

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15711

研究課題名（和文）多発性硬化症患者iPS細胞を用いた血液脳関門破綻候補遺伝子の同定とその臨床応用

研究課題名（英文）iPSCs modeling of blood brain barrier disruption in multiple sclerosis

研究代表者

西原 秀昭（Nishihara, Hideaki）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50780798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：多発性硬化症（multiple sclerosis：MS）では血液脳関門（blood-brain barrier：BBB）の破綻が病態に関与しているが、患者サンプルのアクセスが困難であることで研究が進んでいない。本研究では、iPS細胞を用いて患者由来BBBモデルを作製することで、BBB破綻が直接的にMS病態に関与することを示した。また、MSでのBBB破綻に関わる候補分子を同定し、その機能解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BBB破綻が直接的にMS病態に関わることを示した本研究成果は、これまでの免疫細胞を主体としてきたMSの病態理解とは全く別の、BBB破綻を中心とした病態解明、創薬標的の確立につながる。また、患者のBBBをin vitroに再現できることから、患者由来モデルはBBBを強固にする治療標的のスクリーニングとしての活用が期待される。BBBの破綻はMSのみならず、認知症をはじめとした数多くの神経疾患で共通して観察される現象であることから、その学術的・社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：In multiple sclerosis (MS), the breakdown of the blood-brain barrier (BBB) is implicated in the pathogenesis, but research progress has been hindered by the difficulty in accessing patient samples. This study demonstrated the direct involvement of BBB breakdown in MS pathogenesis by establishing patient-derived BBB models using induced pluripotent stem cells (iPSCs). Additionally, candidate molecules involved in BBB breakdown in MS were identified, and their functional analysis was conducted.

研究分野：臨床神経学

キーワード：多発性硬化症 iPS細胞 血液脳関門

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) の既存研究は動物モデルもしくは患者免疫細胞を用いていた。これらは免疫細胞を標的とした治療を開発してきたが、進行期には効果がないことと感染症の副作用が問題である。近年 MS の疾患感受性遺伝子が内皮細胞に局在していると指摘されており、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) 構成内皮細胞は新規の治療標的を発見する興味深い候補である。ただし、患者 BBB サンプルのアクセスが困難であるために BBB の研究は進んでいない。その結果、MS 患者の剖検脳でみられる BBB 破綻は中枢神経内炎症に伴う二次的な結果であると一般的には考えられている。研究代表者らは近年、iPS 細胞から BBB 構成内皮細胞と平滑筋様細胞 (smooth muscle like cells: SMLC) を分化誘導する手法を独自に開発し、MS 患者由来モデルを作製することで、MS 剖検脳でみられる BBB 異常を *in vitro* に再現でき、病態解明・新規治療法開発に使用できることを示した。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞を用いて独自開発した手法で MS 患者由来 BBB モデルを作製することで、MS 患者での BBB 破綻が直接病態に関与する可能性を検討し、BBB 破綻に着目した治療法開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

日本人 MS 患者由来 iPS 細胞の作製

自施設で診断・治療を行っており、詳細な臨床情報の照合が可能な多発性硬化症 (MS) 患者 (再発寛解型 MS 患者 3 例と二次性進行型 MS 患者 2 例) の末梢血単核球を採取し、erythroblast を分離、拡大培養した後に iPS 細胞を作製した。

BBB 構成内皮細胞の分化誘導

研究代表者が独自に開発した方法で内皮細胞の形態とトランスクリプトーム発現を有するかつ、接着因子の発現に優位性のある BBB 構成内皮細胞に分化誘導した。具体的には、iPS 細胞に Wnt/-catenin シグナルを活性化し、内皮前駆細胞の分化を行い、CD31 陽性細胞をポジティブセレクションにより Magnetic activated cell sorting (MACS) で採取した。内皮前駆細胞は内皮細胞と平滑筋様細胞に共分化するため、プレートへの接着能の差異 (内皮細胞と比べて平滑筋様細胞の接着が強い) を使用して内皮細胞を選択的に継代した。2-3 回の継代でほぼ純粋な内皮細胞と平滑筋様細胞を分離した。

