

Analysis of the mechanism of blood-brain barrier
dysfunction induced by sera from patients with
Neuromyelitis optica

(視神経脊髄炎患者血清による
血液脳関門破綻メカニズムの解析)

氏名 田崎 彩子

所属 山口大学大学院医学系研究科

システム統御医学系専攻 神経内科学分野

平成28年9月

目次

1.	要旨	1
2.	研究の背景	1
3.	目的	2
4.	方法	3
5.	結果	6
6.	考察	17
7.	結語	19
8.	謝辞	20
9.	参考文献	20

1. 要旨

【背景・目的】 Neuromyelitis optica spectrum disorder(NMOSD)では血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB)の破綻が発症に関与すると考えられている。今回、我々はNMOSD患者血清を用いて、BBBの破綻に関与している可能性のある分子メカニズムを研究した。

【方法】 claudin-5, matrix-metallo proteinases (MMPs)-2/9, vascular cell adhesion protein-1(VCAM-1)の発現について、抗aquaporin 4(AQP4)抗体陽性を確認した。NMOSD患者血清と、多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)患者血清、健常成人血清を用いて、BBB構成ヒト血管内皮細胞不死化細胞株(human brain microvascular endothelial cells, BMECs)に対する効果を検討した。また、NMOSD患者血清から精製したimmunoglobulin G (IgG)の、claudin-5やVCAM-1蛋白の発現への影響の有無についても解析した。

【結果】 NMOSD患者血清曝露後に生じたBMECsにおけるBBBの破綻はMMP阻害剤であるGM6001を加えることで改善された。BMECsにおけるMMP-2/9の発現はNMOSD患者血清を作用させたもので特に上昇していた。NMOSD患者血清ではMMP-2/9血中濃度が上昇しており、BMECsにおけるVCAM-1蛋白の上昇がみられた。NMOSD患者血清から精製したIgGではBBBの透過性やMMP-2/9の蛋白量への影響は見られなかったが、BMECsにおけるVCAM-1蛋白量が上昇していた。抗AQP4抗体価の低下はVCAM-1発現の低下に関与していなかった。

【考察】 NMOSD患者血清中に存在するIgG以外のなんらかの液性因子が、BMECsからautocrineに放出されるMMP-2/9を増加させ、BBB透過性を上昇させる一因となっていると考えられた。NMOSD患者血清から精製したIgGは、抗AQP4抗体以外のものがBBBに作用し、VCAMの発現を上昇させることで中枢神経系への炎症細胞の侵入を惹起していると考えた。

2. 研究の背景

NMOSDは1894年のDevicらの報告に端を発した視神経と脊髄長大病変の出現を特徴とする中枢神経系の重篤な炎症性疾患であり、当初はアジア人種に多い多発性硬化症の亜型と考えられてきた。しかしながら、病理学的には灰白質病変が多く、壊死性変化が多発性硬化症より強く、また血清学的には抗SS-A抗体・抗SS-B抗体や抗核抗体が陽性となることが多発性硬化症と比較して多く、

多発性硬化症との臨床的異同が繰り返し論じられてきた。2004年にこの疾患で感度特異度の高い自己抗体であるNMOSD-IgGが発見され、2005年にNMOSD-IgGの対応抗原がアストロサイトの足突起に多く分布するAquaporin 4 (AQP4)であることが解明され²⁾、NMOSDは多発性硬化症とは異なり、Aquaporin 4に対する自己抗体が関与する疾患として認知されるようになった¹⁾。

いくつかの*in vitro*や*in vivo*での研究により、この抗体が病態に関与しており、NMOSDの発症に重要な役割を担っていると考えられてきた³⁻¹⁰⁾。しかしながら、血清中の抗AQP4抗体価臨床的再発に必ずしも相関が無く、血清中の抗AQP4抗体のみでは臨床的再発を惹起するには不十分であり、炎症性サイトカイン等のその他の因子の修飾が必要である可能性が示唆されている¹¹⁻¹³⁾。

病理学的にNMOSDでの炎症の首座は、BBBの存在する血管周囲を中心に認められる⁵⁾。患者血中の抗AQP4抗体がアストロサイトの足突起に発現しているAQP4に結合するためには、tight junctionで構成されるBBBを透過し、中枢神経内に侵入しなければならない。この抗体を正常マウスあるいはラットに静脈内もしくは腹腔内投与をしてもNMOSDが惹起できないことが報告されている^{9,10)}。この現象を説明する理由の一つとして、正常な状態では血中の抗AQP4抗体の中枢神経側への侵入をBBBが阻害している可能性が推測されている。過去の研究では、NMOSDの患者血清がBBBを破綻させ、抗AQP4抗体やサイトカインの中枢神経側への流入を促しNMOSDの発症に関与していることが示唆されている^{14,15)}、NMOSD患者におけるBBBの破綻の背景となる分子メカニズムは解明されていない。

3.目的

これまでの研究で、MS患者や健常人と比較して、NMOSD患者では血清中や脳脊髄液中のMMP-9の濃度が優位に上昇しており、この疾患の臨床所見や画像所見の重症度と関連していることが報告されている^{16,17)}。また、Matrix-metalloproteinases (MMPs)-2/9によるBBBの破綻がMS¹⁸⁾や実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)¹⁹⁾を含む中枢神経系の炎症性疾患の発症に重要であることが示唆されている。

今回我々は、MMP-2/9がNMOSD患者におけるBBBの破綻を惹起する分子と仮定し、NMOSD患者血清における、特にMMP-2/9のような液性因子のBBB機能への影響を検討した。

