物を選定した。

4 . 研究成果

(1) PCT、AST での神経栄養因子の測定系の確立

PCT での検証

Hydrocortisone ($276 \times 10^3 \text{ nM}$)が、PCT による BDNF, GDNF, VEGF mRNA 発現を促進することを確認した。また、hydrocortisone ($276 \times 10^3 \text{ nM}$, 10^4 nM)投与 48 時間後で、PCT からの BDNF, GDNF 分泌が亢進した。Hydrocortisone ($276 \times 10^4 \text{ nM}$)、反応時間 48 時間を positive control とした PCT 培養上清中の BDNF, GDNF の ELISA での定量が可能となった。

AST での検証

Hydrocortisone ($276 \times 10^3 \text{ nM}$, 10^4 nM)投与 48 時間後で、AST からの BDNF 分泌が亢進した。PCT と同様に、AST 培養上清中の BDNF の ELISA での定量が可能と判断した。

(2) PCT, AST からの BDNF の分泌を促進させる化合物を探索

19 化合物のうち 16 化合物で、陽性対照以上に PCT 培養上清中の BDNF 増加がみられた。

19 化合物のうち 10 化合物で、陽性対照以上に AST 培養上清中の BDNF 増加がみられた。

(3) EC,PCT, AST の共培養、マルチ培養下での BDNF の分泌を促進させる化合物を探索

EC 単独の培養条件下では、BDNF の産生を亢進させる化合物はみられなかった。

EC/PCT の共培養条件下では、BDNF の産生を亢進させる化合物はみられなかった。

EC/AST の共培養条件下、EC/PCT/AST のマルチ培養条件下では、2 つの化合物に BDNF 産生亢進効果があることを確認した。

今回、脂質メディエーター受容体リガンド 20 種類を BBB マルチ培養モデルに投与した結果、2 種類の化合物 EP4 agonist と S1P5 agonist で、BBB の調節因子である神経栄養因子 BDNF の産生能が亢進した。これらの化合物は、AST 単培養群でも有意に神経栄養因子 BDNF の産生能を亢進させることから、候補化合物が EC/PCT を通過し AST に直接作用することで BDNF の産生分泌を亢進する可能性が高いと考えられた。今回同定した 2 種類の脂溶性化合物は、中枢神経内での神経栄養因子の産生を促すことによって中枢神経実質の内部環境を神経再生の方向に改変する神経変性疾患治療薬のリード化合物としての可能性があるだけでなく、BBB 調節のための栄養因子の分泌を人為的に制御できる可能性があり、高分子治療薬を中枢神経内に流入させる際の補助治療薬となりうると結論付けた。

参考文献

- 1) Takeshita Y, Ransohoff MR. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier (BBB): Chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev* 2012;248: 228-239
- 2) Shimizu F, Sano Y, Tominaga O et al. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of transforming growth factor- β by pericytes and vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 by endothelial cells *in vitro*. *Neurobiol* 2013;34:1902-12
- 3) Haruki H, Sano Y, Shimizu F et al., NMO-sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J Neurol Sci* 2013;331:136-44
- 4) Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:123-150
- 5) Adrian D. Hobson, Christopher M. Harris et al, Discovery of A 971432, An Orally Bioavailable Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 5 (S1P₅) Agonist for the Potential Treatment of Neurodegenerative Disorders *J. Med. Chem* 2015;58:9154 - 9170

