

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293203

研究課題名(和文)非細胞性バリアーを含むヒト血液神経関門全容の解明とその人為的操作法の開発

研究課題名(英文)Analysis and manipulation of acellular barrier in human blood-nerve barrier

研究代表者

神田 隆 (KANDA, Takashi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40204797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液神経関門(BNB)を構成する末梢神経微小血管基底膜の主成分はフィブロネクチン、コラーゲンtype IVとラミニン α 5であり、ラミニン α 4を主要成分の1つとする脳微小血管基底膜とは明らかに異なることがはじめて証明された。また、この違いは血液脳関門(BBB)、BNBを構成する細胞の差異による可能性が示された。ギラン・バレー症候群、CIDPをはじめとする末梢神経系の炎症性疾患でのT細胞浸潤は、多発性硬化症などの中枢神経疾患とは別の分子を介することが示唆され、グリア限界膜を持たないBNBでのT細胞浸潤阻止に、内皮細胞/ペリサイトを取り囲む基底膜が機能していることが想定された。

研究成果の概要(英文)：Major basement membrane proteins composing blood-nerve barrier (BNB) were fibronectin, collagen type IV and laminin alpha 5. Differed from those of blood-brain barrier (BBB), laminin alpha 4 was barely detected. The differences of cellular properties constituting BBB and BNB may be responsible for these variations. Our results suggested that in BNB, without glia limitans which functions as acellular barrier for T cell intrusion in the nervous system parenchyma in BBB, the first basement membrane wrapping endothelial cells and pericytes itself functions as "acellular barrier".

研究分野：神経内科学、神経免疫学

キーワード：血液神経関門 内皮細胞 ペリサイト 基底膜 ラミニン 炎症性ニューロパチー

1. 研究開始当初の背景

血液神経関門(blood-nerve barrier, BNB)研究は、分子細胞学的にも機能的・生理学的側面においても BBB 研究に大きく遅れをとっている。研究代表者はウシ馬尾を材料として BNB 由来内皮細胞の分離培養を試み、いくつかの成果を上げてきたが(Kanda et al., *J Neurosci Res* 1999, *Neurology* 2003 他多数)、神経内科学の臨床家としてはヒト難治性末梢神経障害の治療への寄与が最終目的であり、*in vivo*の性質をよく把持したヒト BNB 構成細胞株の樹立は長い間の念願であった。10 年近くにわたる試行錯誤の末、ようやく 2007 年から 2011 年にかけてまずラット、続いてヒトの BNB 由来不死化細胞株がすべて研究代表者の教室で確立し、BNB の分子細胞学的研究が世界に先駆けてスタートした(Abe et al. *Cell Struct Funct* 2012; Shimizu et al. *J Cell Physiol* 2008, 2011; Sano et al., *Cell Struct Funct* 2007)。これらの細胞の解析から、ヒト BNB 構成細胞は BBB 構成細胞と同等の機能を持ち、類似した分子構成を有しているが一部重要な分子が異なっており、BBB での知見をそのまま援用することはできないことが明らかになった。

BBB では最近、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 層構造の間隙に存在する基底膜が、“acellular barrier (Engelhardt et al. *CENI* 2010)”として病的 T 細胞の中樞神経実質内浸潤の制御に関与していることが明らかになっており、とくに、2 枚目の基底膜である glia limitans の意義が重要であることが強調されている。BNB には glia limitans が存在しないため、この“acellular barrier”の機能は 1 枚目の基底膜に負わされているのか、あるいは同機能は BNB には存在しないのかが非常に興味のある問題として浮上していた。BNB での acellular barrier の実態解明は、ギラン・バレー症候群や CIDP 等の末梢神経系自己免疫疾患の治療に直結する問題であり、全く手が付けられていないこの領域への参入、とくに BBB, BNB の不死化細胞を持ちそれを十分に使いこなす技量のある我々の教室からの研究提案は十分に意義のあるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト BNB 構成微小血管の基底膜成分を生化学的、免疫組織化学的に同定し、ここで明らかになった分子を主成分とした基底膜を第 3 の構成成分とした新規 BNB 三次元モデルを作成する。この BNB モデルを用い、ヒト単核球/基底膜の接着阻止実験を行って BNB を越える単核球浸潤に必須のメカニズムを明らかにする、の連続する 3 ステップから構成される。近年 BBB ではその特異な基底膜蛋白構成が非細胞性バリアー-acellular barrier として単核球の中樞神経内侵入制御に関与していることが報告されており、とくにラミニン 4、5 の分布が

T 細胞の神経実質内浸潤阻止に働いているものと考えられている。BNB でも同様のメカニズムが働いていることが想定される。この機構を解明すればギラン・バレー症候群や CIDP 等の末梢神経自己免疫疾患の新たな特異的治療開発に直結する。