4.方法

(1)対象

本研究はサマセットウェストで1996年に改正されたヘルシンキ宣言に基づき、山口大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。

我々は、当院に入院していたNMO spectrum disorders (NMOSD)の患者10名(すべて女性、平均年齢52歳)から急性期に血清を採取した。抗AQP4抗体分析は前出の報告に記した方法⁶⁾で行い、いずれの患者も抗AQP4抗体が陽性であることを確認し、NMOSDの臨床診断基準を満たしていた^{20,21)}。そのうち7名は視神経病変・脊髄長大病変の両者を伴うtypical NMOSD(患者番号1,2,4,6,7,9,10)であり、3名は脊髄長大病変のみのNMOSD(患者番号3,5,8)であった。全例で急性期血清を用い、血液検体は初発症状出現から25日以内に採取した。(症状出現から血清採取まで平均13.2日間(SD=5.4)であった)。検体採取時には、急性期10名のうち1名はメチルプレドニゾロンパルスで加療されていたが、副腎皮質ステロイドやアザチオプリン等の免疫抑制剤は使用していなかった。また、最低6ヶ月間急性増悪のない寛解期のNMOSD(患者番号5, 8,9,10) 4例から血清を採取した。10名のNMOSD患者のうち7名(患者番号2, 4,5,6,8,9,10)は脳血管内皮細胞(BMEC)に対する自己抗体が陽性であり、3名(患者番号1, 3,7)は陰性であった(Fig. 1)¹⁵⁾。

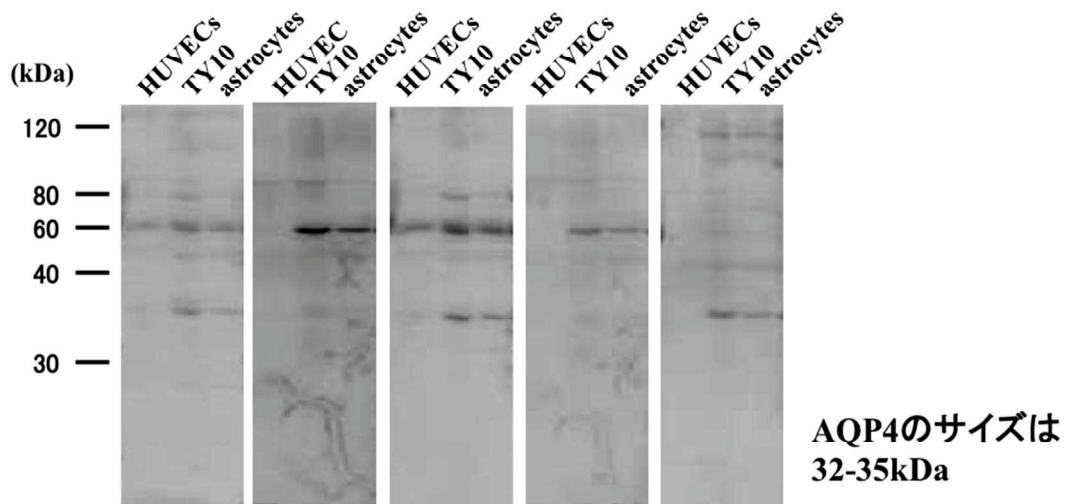


Figure 1 ¹⁵⁾より引用

BMECsとastrocytesより抽出した蛋白をウェスタンブロット法を用いNMOSD患者血清を反応させると、10/14例(71%)に抗AQP4抗体以外のTY10とアストロサイトに反応する自己抗体が検出されたが、正常血清では検出されなかった。本研究でも7/10(70%)にBMECsに対する自己抗

体が検出された。

また、対照群として、改訂版McDonald診断基準²²⁾を満たす急性期の古典的多発性硬化症(multiple sclerosis, MS)患者10名(男性4名, 女性6名, 平均年齢35.7歳)と10名の健常人から血清を採取した。MS患者の血清は、初発症状出現から28日以内の急性期に、6名(患者番号2,3,4,8,9,10)は高用量メチルプレドニゾロン静注療法前に、4名(患者番号1,5,6,7)は同療法後に血液検体を採取した。10名のMS患者のうち6名と10名の健常人のうち1名は抗BMECs抗体が陽性であった。

すべての検体は解析までの間、冷凍解凍を繰り返すのを避けるため、採取後直ちに-80°Cで保存した。全ての検体は解析前に56°C30分間の加温で血清に含まれる補体を不活化させた。

(2)方法

我々はヒトアストロサイト細胞株 (human astrocyte; hAST)に温度感受性ラージT抗原をレトロウイルスを用いて導入し、条件的不死化細胞株(hAST株)とした。その後、ヒトAQP4のcDNAをレトロウイルスを用いてhAST株に導入し、AQP4導入hAST株(hAST-AQP4)と名付けたアストロサイトを作成し²⁴⁾、本研究に用いた。また、温度感受性ラージT抗原をレトロウイルスを用いて導入し、条件的不死化細胞株としたヒト血液脳関門構成血管内皮細胞であるTY08²³⁾と、ヒト血液神経関門構成血管内皮細胞であるFH-BNBs²⁵⁾を用いた。