MS 患者での BBB 破綻の病態への関与の検討

分化誘導した MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞の小分子透過能と接着因子の発現を *in vitro* 環境で確認することで、MS での BBB 破綻が直接的に病態進行に関わっている影響について検討した。

BBB 破綻候補分子探索

MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞から RNA を採取し、cDNA ライブラリを作製し、60-100M reads/library のシーケンスを行った。Quality control 後に HiSat2 を用いて Reference genome へのマッピングを行い、FeatureCounts を使用して read をカウントした。DESeq2 を使用して健常人との発現変動遺伝子を解析し、reactome pathway 解析、GO 解析を行った。

小分子を用いた候補 X の阻害と機能解析

健常人由来 BBB 構成内皮細胞に、本研究で同定した候補遺伝子 X の機能を阻害する小分子を作用させた。免疫染色を行い、tight junction である claudin-5 と adherence junction である VE-cadherin の発現を検討した。また、小分子の透過性を検討することで機能変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 日本人 MS 患者由来 BBB モデルの作製と機能解析

日本人 MS 患者 5 例から新たに各複数株の iPS 細胞を樹立した。また、新規に樹立した iPS 細胞を用いて、健常人、日本人 MS 患者ともに、ジグザグ状の VE-cadherin, claudin-5, occludin を細胞間に発現する、初代培養類似の内皮細胞の形態を有する BBB 構成内皮細胞に分化誘導することに成功した。SPMS 患者では剖検例同様に claudin-5 が破綻している像が確認できた (図 1A)。日本人 MS 患者では、再発頻度の低い RRMS 例で小分子の透過性が健常人と比べて差がないのに

比べ、SPMS 例では有意に亢進していた(図 1B) 炎症や神経変性といった他の因子がない *in vitro* の環境で MS 患者由来内皮細胞の機能異常を確認したことは、BBB 破綻が進行した病態の二次的な結果ではなく、直接的に MS 病態に関与することを示唆する。

免疫細胞の浸潤に関わる接着因子に関しては、MS 例では健常人と比べて炎症性サイトカインの刺激下 ICAM-1、VCAM-1 が高発現していた。さらには、SPMS では RRMS に比べて接着因子の発現が高度であった(図 1C)。

少数例での検討ではあるが、MS 患者の BBB 破綻程度が異なる(進行型 MS 例でより強い BBB 破綻が観察される)という結果は、「BBB を破綻させる遺伝的な素因が臨床病型に影響を与える」というこれまでの免疫細胞を主体としてきた病態理解とは全く別の、BBB 破綻を中心とした病態解明、創薬標的の確立につながる。MS での病型決定因子や重症度予測のバイオマーカーを開発することは、MS 治療薬が複数使用可能となった現在の臨床現場で、個別化医療に向けて重要である。今後、臨床病型のことなる MS 患者(benign MS, PPMS, SPMS)から BBB モデルを作製することで、「遺伝的な BBB の脆弱性が MS の病態進行に与える影響」の解析を行うために、国内外の施設と共同研究体制を構築した。

