

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790886

研究課題名(和文) 血液神経関門を標的とした免疫性末梢神経疾患の病態解明と新規治療の開発

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism of the blood-nerve barrier disruption in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and multifocal motor neuropathy

研究代表者

清水 文崇 (SHIMIZU, Fumitaka)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90535254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症性脱髄性根ニューロパチー(CIDP)患者/多巣性運動ニューロパチー(MMN)患者血清をヒト血液神経関門(BNB) in vitroモデル作用させて、BNBの破綻を引き起こす分子メカニズムを解明した。典型的CIDP/MMN患者血清を作用させるとBNB構成内皮でのバリアー機能を反映する電気抵抗値が低下し、tight junction関連蛋白であるclaudin-5蛋白量が低下した。更にMMN患者血清中に含まれるBNB構成内皮に対する自己抗体と血清を作用させることでBNB構成内皮からautocrineに放出されるVEGFがBNB破綻を惹起させる重要な分子であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：<Purpose> The aim of this project was to elucidate the severity and mechanism of breakdown of the blood-nerve barrier (BNB) in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) and multifocal motor neuropathy (MMN). <Methods> We evaluated the effects of sera obtained from patients with typical CIDP/atypical CIDP/MMN and control subjects on the expression of claudin-5 and transendothelial electrical resistance (TEER) value in human peripheral nerve microvascular endothelial cells (PnMECs). <Result> Sera obtained from the patients with typical CIDP/atypical CIDP/MMN decreased the amount of claudin-5 protein levels and TEER values in PnMECs. The autocrine secretion of VEGF in PnMECs induced by MMN sera and immunoglobulin G purified from MMN sera decreased the expression of claudin-5. <Conclusion> Sera from CIDP/MMN patients disrupt the BNB function. In MMN, the autocrine secretion of VEGF in PnMECs and autoantibodies against PnMECs may be responsible for the BNB disruption.

研究分野：神経内科

キーワード：自己免疫性ニューロパチー 血液神経関門 慢性炎症性脱髄性根ニューロパチー 多巣性運動ニューロパチー

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症性脱髄性根神経炎(CIDP)やギランバレー症候群などの免疫性ニューロパチーでは血液神経関門 (Blood-nerve barrier: BNB)の破綻が発症、増悪の鍵となるエピソードである¹⁾。

(1) CIDP は発症様式、臨床症状、病変分布、経過、治療反応性など異なる複数のサブタイプを含んでいる²⁾。2005年のEFNS/PNS合同ガイドラインでCIDPは典型的CIDP (typical CIDP)と非典型的CIDP(multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM), Distal acquired demyelinating symmetric (DADS)など)に大別された³⁾。CIDPにおける臨床病型や脱髄病変の分布を規定しているのは、BNBであるという仮説がある²⁾。神経幹部ではBNBが強固に存在し液性因子の末梢神経内流入を阻止しているが、遠位部神経終末と神経根においてはBNBが生理的に脆弱である。この部位は液性因子がアクセスしやすい環境であり、typical CIDPやDADSではこの部位に脱髄が生じやすい。一方、MADSAMでは、局所性伝導ブロックが多巣性に出現することを特徴とするが、この現象は異常リンパ球のBNBを超えた末梢神経内侵入という細胞性免疫機序で考えると理解しやすい²⁾。

(2) 一方、ガンマグロブリン大量静注療法などの免疫療法が有効であり、CIDPの類縁疾患であると考えられている多巣性運動ニューロパチー (Multifocal motor neuropathy: MMN)でも、BNBの破綻が発症、増悪の鍵となる可能性が推測される⁴⁾。これまでに極めて少数であるが、多巣性運動ニューロパチーでの生検標本や剖検標本を用いた病変部位の病理像が報告されており、血管周囲の脱髄性病変を主体とするが再髄鞘化に乏しく、BNBの破綻を疑う所見を伴うと述べられている⁴⁾。しかし、病変部位の首座である運動神経の生検が困難であるため、末梢神経標本を用いた免疫組織学的検索には限界がありMMNにおけるBNB破綻の分子メカニズムはこれまでに十分な説明が不可能であった。

2. 研究の目的

(1) BNB破綻の相異がCIDPの臨床病型を決定するという仮説を証明するため、今回、我々が樹立したヒトBNB構成内皮細胞に各病型CIDP患者の血清を作用させ、細胞生物学的見地からこの仮説を検討した。

(2) 今回、我々が樹立したヒトBNB構成内皮細胞を用いて、細胞生物学的見地から、MMN血清を作用させることでBNB破綻が生じうるか、さらにBNB破綻を生じる分子メカニズム、を検討した。