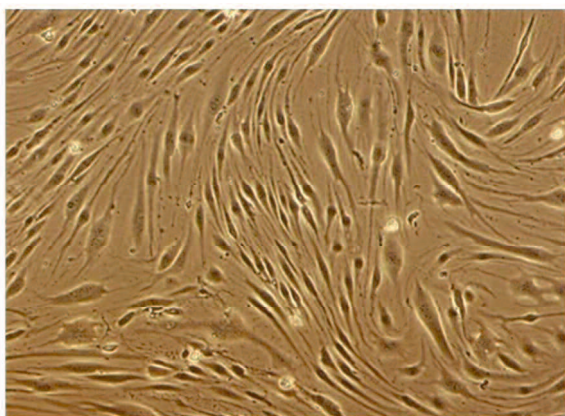


Figure 2 ¹⁵⁾より引用

条件的不死化細胞株とした血液
脳関門構成ヒト血管内皮細胞

細胞培養は患者もしくは健常人の10%血清, 10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS)を含む新鮮培養液を用い、37°C5% CO₂/airの環境を維持した。細胞は1日間培養した後mRNAを抽出し、電気抵抗値を測定した。蛋白は2日後に抽出した。

培養液は抗生物質と10%FBS(Sigma)を含むダルベッコ変法イーグル培地

(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Sigma, St Louis, Missouri, USA)を使用した²³⁾。ポリクローナル抗MMP-9抗体(ラビット), 抗MMP-2抗体(ラビット), 抗actin抗体(マウス), 抗血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(ゴート)はSanta Cruz(Santa Cruz, California, USA)から購入した。ポリクローナル抗claudin-5抗体(ラビット)はInvitrogen(Carlsbad, California, USA), ポリクローナル抗vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)抗体(マウス)はR&D systems(Minneapolis, Minnesota, USA)のものを使用した。GM6001はChemicon(Temecula, California, USA)から, MMP-2とMMP-9の阻害剤はSanta Cruzから購入した。

リアルタイムRT-PCRのため, PBS洗浄した細胞からtotal RNAを採取し, 40ngのtotal RNAから1本鎖cDNAを作成した。MMP-2, MMP-9, G3PDHのヒトプライマーのシーケンスは以前の報告に示されているものを使用した²⁶⁾。

Stratagene Mx3005P (STRATAGENE, Cedar Creek, Texas, USA)を用いて定量的リアルタイムPCR分析を行った, 各分子の相対量を以前報告されているソフトウェアプログラムを用い $R_v=R_{Gene}/R_{GAPDH}$ に基づいて算出した。

蛋白試料(10-20 μ g)は以前報告されている通り²³⁾, 10%ゲルで分離させpolyvinylidene difluoride膜(Amersham, Chalfont, UK)上に電気泳動させた。PBS-Tと5%ミルクに溶解させた一次抗体(100倍希釈)で膜を2時間処理し, その後二次抗体(2000倍希釈)で1時間インキュベーションを行った。バンドは化学発光キット(ECL-prime, Amersham, UK)を用いて可視化し, 相対的濃度はQuantity One software program (Bio-Rad, Hercules, California, USA)を用いて測定した。

以前の報告と同様に²³⁾, Millicell electrical resistance apparatus (Endohm-6 and EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA)を用いて細胞層の電気抵抗値を測定した。BMECsをコラーゲンコートした培養カップに 1×10^6 個ずつ蒔き, 新鮮培養液(患者もしくは健常人の10%血清を含む条件培地)で24時間培養した。

コンフルエントとなったBMECs単層を通過する細胞間の透過量を測定するため, 以前報告されている方法でNaFを用いた透過性実験を行った²⁷⁾。24穴培養プレートにコンフルエントとなった細胞シートを用意し, NaF(10 μ g/ml; 分子量400kDa)を含む500 μ lの条件培地を各穴の上段に加えた。インキュベーション後下段の溶液を採取し, 細胞シートを通過したNaF量をMX3000P (Stratagene)を用いて測定し, 細胞シートのない状態での下段溶液中のNaF量との相対比を

算出した。

MMP-2やMMP-9を阻害するため、GM6001, MMP-2阻害剤, MMP-9阻害剤を用いた。25 μ MのGM6001, 5 μ MのMMP-2阻害剤もしくは5 μ MのMMP-9阻害剤とともに患者血清を12h, 37°Cでプレインキュベートした。細胞はNMOSD患者やMS患者もしくは、健常人の血清を含む条件培地で培養し、全てにMMP阻害剤を添加した。

56°Cでのインキュベーション前に、MMP-2とMMP-9の濃度をELISA法(R&D systems)で測定した。試料はプロトコールに沿って行い、3回測定した。

5名の抗BMEC抗体陽性患者と健常人5名の血清からimmunoglobulin G (IgG)を精製するため、Melon Gel IgG Spine Purification Kit (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA)を用いた親和クロマトグラフィーを行った。対照群としてFBS(Sigma), 健常群として正常血清, 疾患群としてNMOSD患者血清からそれぞれ精製したIgG(最終濃度400 μ g/mL)を含む培養液で細胞培養を行った。

抗AQP4抗体の吸着方法は以前報告されている通りである¹⁵⁾。2名の異なるNMOSD患者(NMOSD1とNMOSD2)から得た血清をhAST-AQP4細胞に150分間添加した。両者で抗AQP4抗体価は150分間のインキュベーション後50%以上減少していた(NMOSD1では吸着前1:8であり, 150分間吸着後1:4であった。NMOSD2では吸着前は1:2048, 150分間吸着後1:512だった。)¹⁵⁾。

(3)解析

平均値を標準誤差と共に報告した。統計学的解析(対応のない両側Studentのt検定)は信頼度 $p < 0.05$ として行った。

5.結果

視神経脊髄炎関連疾患(Neuromyelitis Optica spectrum disease, NMOSD)患者血清が脳微小血管内皮細胞のバリアー機能を低下させる