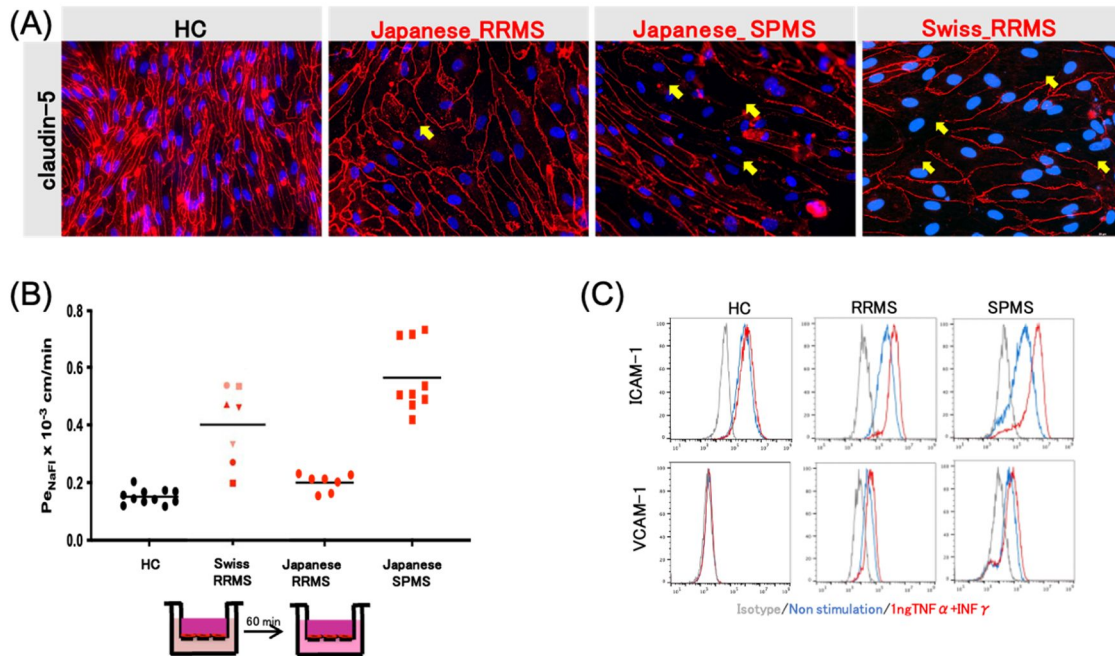


図 1. MS 患者由来 BBB モデルの機能解析

(2) BBB 破綻候補分子の機能解析

MS 患者での BBB 破綻に関与する候補遺伝子を同定するために、患者由来 iPS 細胞から BBB 構成内皮細胞を分化誘導し、トランスクリプトーム解析を行った。健常人に比べ MS では恒常下で 400 以上、炎症性サイトカインの刺激下で約 280 の発現変動遺伝子が存在した。恒常下での発現変動遺伝子を元にした reactome pathway analysis を用いて MS で障害されている pathway を複数同定した。そのうち、遺伝子多型が MS 感受性遺伝子と報告されている候補 X の BBB 構成内皮細胞における機能を解析した。健常人 iPS 細胞由来 BBB モデルに、候補 X に対する阻害剤を作用させると、adherence junction である VE-cadherin の発現は変化させずに、tight junction である claudin-5 を破綻させた(図 2A)。また、阻害剤は小分子である sodium fluorescein (NaFl: 分子量 376Da) の透過性を優位に亢進した(図 2B)。これらの結果は、BBB 構成内皮細胞を人工的に操作することで健常人由来 BBB 構成内皮細胞にも MS 患者でみられる BBB 破綻が再現できることを示している。今後は、候補 X が BBB 機能に与えるより詳細な分子メカニズムとその下位シグナルを同定することで、BBB を強固にするという治療戦略の確立や、一過性に BBB を破綻させる(BBB を開く)ことで中枢神経内に薬物を届ける drug delivery への応用が期待される。