3. 研究の方法

(1) ヒト生検末梢神経材料、剖検末梢神経材料を用いて免疫組織化学を行い、神経内膜内微小血管基底膜に発現する分子を明らかにする。生検材料は文書による同意を得た生検腓腹神経 10 例の新鮮凍結標本で、炎症性・自己免疫性ニューロパチーが診断として考えられるものは除く。剖検材料は文書による同意を得た ALS 症例の坐骨神経凍結標本を用いた。免疫組織化学は研究代表者が確立した手技(Kanda et al. *JNNP* 75: 765-769, 2004)に基づいて施行した。対照として、剖検 ALS 症例(末梢神経検索例と同一の症例)脳組織を用い、BBB 構成基底膜での染色性との対比を行った。検索の候補分子はフィブロネクチン、コラーゲン type IV、ラミニン 1-12 で、アイソフォーム 4、5 を有するラミニン 8, 9, 10, 11 を中心に解析を進めた。免疫組織化学の結果は蛍光染色および DAB 染色の双方で確認した。

(2) ヒト BBB 由来不死化細胞(内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト)を用いた BBB *in vitro* model、およびヒト BNB 由来不死化細胞(内皮細胞、ペリサイト)を用いた BNB *in vitro* model を作成した。BBB モデルはポリカーボネート膜の上面にヒト BBB 由来内皮細胞、下面にヒト BBB 由来ペリサイトを単層培養し、ウエル底面にヒトアストロサイトを単層培養した従来モデルを用いた。BNB モデルとしてポリカーボネート膜の上面にヒト BNB 由来内皮細胞、下面にヒト BNB 由来ペリサイトを単層培養したものを作成した。BBB、BNB 両モデルが産生する基底膜成分を、それぞれ生化学的に解析した。

(3) ラミニン 5 をポリカーボネート膜に塗布し、下面にヒト末梢神経由来ペリサイト、上面に末梢神経由来内皮細胞をそれぞれ単層培養した。

4. 研究成果

(1) 脳微小血管基底膜の主成分はフィブロネクチン、コラーゲン type IV、およびラミニン 4、ラミニン 5 であることを複数の剖検脳検体から確認した。一方、末梢神経微小血管基底膜の主成分はフィブロネクチン、コラーゲン type IV とラミニン 5 であり、ラミニン 4 はほとんど検出されなかった。ラミニン 1、2、1 も脳微小血管基底膜と同等に検出された。この分子構成は、剖検 ALS 末梢神経で最初に明らかにできたが、糖尿病性ニューロパチーをはじめとする各種代謝性ニューロパチーや遺伝性ニューロパチーでも同等であり、ヒト BNB 固有の属性であ

ることがはじめて証明された(論文投稿中、Takeshita Y et al. *Clinical and Experimental neuroimmunology* 2016)。

(2) BBB モデルが産生するラミニンアイソフォームは 4、5 がほぼ等量であるのに対し、BNB モデルでは 4 の発現がほとんど確認されなかった。

(3) ラミニン 5 とヒト BNB 由来内皮細胞、ペリサイトから成る新規 BNB モデルが完成した。

考察：末梢神経微小血管を構成する基底膜成分が中枢神経のそれと分子構成が異なることが初めて証明され、これは BBB、BNB を構成する細胞の差異による可能性が示された。ギラン・バレー症候群、CIDP をはじめとする末梢神経系の炎症性疾患での T 細胞浸潤は、多発性硬化症などの中枢神経疾患とは別の分子を介することが示唆される結果であった。BBB では 1 枚目の基底膜にラミニン 4 が豊富に発現しており、ラミニン 4 を介して T 細胞が容易に基底膜を通過するが、2 枚目の基底膜であるグリア限界膜にはラミニン 4 が無いため、T 細胞は MMP-9 などのプロテアーゼ活性を獲得しない限り中枢神経内へは浸潤できない。本研究によって BNB 構成基底膜はラミニン 4 が発現していないことが明らかになり、グリア限界膜を持たない BNB での T 細胞浸潤阻止に、内皮細胞/ペリサイトを取り囲む 1 枚目の基底膜が“acellular barrier”として機能していることが想定された。本研究目的の第 3 ステップである、ヒト単核球/基底膜の接着阻止実験には 3 年間で到達できなかったが、新たな BNB in vitro model の開発に成功しており(特許出願中、2016-081996)このモデルを用いて本研究成果は大きく花開く可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Fumitaka Shimizu, Hideaki Nishihara, Yasuteru Sano, Yukio Takeshita, Shiori Takahashi, Toshihiko Maeda, Toshiyuki Takahashi, Masaaki Abe, Michiaki Koga, Takashi Kanda, Markedly increased IP-10 production by blood-brain barrier in neuromyelitis optica. *PLoS One* (査読有) 10: 2015, e0122000.