Figure 3に名のtypical NMOSDと脊髄長大病変のみの3名の患者を含むNMOSD患者血清をBBB構成血管内皮細胞に作用させて、BBBの主要な機能、蛋白が変化するかをウェスタンブロット法を用いて示した。NMOSD患者血清を作用させるとBMECsのclaudin-5蛋白量が有意に減少していたが、MS患者血清や健常人血清では蛋白量の変化はなかった(figure3A-D)。一方、NMOSD患者血清やMS患者血清を作用させるとBMECsでのVCAM-1量が有意に上昇したが、健常成人血清を作用させてもBMECsのVCAM-1蛋白量の変化はなかった。NMOSD患者

血清を作用させるとBMECsの電気抵抗値は低下し、NaFの透過性は上昇したが、MS患者血清や健常人血清を作用させても同様の影響はみられなかった(figure 3H,I). 血清作用後のBBB破綻の程度はtypical NMOSD群と脊髄長大病変のみのNMOSD群間で有意な差はなかった(figure 3F,G).

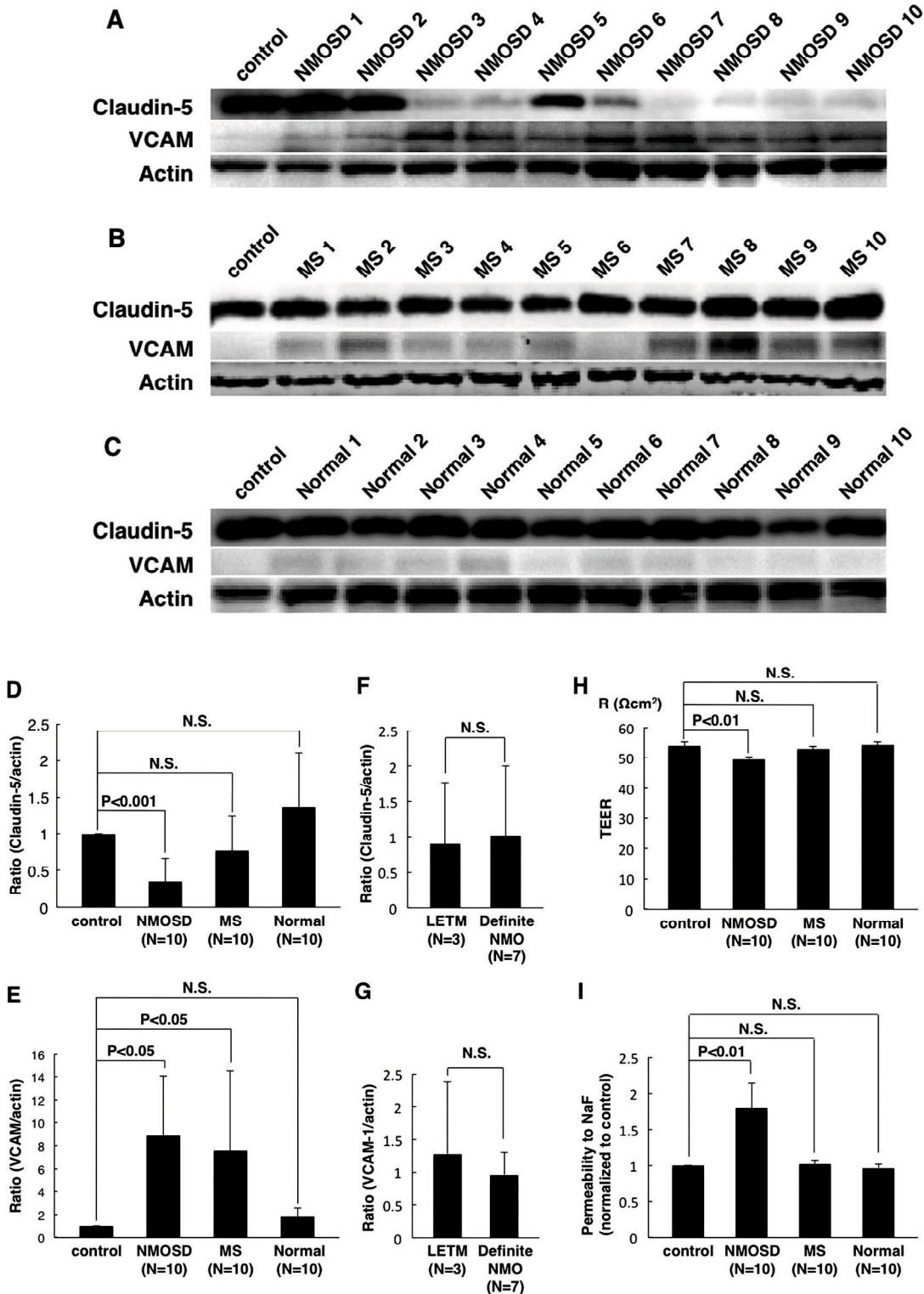


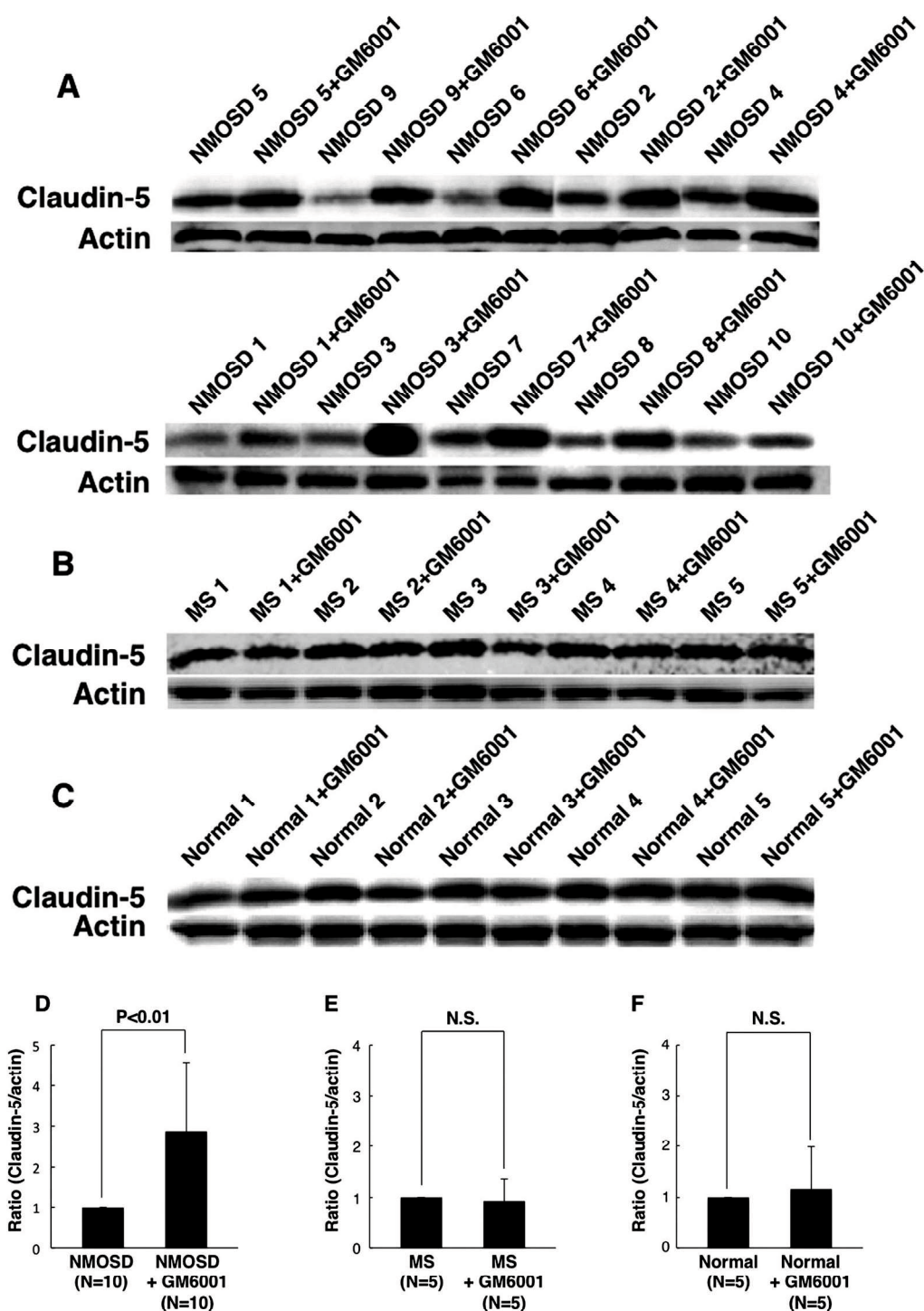
Figure 3

血清はtypical NMOSD7名(患者番号1,2,4,6,7,9,10)とLETMのみのNMOSD3名(患者番号3,5,8)から採取した。NMOSD患者、MS患者健常人から採取した血清を作用させた後のBMECsにおけるclaudin-5とVCAM-1タンパク量の変化をウェスタンブロット法で確認した(A-C)。棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=10)。BMECsにNMOSD患者血清を作用させるとclaudin-5蛋白量は有意に減少し、MS患者血清や健常人血清では変化はなかった。BMECsで発着するVCAM-1蛋白量はNMOSD患者血清やMS患者血清を作用させると有意に増加したが、健常人血清を作用させても変化はみられなかった(D,E)。患者血清作用後のBMECsのclaudin-5やVCAM-1蛋白量は、definite NMO群と脊髄長大病変群間で有意差はなかった(F,G)。NMOSD患者血清を作用させるとBMECsの電気抵抗値は有意に低下し、BMECsのNaF透過性は有意に上昇した。一方で、MS患者血清や健常人血清を作用させても電気抵抗値やNaF透過性に変化はみられなかった(H,I)。control: 20%FBSを含むDMEM, NMOSD: 10%FBSを含むDMEMでNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, MS: 10%FBSを含むDMEMでMS患者血清を10%に希釈した条件培地, normal: 10%FBSを含むDMEMで健常人血清を10%に希釈した条件培地, LETM: 10%FBSを含むDMEMで脊髄長大病変のみのNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, typical NMOSD: 10%FBSを含むDMEMでtypical NMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地