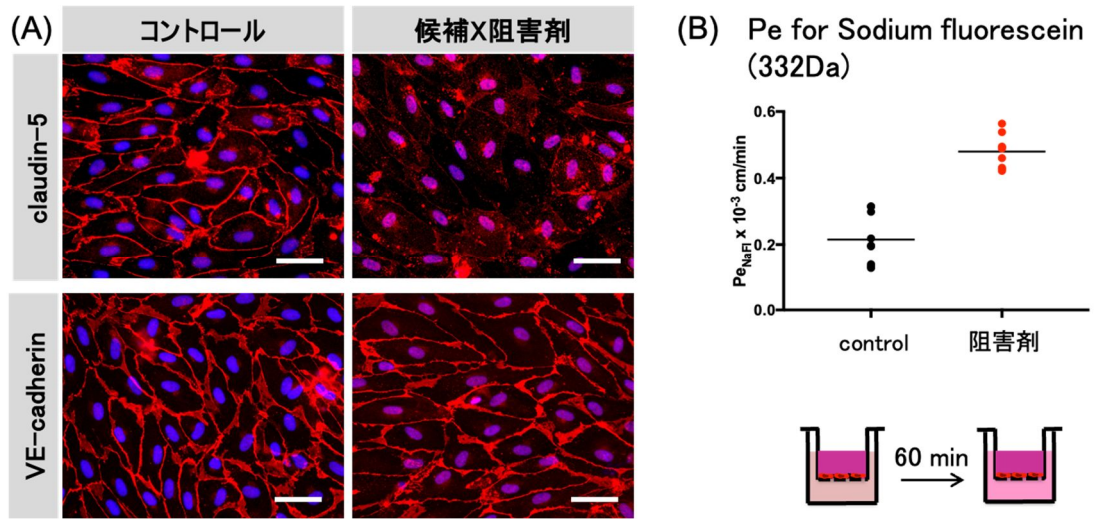


図 2 . BBB 破綻候補分子 X による健康人由来モデルでの MS 様の BBB 破綻の再現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Studle Chiara, Nishihara Hideaki, Wischniewski Sven, Kulsvehagen Laila, Perriot Sylvain, Ishikawa Hiroshi, Schrotten Horst, Frank Stephan, Deigendesch Nikolaus, Du Pasquier Renaud, Schirmer Lucas, Probstel Anne-Katrin, Engelhardt Britta | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 SARS-CoV-2 infects epithelial cells of the blood-cerebrospinal fluid barrier rather than endothelial cells or pericytes of the blood-brain barrier | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS | 6. 最初と最後の頁 76 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12987-023-00479-4 | 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 Matsuo Kinya, Engelhardt Britta, Nishihara Hideaki | 4. 巻 195 |
| 2. 論文標題 Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Brain Microvascular Endothelial Cell-Like Cells with a Mature Immune Phenotype | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/65134 | 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 Lazarevic Ivana, Soldati Sasha, Mapunda Josephine A., Rudolph Henriette, Rosito Maria, de Oliveira Alex Cardoso, Enzmann Gaby, Nishihara Hideaki, Ishikawa Hiroshi, Tenenbaum Tobias, Schrotten Horst, Engelhardt Britta | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 The choroid plexus acts as an immune cell reservoir and brain entry site in experimental autoimmune encephalomyelitis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS | 6. 最初と最後の頁 39 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12987-023-00441-4 | 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 Soldati Sasha, Bar Alexander, Vladymyrov Mykhailo, Glavin Dale, McGrath James L., Gosselet Fabien, Nishihara Hideaki, Goelz Susan, Engelhardt Britta | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 High levels of endothelial ICAM-1 prohibit natalizumab mediated abrogation of CD4+ T cell arrest on the inflamed BBB under flow in vitro | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-023-02797-8 | 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 Matsuo Kinya, Nshihara Hideaki | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Rebuilding insight into the pathophysiology of Alzheimer's disease through new blood-brain barrier models | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Neural Regeneration Research | 6. 最初と最後の頁 1954 ~ 1960 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.390978 | 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 Nemoto Joe, Nishihara Hideaki, Yasuhi Taro, Sato Ryota, Koga Michiaki, Kanda Takashi, Nakamori Masayuki | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with predominant truncal muscle weakness: a retrospective case series | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Neurology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2023.1277337 | 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 McCloskey Molly C., Kasap Pelin, Ahmad S. Danial, Su Shiuan Haur, Chen Kaihua, Mansouri Mehran, Ramesh Natalie, Nishihara Hideaki, Belyaev Yury, Abhyankar Vinay V., Begolo Stefano, Singer Benjamin H., Webb Kevin F., Kurabayashi Katsuo, Flax Jonathan, Waugh Richard E., Engelhardt Britta, McGrath James L. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 The Modular μ SiM: A Mass Produced, Rapidly Assembled, and Reconfigurable Platform for the Study of Barrier Tissue Models In Vitro | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials | 6. 最初と最後の頁 2200804 ~ 2200804 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202200804 | 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 Lyck Ruth, Nishihara Hideaki, Aydin Sidar, Soldati Sasha, Engelhardt Britta | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Modeling Brain Vasculature Immune Interactions In Vitro | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine | 6. 