DOI:10.1371/journal.pone.0122000
Hideaki Nishihara, Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Yukio Takeshita, Toshihiko Maeda, Masaaki Abe, Michiaki Koga, Takashi Kanda, Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One* (査読有) 10: 2015, e0121488

DOI: 10.1371/journal.pone.0121488
Fumitaka Shimizu, Setsu Sawai,

Yasuteru Sano, Minako Beppu, Sonoko Misawa, Hideaki Nishihara, Michiaki Koga, Satoshi Kuwabara, Takashi Kanda, Severity and patterns of blood-nerve barrier breakdown in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: correlation with clinical subtypes. *PLoS One* (査読有) 9, 2014, e104205

DOI:10.1371/journal.pone.0104205

T Furukawa, Noriko Matsui, K Fujita, Hiroyuki Nodera, Yuishin Izumi, Fumitaka Shimizu, K Miyamoto, Y Takahashi, Takashi Kanda, Susumu Kusunoki, Ryuji Kaji, Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. *J Neurol Sci* (査読有) 346, 2014, 75-79.

DOI:10.1016/j.jns.2014.07.059

Fumitaka Shimizu, Masatoshi Omoto, Yasuteru Sano, Naoko Matsui, Ai Miyashiro, Ayako Tasaki, Toshihiko Maeda, Michiaki Koga, Ryuji Kaji, Takashi Kanda, Sera from patients with multifocal motor neuropathy disrupt the blood-nerve barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (査読有) 85, 2013, 526-537.

DOI:org/10.1136/jnnp-2013-305668

前田敏彦、神田 隆、免疫性神経疾患の病態と BBB および BNB. *日本臨床* (査読無) 71, 2013, 789-794.

DOI:なし

〔学会発表〕(計 11 件)

尾本雅俊、神田 隆、糖尿病性末梢神経障害の BNB を構成する非細胞性バリアーの組織学的検討 .第 57 回日本神経学会学術集会、2016 年 5 月 18-21 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

神田 隆、パネルディスカッション：免疫介在性ニューロパチーにおける blood-nerve barrier の変化 .第 26 回日本末梢神経学会学術集会、2015 年 9 月 18-19 日、ホテルブエナビスタ(長野県松本市)

Takashi Kanda, Symposium: Cellular properties of pericytes in human blood-brain barrier and blood-nerve barrier .第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28-31 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

尾本雅俊、神田 隆、BNB を構成する非細胞性バリアーの組織学的検討 .第 56 回日本神経学会学術集会、2015 年 5 月 20-30 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Takashi Kanda, Immune-mediated disruption of neuro-vascular units in neuroimmunological disorders. 2014 年 9 月 13 日、第 37 回日本神経科学大会、

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
神田 隆、血液神経関門の破綻と末梢神経障害 . 第 25 回日本末梢神経学会、2014 年 8 月 29 日、ホテルルビノ京都堀川（京都府京都市）

清水文崇、澤井 撰、佐野泰照、別府美奈子、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、2013 年 11 月 27-29 日、海峡メッセ（山口県下関市）
Yasuteru Sano, Masaaki Abe, Fumitaka Shimizu, Toshihiko Maeda, Yoko Kashiwamura, Masatoshi Omoto, Motoharu Kawai, Takashi Kanda, Novel human immortalized cell lines for the BBB/BNB research. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会、2013 年 11 月 27-29 日、海峡メッセ（山口県下関市）

Fumitaka Shimizu, Yasuteru Sano, Naoko Matsui, Ai Miyashiro, Ryuji Kaji, Takashi Kanda, The effect of sera from multifocal motor neuropathy on blood-nerve barrier. Neuroscience 2013, 2013 年 11 月 9-13 日、San Diego Convention Center（アメリカ合衆国サンディエゴ市）

清水文崇、澤井 撰、佐野泰照、別府美奈子、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、2013 年 8 月 23-24 日、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

神田 隆、特別シンポジウム「糖尿病神経障害の進化と展望」: ヒト糖尿病性末梢神経障害の病理と血液神経関門の意義 . 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、2013 年 5 月 16-18 日、ホテル日航熊本（熊本県熊本市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：血液神経関門インヴィトロモデルおよびその作成方法

発明者：竹下幸男、神田 隆

権利者：国立大学法人山口大学

種類：方法の発明

番号：2016-081996

出願年月日：平成 28 年 4 月 15 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

神田 隆 (KANDA, Takashi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：4 0 2 0 4 7 9 7

(2) 連携研究者

寺崎 哲也 (TERASAKI, Tetsuya)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：6 0 1 5 5 4 6 3