MMP-2/9阻害剤はNMOSD患者血清での脳微小血管内皮細胞のバリアー破綻を減少させる

Figure4にNMOSD患者血清によるBBB破綻へのMMP-2/9の関与を示した。NMOSD患者血清と併せてMMP広域阻害薬であるGM6001を作用させたBMECsでは、NMOSD患者血清中の抗BMECs抗体の有無に関わらず、GM6001で前処置を行っていない細胞と比較してclaudin-5蛋白量が有意に増加していた(figure 4A,D)。しかしながら、MS患者血清や健常人血清を作用させた群ではGM6001の処置の有無に関わらず、claudin-5蛋白量に変化はみられなかった(figure 4B,C,E,F)。更に、GM6001で前処置をしていない群と比較して、NMOSD患者血清とGM6001を併せて作用させた群では、BMECsの電気抵抗値は有意に高くなり、NaF透過性は有意に低下していた(figure 4G,H)。MS患者血清や健常人血清では、GM6001処理の有無に関わらず電気抵抗値やNaF透過性は変化がなかった(figure 4G,H)。BMECsのclaudin-5蛋白量や電気抵抗値の低下は、選択的MMP-2

阻害薬, 選択的MMP-9阻害薬の追加で改善されたが, 選択的MMP-2阻害薬と選択的MMP-9阻害薬の間ではBBB破綻の修復の程度に有意差はみられなかった.