最初と最後の頁 a041185 ~ a041185 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a041185 | 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 Nishihara Hideaki, Perriot Sylvain, Gastfriend Benjamin D, Steinfors Marek, Cibien Celine, Soldati Sasha, Matsuo Kinya, Guimbal Sarah, Mathias Amandine, Palecek Sean P, Shusta Eric V, Pasquier Renaud Du, Engelhardt Britta | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 4334 ~ 4348 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awac019 | 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 Nemoto Joe, Shimizu Fumitaka, Maeda Toshihiko, Nishihara Hideaki, Koga Michiaki, Kanda Takashi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 多巣性運動ニューロパチー8例の臨床的特徴と長期経過 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneuroi.cn-001810 | 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 西原 秀昭、神田 隆 | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 増大特集 神経・精神領域の薬剤ハンドブック 各論 炎症性ニューロパチー治療薬 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 BRAIN and NERVE | 6. 最初と最後の頁 533 ~ 538 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416202373 | 査読の有無 無 |
| 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10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideaki Nishihara, Kinya Matsuo, Satoru Morimoto, Hideyuki Okano |
| 2. 発表標題 Modeling blood-brain barrier dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) |
| 3. 学会等名 CVB2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideaki Nishihara |
| 2. 発表標題 iPS cell-derived Blood-Brain Barrier (BBB) Model: targeting the BBB for diagnosis and treatment |
| 3. 学会等名 Seminar at TKI (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西原 秀昭 |
| 2. 発表標題 日本人多発性硬化症患者には血液脳関門を破綻する遺伝的素因が存在するか？ |
| 3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松尾欣哉, 西原秀昭, David Francisco, Remy Bruggmann, Britta Engerhalt |
| 2. 発表標題 多発性硬化症における血液脳関門破綻に関連する標的分子の機能解析 |
| 3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西原 秀昭, 松尾 欣哉, Maud Bagnoud, Robert Hoepner, Andrew Chan, Fabien Gosselet, Britta Engelhardt |
| 2. 発表標題 多発性硬化症患者では血液脳関門構成内皮細胞が免疫細胞の中枢神経浸潤を促進する |
| 3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideaki Nishihara |
| 2. 発表標題 iPS cell-derived Blood-Brain Barrier (BBB) Model: targeting the BBB for diagnosis and treatment |
| 3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kinya Matsuo, Hideaki Nishihara, David Francisco, Remy Bruggmann, Britta Engerhalt. |
| 2. 発表標題 Functional analysis of potential target molecules related to blood-brain barrier breakdown in multiple sclerosis |
| 3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hideaki Nishihara, Kinya Matsuo, Satoru Morimoto, Hideyuki Okano |
| 2. 発表標題 Modeling blood-brain barrier dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) |
| 3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西原 秀昭 |
| 2. 発表標題 疾患由来血液脳関門モデル 多発性硬化症の病態解明に向けて |
| 3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hideaki Nishihara |
| 2. 発表標題 Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis |
| 3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 西原秀昭, 神田隆 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 中外医学社 | 5. 総ページ数 144 |
| 3. 書名 BBB-単なる障壁ではない 血液脳関門-研究史と新しい研究の展開 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 西原秀昭 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 506 |
| 3. 書名 末梢神経障害 解剖生理から診断, 治療, リハビリテーションまで-単ニューロパチー. | |

〔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 | 松尾 欣哉 (Matsuo Kinya) | 山口大学・臨床神経学・助教 | |

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 | | | |
|---------|----------------------------|------------------------------------|--|--|
| スイス | University of Bern | University of Lausanne | | |
| 米国 | University of Rochester | University of Wisconsin Madison | | |
| ハンガリー | Biological Research Centre | | | |
| ドイツ | University of Muenster | | | |