3. 研究の方法

我々が樹立したヒト末梢神経神経内膜内微細血管内皮細胞の不死化細胞株(FH-BNB)を用いた。当院、または千葉大学神経内科、徳島大学神経内科で診断加療し、臨床症状、電気生理学的所見より診断確定したCIDP患者25例 (typical CIDP 12例, MADSAM 10例, DADS 3例)、MMN血清13例、ALS血清9例と、正常血清12例をFH-BNBに作用させtight junction関連分子(claudin-5, occludin)の発現の変化をWestern blot法で解析した。バリアー機能の指標となる電気抵抗値とNaF透過性の変化も測定した。更に、MMN血清中に含まれるIgGがBNB破綻に関与するかを検討した。

(倫理面への配慮)血清の採取に当たり、山口大学医学部倫理委員会による承認を得た後研究への協力を文書で説明し同意を得た。個人が特定できないようにサンプルの匿名化に配慮し、プライバシーの保護に万全を尽くした。

4. 研究成果

typical CIDP/MADSAM/DADS血清を作用させるとFH-BNBのclaudin-5の蛋白量が低下し、電気抵抗値が低下しNaF透過性は増加した(図1)。Typical CIDPではMADSAM/DADSと比較してその低下が顕著であった(図1)。さらに、CIDP患者血清を作用させることで認められるBNB *in vitro* モデルのバリアー破綻の程度が、臨床症状の重症度や神経幹部の脱髄所見などのCIDP臨床パラメーターと有意に相関すること

を明らかとした。MMN 血清を作用させると FH-BNB の claudin-5 蛋白量が低下し、電気抵抗値が低下し透過性は増加した(図 1)。さらに、主要な細胞接着因子である VCAM-1 蛋白量も増加した。ALS 血清や正常血清を作用させても claudin-5/VCAM-1 蛋白量や電気抵抗値、透過性に変化はなかった。MMN 血清中に含まれる IgG を用いた培養では、FH-BNB の claudin-5 蛋白量が低下し、電気抵抗値が低下し透過性が増加した。さらに、MMN 血清中に含まれる何らかの液性因子が FH-BNB から放出される autocrine に放出される VEGF を増加させ BNB を破綻させることを明らかとした。

<研究結果から CIDP/MMN での BNB 破綻メカニズムを考察する>

typical CIDP 患者血清は BNB を破綻させるが、MADSAM/DADS 血清では BNB の破綻は認められなかった。typical CIDP では血清に含まれる液性因子により神経幹部の BNB が破綻することで、遠位部神経終末や神経根だけでなく神経全長にわたるびまん性脱髄をきたしうと考えられた。一方、DADS では液性因子により神経幹部の BNB が破綻しないため、BNB が脆弱な遠位部神経終末に病変が限局する可能性が考えられた。さらに、MMN 患者血清中に含まれる何らかの液性因子が、FH-BNB の claudin-5 の発現を低下させ BNB のバリアー機能を破綻させていることが明らかとなった。その破綻メカニズムとして、BNB 構成内皮細胞に反応する未知の自己抗体と血清を作用させることで BNB 構成内皮から autocrine に放出される VEGF の関与が考えられた。今後、CIDP/MMN 血清による BNB 破綻メカニズムを分子レベルで更に解析する予定である。

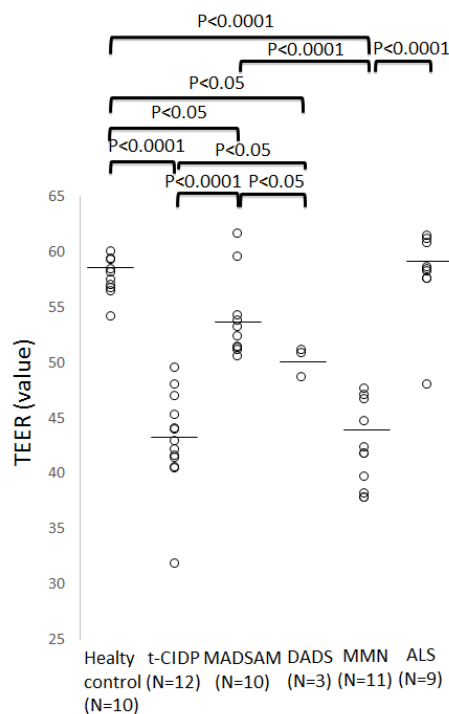


図 1. 患者血清を作用させた後の FH-BNB の電気抵抗値の変化

t-CIDP/MADSAM/DADS/MMN 患者血清を作用させると FH-BNB の電気抵抗値が低下した。t-CIDP/MMN で MADSAM/DADS と比較してその低下が顕著であった。

<引用文献>

- 1) Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004; 75, 765-769.
- 2) Kuwabara S, Misawa S. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Clinical subtypes and their correlation with electrophysiology. Clin Exp Neuroimmunol 2011; 14: 41-48.
- 3) Hughes RA, Bouche P, Cornblath DR, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. Eur J Neurol 2006; 13: 326-32.

