

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08918

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデスにおける自己抗体による直接的血液脳関門破壊機序の解明

研究課題名(英文) Direct Autoantibody-mediated BBB rupture in SLE

研究代表者

有沼 良幸 (Yoshiyuki, Arinuma)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30527437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：SLE特異的自己抗体である抗Sm抗体によるin vitroでの直接的血管内皮細胞株の刺激によりタイトジャンクション構成タンパクであるclaudin-5が減少することが明らかとなった。抗Sm抗体により刺激された血管内皮細胞株の培養上清中の活性MMP-2をザイモグラフィーで測定したところ、活性型MMP-2への変換が促進されていた。特異的MMP-2阻害薬存在下でclaudin-5の減少が回復した。さらに、マイクログリアやMMP-2を抑制するpleiotropic effectを持つカプトプリルもclaudin-5の分解を回復させたことから自己抗体による中枢神経障害に対する効果が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLE特異的自己抗体が直接的に血管内皮細胞に作用し、血液脳関門を破綻させる可能性を明らかとしたことは、SLE患者において中枢神経病変でも自己抗体を中心とした特異的免疫異常を是正することが治療の1つとなり得ることを明示している。さらにカプトプリルのようなマイクログリア抑制や血液脳関門の破綻の阻止に関わる複数の役割を持つ薬剤がSLEにおける中枢神経病変の免疫抑制療法に加え重要なメカニズムに基づく治療薬の1つとなり得る可能性を示唆している。メカニズムに基づく分子としての治療ターゲットの1つが明らかとなったことは今後の病態解明、治療法の確立において非常に意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：We revealed that stimulation of vascular endothelial cell lines in vitro with anti-Sm antibodies, which are autoantibodies specific to systemic lupus erythematosus (SLE), leads to a decrease in claudin-5, a tight junction-consisting protein. Measurement of active MMP-2 in the culture supernatant of stimulated vascular endothelial cell lines with anti-Sm antibodies using zymography showed that the conversion to the active form of MMP-2 was promoted. Under the presence of a specific MMP-2 inhibitor, the decrease in claudin-5 was restored. Additionally, captopril, which has a pleiotropic effect inhibiting microglia and MMP-2, also restored the degradation of claudin-5. These findings suggest potential effects of autoantibodies on central nervous system disorders.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 血液脳関門 自己抗体 NPSLE タイトジャンクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)患者における精神症状の発症にニューロン表面の受容体などのエピトープに対する自己抗体による直接的作用がそのメカニズムの1つであることがマウスの実験を中心に明らかとなっている。同様な抗体はSLE患者においても検出される。これらニューロンと結合する自己抗体はモデルマウスにおいても中枢神経内に特異的に存在しなければ行動異常を起こすフェノタイプは生じない。またSLE患者においても精神症状の発現とニューロンと結合する自己抗体は血液中ではなく脳脊髄液中の抗体価の上昇と有意な関係があることが分かっている。モデルマウスにおいて中枢神経での自己抗体の直接的作用を生じさせるのに薬剤を用いて血液脳関門を破綻させることでフェノタイプが生じる。さらにSLE患者でも精神症状を呈している場合、血液脳関門の透過性が有意に亢進していることが分かっている。疾患特異的自己抗体である抗Sm抗体が精神症状を呈した患者血清での抗体価が血液脳関門の透過性亢進指標と有意に相関していることを我々は報告している。しかしながらこれまでの研究では実験的に血液脳関門の破綻を生じさせることでマウスモデルではフェノタイプを生じさせていたが、実際のSLE患者におけるそのメカニズムについては全く明らかとなっていない。そのため本研究に置いては疾患特異的な分子である自己抗体である抗Sm抗体の関与、特にどのように抗Sm抗体が血液脳関門の破綻をきたすかについては不明である。