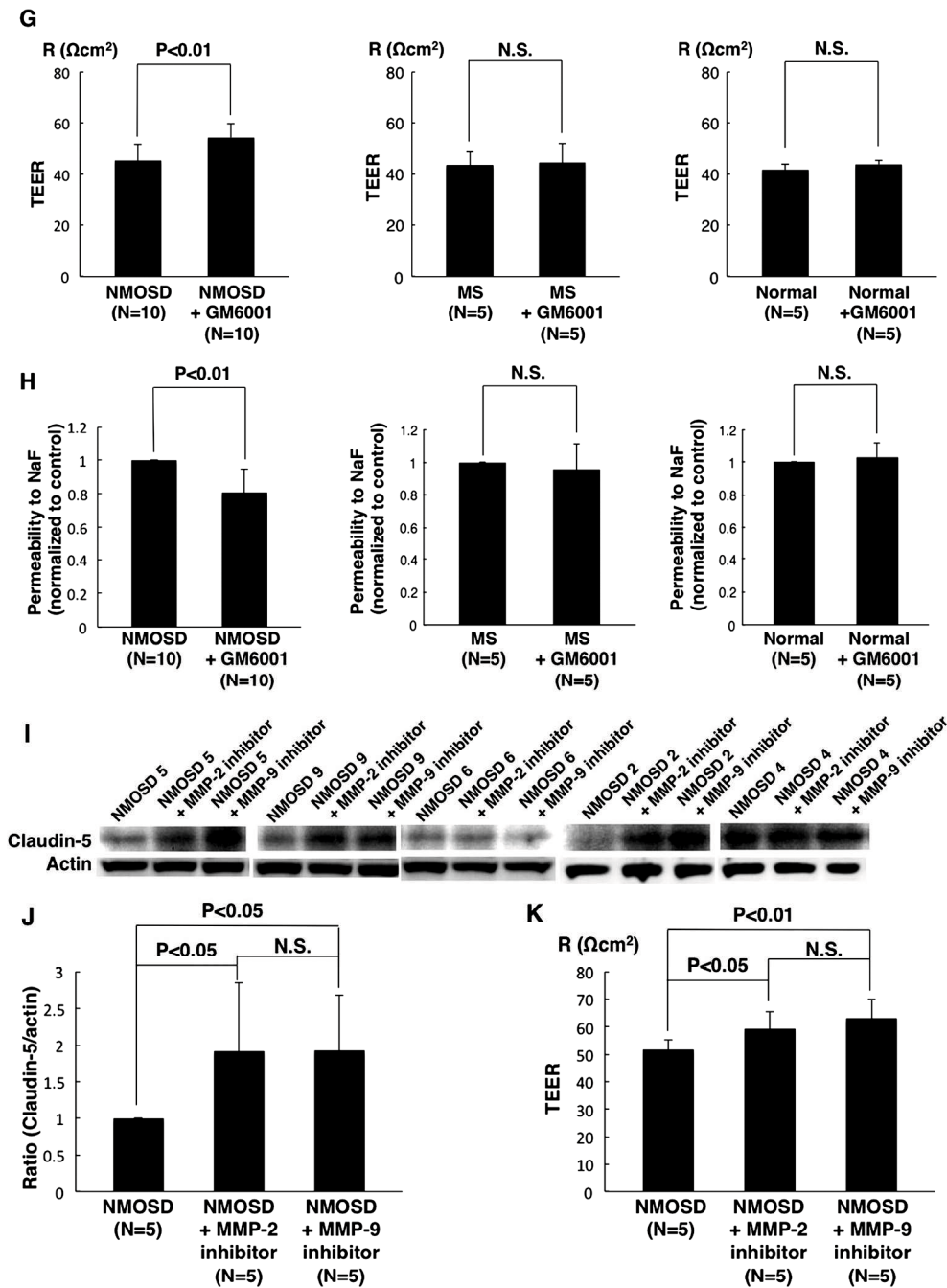


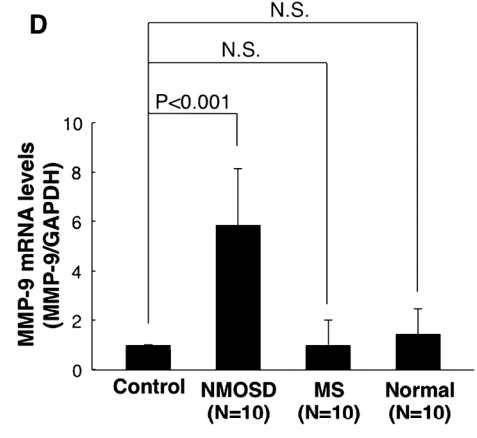
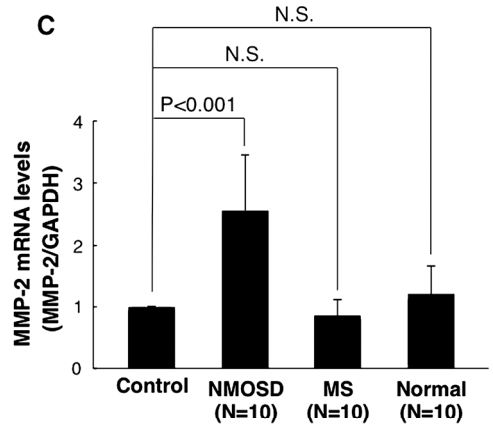
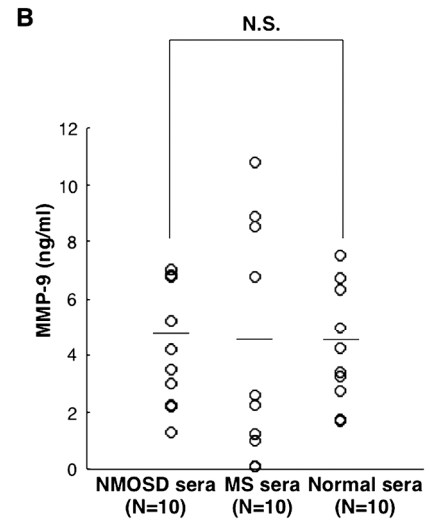
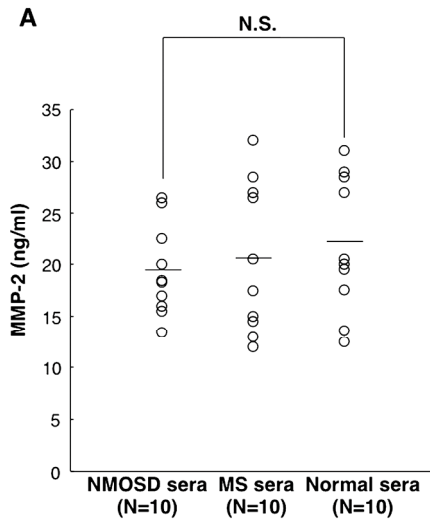
Figure 4

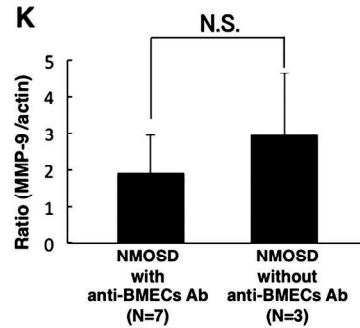
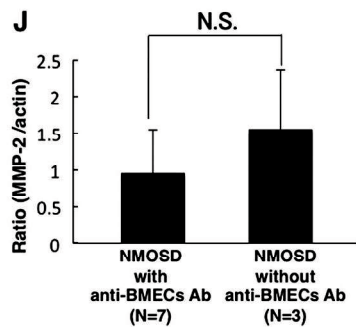
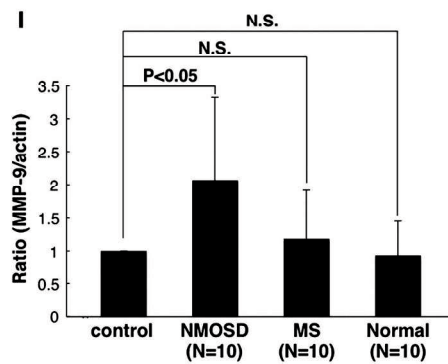
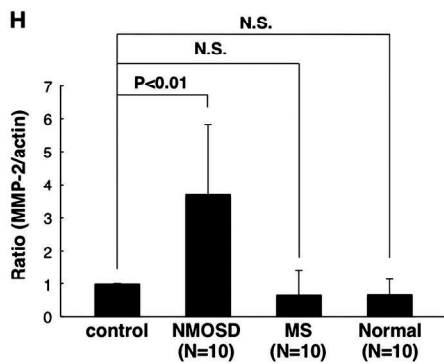