- 4) Kaji R, Hirota N, Oka N, et al. Anti-GM1 antibodies and impaired blood-nerve barrier may interfere with remyelination in multifocal motor neuropathy. *Muscle Nerve* 1994; 17: 108-10.

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. [Shimizu F](#), Nishihara H, Sano Y, Takeshita Y, Takahashi S, Maeda T, Takahashi T, Abe M, Koga M, Kanda T. Markedly increased IP-10 production by blood-brain barrier in neuromyelitis optica. *PLoS One* 2015; 10: e0122000. doi: 10.1371/journal.pone.0122000. 査読有り
2. Nishihara H, [Shimizu F](#), Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Kanda T. Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2015; 10: e0121488. doi: 10.1371/journal.pone.0121488. 査読有り
3. [Shimizu F](#), Kanda T. Breakdown of blood-nerve barrier in immune-mediated neuropathy. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2015; 6: 139-148. doi: 10.1111/cen3.12200. 査読有り
4. [Shimizu F](#), Sawai S, Sano Y, Beppu M, Misawa S, Nishihara H, Koga M, Kuwabara S, Kanda T. Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlations with clinical subtypes. *PLOS One*. 2014; 9: e104205. doi: 10.1371/journal.pone.0104205. 査読有り
5. [Shimizu F](#), Tasaki A, Sano Y, Ju M, Nishihara H, Oishi M, Koga M, Kawai M, Kanda T. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. *PLOS One*. 2014; 9: e92872. doi: 10.1371/journal.pone.0092872. 査読有り
6. [Shimizu F](#), Tasaki A, Kanda T. Breakdown of the blood-brain barrier in neuromyelitis optica: Roles of matrix-metalloproteinases-2/9, vascular endothelial growth factor and autoantibodies against the blood-brain barrier. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2014; 5: 2-3 . doi:10.1111/cen3.12099 査読有り
7. Tasaki A, [Shimizu F](#), Sano Y, Fujisawa M, Takahashi T, Haruki H, Abe M, Koga M, Kanda T. Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 419-430. doi:10.1136/jnnp-2013-305907. 査読有り
8. [Shimizu F](#), Omoto M, Sano Y, Mastui N, Miyashiro A, Tasaki A, Maeda T, Koga M, Kaji R, Kanda T. Sera from multifocal motor neuropathy patients disrupt the blood-nerve barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 526-537. doi: 0.1136/jnnp-2013-305405. 査読有り
9. [Shimizu F](#), Sano Y, Tominaga O, Maeda T, Abe MA, Kanda T. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of TGF- β by pericytes and VEGF and MMP-2 by endothelial cells