2. 研究の目的

SLE特異的自己抗体である抗Sm抗体が持つ血液脳関門破壊抑制効果を実験的に証明し、そのメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。さらに自己抗体によるニューロンの障害後に生じるマイクログリア活性化もマウスモデルにおいてフェノタイプの発症に確実に寄与していることが証明されていることからプレオトロフィック効果のあるカプトプリル(マイクログリアおよびMMP-2活性化抑制)の効果についても検証した。

3. 研究の方法

血管内皮細胞株を培養し、抗Sm抗体で直接的にin vitroで刺激した。血管内皮細胞株としてISOHASおよびHUVECを用いて検討を行った。抗Sm抗体刺激後のこれら細胞のmRNA発現レベルおよびcell lysateを用いてタンパクレベルを測定した。血液脳関門の破壊と関連する分子としてタイトジャンクション構成タンパクであり、分子量依存的な血液脳関門の透過性を規定しているとされるclaudin-5について測定を行った。さらにclaudin-5の分解を促進する分子として知られるMMP-2の培養上清中の活性化型への変換をザイモグラフィーにて調べた。抗Sm抗体はマウス由来のモノクローナル抗体を用い、最初に血管内皮細胞株やHUVECの細胞表面に対する結合を蛍光染色にて確認した。

4. 研究成果

抗Sm抗体はアイソタイプコントロール抗体と比較し、少量ではあるもののこれら血管内皮細胞の表面に結合していた。抗Sm抗体は抗RNP抗体刺激やアイソタイプコントロール抗体刺激と比較しても有意なclaudin-5のmRNAレベルの変化をきたさなかった。一方claudin-5のタンパクレベルは有意に抗Sm抗体刺激でのみ低下していた。従って抗Sm抗体による刺激によりclaudin-5のタンパクレベルでの産生が変化したのではなく分解が促進された可能性が最も考えられた。そのためclaudin-5を分解することが知られているMMP-2について細胞上製中の活性化状態を測定したところ、抗Sm抗体ではコントロール抗体や抗RNP抗体と比較し有意に上昇していた。そのため特異的MMP-2阻害薬存在下で同様の抗Sm抗体による刺激を行ったところ、コントロール抗体と同レベルまでclaudin-5のタンパクレベルが上昇・回復した。このことから抗Sm抗体がMMP-2を介してclaudin-5を分解していることが証明された。

最後にカプトプリルを用いて同様の実験を行ったところ特異的MMP-2阻害薬と同様に抗Sm抗体にて有意に低下したclaudin-5のタンパクレベルがコントロール抗体や抗RNP抗体刺激と同じレベルまで明らかに回復した。

これら結果から臨床データで明らかとなった抗Sm抗体による血液脳関門の透過性亢進が、in vitroの実験においてMMP-2活性化を介して生じていることが証明された。

SLEにおける中枢神経病変に必須と考えられる血液脳関門の破綻が、SLEの根幹的メカニズムの1つである自己抗体の直接的作用により明らかとなったことは、SLEにおける中枢神経病変、特に精神症状の発現が本疾患に特異的である根拠となるものである。

これらメカニズムが明らかとなったことで疾患発症のリスクや治療効果判定におけるサロゲートマーカーとしての抗Sm抗体の役割や、分子標的の1つが明らかとなったことで今後の診断・治療に関するメカニズムに基づいた有用なターゲットを明らかにしたことは最大の成果である。

また中枢神経病変をきたす様々なターゲットに対しマルチに働くカプトプリルの様な薬剤による治療の可能性についても明らかにしたことは今後の難治性病変である SLE の中枢神経病変における新たな治療法の確立につながるものであると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 有沼良幸
2. 発表標題 Anti-Smith Antibody Stimulation to Endothelial Cells Directly Up-regulates MMP-2 Leading to Claudin-5 Degradation
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有沼良幸
2. 発表標題 脳血管内皮細胞におけるMMP-2発現上昇とclaudin-5減少に対する抗Sm抗体の直接作用
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

取り組んでいる研究 https://www.khp.kitasato-u.ac.jp/SKA/kougen/active/initiative.html
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------