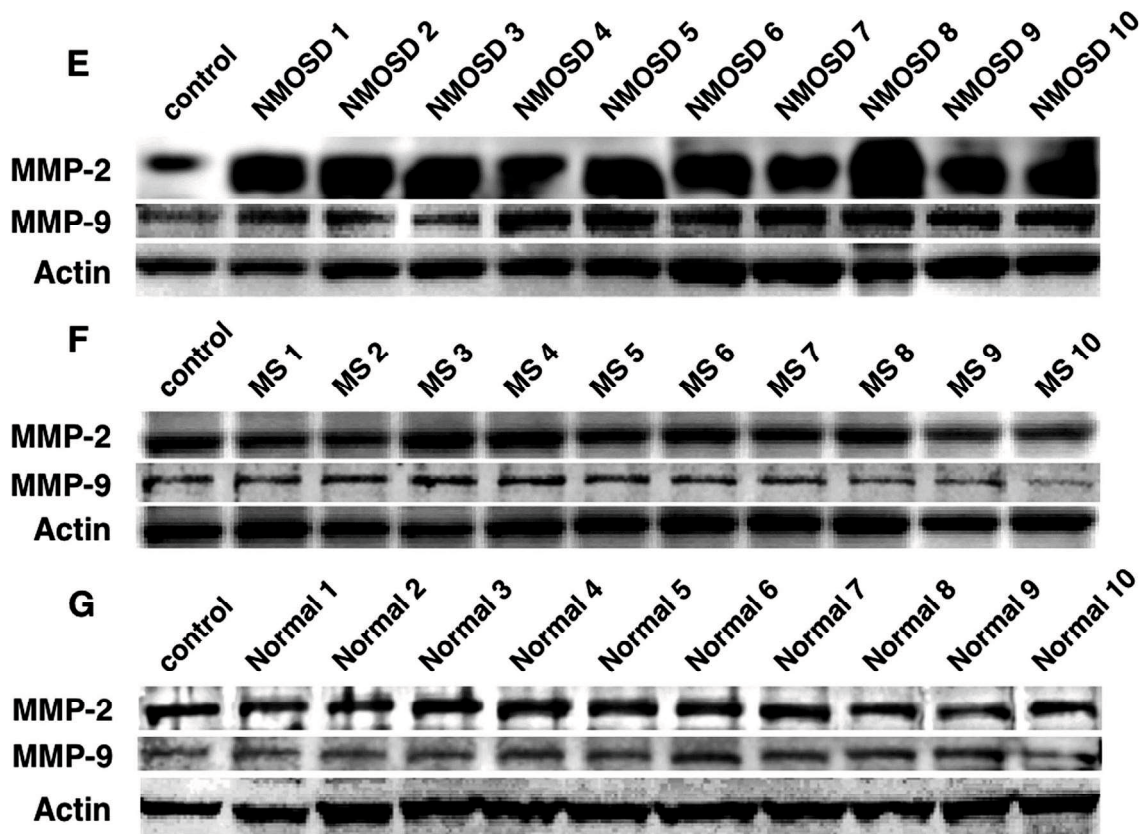
BMECsのNMOSD患者血清各10検体作用後のclaudin-5蛋白量への、広域MMP阻害剤であるGM6001の影響をウェスタンブロット法で確認した(A-C)。GM6001で前処置を行ってNMOSD患者血清を作用させるとGM6001の前処置を行わずにNMOSD患者血清を作用させた細胞と比較してclaudin-5蛋白量が上昇していた。棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, NMOSD n=10, MS n=5, normal n=5, *p<0.01)(D-F)。GM6001の前処置を行ってNMOSD患者血清を作用させた群では、GM6001での前処置を行わずにNMOSD患者血清を作用させた群と比較してBMECsの電気抵抗値が有意に上昇しておりBMECsのNaF透過性が有