- in vitro. *Neurobiol aging* 2013; 34: 1902-1912.
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.01.012. 査読有り
10. Saito K, Shimizu F, Koga M, Sano Y, Tasaki A, Abe M, Haruki H, Maeda T, Suzuki S, Kusunoki S, Mizusawa H, Kanda T. Blood-brain barrier destruction determines Fisher/Bickerstaff clinical phenotypes: an in vitro study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 756-765. doi: 10.1136/jnnp-2012-304306. 査読有り
11. Haruki H, Sano Y, Shimizu F, Omoto M, Tasaki A, Oishi M, Koga M, Saito K, Takahashi T, Nakada T, Kanda T. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J Neurol Sci* 2013; 331: 136-144. doi: 10.1016/j.jns.2013.05.035. 査読有り
12. Sano Y, Kashiwamura Y, Abe M, Dieu L, Huwyler J, Shimizu F, Haruki H, Maeda T, Saito K, Tasaki A, Kanda T. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2013; 4: 92-103. doi:10.1111/cen3.12001 . 査読有り
13. Shimizu F, Kanda T. Disruption of the blood-nerve barrier in autoimmune neuropathy. *Peripheral Nerve* 2013; 24: 54-62. doi:なし 査読有り
14. Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, Haruki H, Saito K, Koga M, Kanda T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83(3): 288-297. doi: 10.1136/jnnp-2011-300434 査読有り
15. Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe M, Maeda T, Haruki H, Kanda T. Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res*. 2012; 37: 401-409. doi: 10.1007/s11064-011-0626-8 査読有り
16. Abe M, Sano Y, Maeda T, Shimizu F, Kashiwamura Y, Haruki H, Saito K, Tasaki A, Kawai M, Terasaki T, Kanda T. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines: a new in vitro blood-nerve barrier (BNB) model. *Cell Struct Funct* 2012; 37: 89-100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672995> 査読有り
- 〔学会発表〕(計 11 件)
1. 清水文崇, 本村政勝, 白石 裕一, 佐野泰照, 神田 隆. 傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群では血液脳関門が破綻する. 第 55 回日本神経学会 学術集会総会 . 福岡国際会議場 (福岡県福岡市), 2014 年 5 月 23 日
2. 清水文崇, 田崎彩子, 佐野泰照, 前田敏彦, 大石真莉子, 古賀道明, 神田 隆. 多発性硬化症患者血清が血液脳関門に及ぼす影響の解析. 第 54 回日本神経学会学術集会総会 . 東京国際フォーラム (東京都千代田区), 2013 年 5 月 29 日
3. 清水文崇, 澤井 撰, 佐野泰照, 三澤園子, 前田敏彦, 古賀道明, 桑原 聡, 神田 隆. 血液神経関門の破綻が慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーの臨床病型を決定する. 第 24 回日本末梢神経学会

- 学術集会・朱鷺メッセ（新潟県新潟市），2013年8月23日。
4. 清水文崇，澤井 撰，佐野泰照，三澤園子，前田敏彦，古賀道明，桑原 聡，神田 隆. 血液神経関門の破綻が慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーの臨床病型を決定する. 第25回日本神経免疫学会学術集会・海峡メッセ（山口県下関市）. 2013年11月28日。
 5. 清水文崇，本村政勝，白石 裕一，神田 隆. 傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群では血液脳関門が破綻する. 第25回日本神経免疫学会学術集会・海峡メッセ（山口県下関市）. 2013年11月28日。
 6. Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Naoko Mastui, Ai Miyashiro, Ryuji Kaji, Takashi Kanda. The effect of sera from multifocal motor neuropathy on blood-nerve barrier. San Diego . USA . Neuroscience, 10 Nov 2013.
 7. Fumitaka Shimizu, Ayako Tasaki, Yasuteru Sano, Takashi Kanda. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. ウェスティンホテル京都（Kyoto, Kyoto）PACTRIMS, 1 Nov 2013
 8. 清水文崇，佐野泰照，斎藤和幸，安部真彰，前田敏彦，春木明代，松井尚子，宮城 愛，梶 龍兒，神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清は血液神経関門を破綻させる. 第53回日本神経学会学術集会総会・東京国際フォーラム（東京都千代田区）. 2012年5月23日。
 9. 清水文崇，佐野泰照，古賀道明，前田敏彦，春木明代，松井尚子，宮城 愛，梶 龍兒，神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清による血液神経関門破綻メカニズムの解析. 第23回日本末梢神経学会学術集会・九州大学医学部百年講堂（福岡県福岡市）. 2012年9月1日。
 10. 清水文崇，佐野泰照，古賀道明，前田敏彦，春木明代，松井尚子，宮城 愛，梶 龍兒，神田 隆. 多巣性運動ニューロパチー血清による血液神経関門破綻メカニズムの解析. 第24回日本神経免疫学会学術集会・軽井沢プリンスホテルウエスト（長野県北佐久郡）. 2012年9月21日。
 11. Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Hiroyo Haruki, and Takashi Kanda. The effect of advanced glycation end-products on blood-brain barrier. New Orleans . USA . Neuroscience 13 Oct 2012.
- 〔図書〕(計3件)
1. 清水文崇，神田 隆. 多発性硬化症と視神経脊髄炎- 血液神経関門とその障害モデル-. 日本臨床 2014; 72: 6(1949-54).
 2. Shimizu F, Kanda T. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammation. In Suzumura A, Ikenaka K, editors. Neuron-Glia Interaction in Neuroinflammation. New York, NY: Springer Science+Business Media New York . 2013. 23(157-179).
 3. 清水文崇，神田 隆. 血液脳関門と神経免疫疾患 . Brain and Nerve 2013; 65:12(165-76).
- 〔産業財産権〕
出願状況（計0件）
取得状況（計0件）
- 〔その他〕
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
清水 文崇（SHIMIZU, Fumitaka）
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90535254