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H Nishihara, T Maeda, Y Sano, M Ueno, N Okamoto, Y Takeshita, F Shimizu, M Koga, T Kanda	4. 巻 8
2. 論文標題 Fingolimod promotes blood-nerve barrier properties in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e00924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nienke R Wevers, Dhanesh G Kasi, Taylor Gray, Karlijn J Wilschut, Benjamin Smith, Remko van Vught, Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Takashi Kanda, Graham Marsh, Sebastiaan J Trietsch, Paul Vulto, Henriette L Lanz, Birgit Obermeier	4. 巻 15
2. 論文標題 A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high throughput assessment of barrier function and antibody transport.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fluids Barriers CNS	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12987-018-0108-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fumitaka Shimizu, Kritin L. Schaller, Gregory P. Owens, Anne C. Cotleur, Debra Kellner, Yukio Takeshita, Birgit Obermeier, Thomas J. Kryzer, Yasuteru Sano, Takashi Kanda, Vanda A. Lennon, Richard M. Ransohoff, Jeffrey L. Bennett	4. 巻 9
2. 論文標題 Glucose-regulated protein 78 autoantibody associates with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SciTransl Med	6. 最初と最後の頁 49-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aai9111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fumitaka Shimizu, Yukio Takeshita, Yuka Hamamoto, Hideaki Nishihara, Yasuteru Sano, Masaya Honda, Ryota, Toshihiko Maeda, T. Takahashi, Susumu Fujikawa, Takashi Kanda	4. 巻 6
2. 論文標題 GRP 78 antibodies are associated with clinical phenotype in neuromyelitis optica.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 2079-2087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.50905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fumitaka Shimizu, Mariko Oishi, Setsu Sawai, M. Beppu, Sonoko Misawa, Naoko Matsui, Ai Miyashiro, Toshihiko Maeda, Yukio Takeshita, Hideaki Nishihara, Yasuteru Sano, Ryuji Kaji, Satoshi Kuwabara, Takashi Kanda	4. 巻 90
2. 論文標題 Increased IP-10 production by blood-nerve barrier in multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy and multifocal motor neuropathy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosurg Psychiatry	6. 最初と最後の頁 444-450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2018-319270.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumitaka Shimizu, Yukio Takeshita, Yasuteru Sano, Yuka Hamamoto, H. Shiraishi, T. Sato, S. Yoshimura, Toshihiko Maeda, Susumu Fujikawa, Hideaki Nishihara, H. Kitanosono, A. Tsujino, Masakatsu Motomura, Takashi Kanda	4. 巻 142
2. 論文標題 GRP78 antibodies damage the blood-brain barrier and relate to cerebellar degeneration in Lambert-Eaton myasthenic syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 2253-2264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awz168.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takeshita Y, Fujikawa S, Shimizu F, Maeda T, Sano Y, Koga M, Kanda T.
2. 発表標題 The barrier effect of the components of the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier in vitro.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujikawa S, Takeshita Y, Maeda T, Shimizu F, Sano Y, Kanda T.
2. 発表標題 Construction of the new multi-cultured in vitro blood-brain barrier model under shear forces.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹下幸男, 藤川 晋, 牧野智宏, 星野将人, 花田雄志, 升村 誠, 西原秀昭, 前田敏彦, 清水文崇, 佐野泰照, 古賀道明, 神田 隆
2. 発表標題 再発寛解型多発性硬化症における微小脳血管膜蛋白に対する標的抗原分子の同定法の確立
3. 学会等名 第30回神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshita Y, Fujikawa S, Maeda T, Shimizu F, Sano Y, Kanda T.
2. 発表標題 The new in vitro blood-brain barrier (BBB) model under shear forces with multi-culture of BBB components in multiple sclerosis.
3. 学会等名 34th Congress of ECTRIMS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanda T
2. 発表標題 Destruction and repair of blood-brain barrier in neuroimmunological disorders
3. 学会等名 第41回日本神経科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 神経系のバリアー機能とその分子構造
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 血液脳関門・血液末梢神経関門モデルからの創薬
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshita Y, Fujikawa S, Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Kanda T
2. 発表標題 The effect of blood-brain barrier (BBB)-specific laminins for barrier function with a new in vitro BBB model incorporating multi-culturing system of BBB components.
3. 学会等名 23rd World Congress of Neurology（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 シンポジウム：「神経免疫疾患の病態解明への多面的アプローチ」血液脳関門からのアプローチ
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 血液脳関門の人為的操作：中枢神経疾患の新しい治療へ
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 神経免疫疾患治療の進歩. シンポジウム 1 「自己免疫疾患治療の進歩 平成から令和へ」
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田 隆
2. 発表標題 教育講演: 神経系を侵す自己免疫疾患
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Shimizu, Ryo Ogawa, Kanako Hara, Toshiyuki Takahashi, Yukio Takeshita, Tatsuro Misu, Yasuteru Sano, Toshihiko Maeda, Susumu Fujikawa, Ichiro Nakashima, Kazuo Fujihara, Takashi Kanda
2. 発表標題 Blood-brain barrier-activation in anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated disorders.
3. 学会等名 Sendai Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Shimizu, Ryo Ogawa, Kanako Hara, Toshiyuki Takahashi, Yukio Takeshita, Tatsuro Misu, Yasuteru Sano, Toshihiko Maeda, Susumu Fujikawa, Ichiro Nakashima, Kazuo Fujihara, Takashi Kanda
2. 発表標題 Blood-brain barrier-activation in anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody associated disorders.
3. 学会等名 EctriMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Shimizu, Michiaki Koga, Natsumi Fujii, Ryota Sato, Takuma Sato, Yukio Takeshita, Yasuteru Sano, Toshihiko Maeda, Masaya Honda, Takashi Kanda
2. 発表標題 Blood-nerve barrier disruption induced by immunoglobulin G from Guillain-Barre syndrome patients.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukio Takeshita, Kenichi Serizawa, Susumu Fujikawa, Fumitaka Shimizu, Toshihiko Maeda, Yasuteru Sano, Michiaki Koga, Takashi Kanda
2. 発表標題 The effect of Neuromyelitis Optica (NMO)-IgG and anti-IL-6 receptor monoclonal antibody (SA237;satralizumab) for barrier function at the Blood-Brain Barrier in vitro
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 . 大阪 , 2019年5月22-25日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukio Takeshita, Kenichi Serizawa, Susumu Fujikawa, Fumitaka Shimizu, Toshihiko Maeda, Yasuteru Sano, Michiaki Koga, Takashi Kanda
2. 発表標題 The effect of Neuromyelitis Optica (NMO)-IgG and anti-IL-6 receptor monoclonal antibody (SA237;satralizumab) for barrier function at the Blood-Brain Barrier in vitro
3. 学会等名 EctriMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukio Takeshita, Susumu Fujikawa, Tomohiro Makino, Masato Hoshino, Takeshi Hanada, Makoto Masumura, Hideaki Nishihara, Toshihiko Maeda, Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Michiaki Koga, Takashi Kanda
2. 発表標題 Identification of targeted membrane antigens of human brain microvascular endothelial cells in relapsing-remitting multiple sclerosis .
3. 学会等名 World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹下幸男, 芹澤賢一, 藤川 晋, 清水文崇, 藤澤美和子, 古賀道明, 神田 隆
2. 発表標題 BBB構成細胞による継時的バリア評価モデルの開発とIL-6受容体阻害が視神経脊髄炎のBBB破綻に与える効果検証
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	竹下 幸男 (TAKESHITA Yukio)		
研究協力者	清水 文崇 (SHIMIZU Fumitaka)		