意に低下していた(平均±SEM, NMOSD n=10, MS n=5, normal n=5, *p<0.01) (G,H). 選択的MMP-2阻害剤と選択的MMP-9阻害剤によるNMOSD患者血清に曝露後のBMECsのclaudin-5蛋白量への影響をウェスタンブロット法で確認した. 選択的MMP-2もしくはMMP-9の阻害剤で前処置を行うことで, 前処置を行わずに血清を作用させた群と比較してBMECsのclaudin-5蛋白量の上昇がみられた(I). 棒グラフは本実験で行ったデンシトメトリー値を反映している(平均±SEM, n=5, MMP-2: p<0.05, MMP-9: p<0.05)(J). 選択的MMP-2阻害と選択的MMP-9阻害での両群間でclaudin-5蛋白量に有意差はなかった. MMP-2やMMP-9の選択的阻害剤で前処置を行うことでNMOSD患者血清を作用後のBMECsの電気抵抗値は有意に上昇した(平均±SEM, n=5, MMP-2: p<0.05, MMP-9: p<0.01)(K). 選択的MMP-2阻害剤と選択的MMP-9阻害剤での両群間でBMECsの電気抵抗値に有意差はなかった. NMOSD: 10%FBSを含むDMEMでNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD+GM6001: 10%FBSを含むDMEMでGM6001前処置をしたNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, MS: 10%FBSを含むDMEMでMS患者血清を10%に希釈した条件培地, MS+GM6001: 10%FBSを含むDMEMでGM6001前処置をしたMS患者血清を10%に希釈した条件培地, normal: 10%FBSを含むDMEMで健常人血清を10%に希釈した条件培地, normal+GM6001: 10%FBSを含むDMEMでGM6001前処置をした健常人患者血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD+MMP-2 inhibitor: 10%FBSを含むDMEMでMMP-2阻害剤前処置をしたNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD+MMP-9 inhibitor: 10%FBSを含むDMEMでMMP-9阻害剤前処置をしたNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地,

NMO患者血清がBBB由来血管内皮細胞からMMP-2/MMP-9の分泌を増加させ、BBBを破綻させている

Figure5ではNMOSD患者血清をBMECsに作用させ、MMP-2/9産生の影響を確認した. まず、MMP-2/MMP-9の血中濃度をNMO患者、MS患者、健常成人と比較したが、3群間で有意な差を認めなかった (figure 5A,B). NMO患者血清を作用させると、TY10から産生されるMMP-2/MMP-9がmRNAおよび蛋白レベルで増加した. MS患者血清/健常成人血清を作用させても変化が無かった (Figure 5C-I). . 抗BMECs抗体の有無はBMECsでのMMP-2/9蛋白の分泌に影響しなかった(figure 5J,K). また、安定期NMOSD患者血清を作用させてもBMECsのclaudin-5, MMP-2とMMP-9蛋白量に変化はみられなかった(figure 5L,M).さらに、急性期NMOSD患者血清を血液神経関門構成血管内皮細胞に作用させてもこれらの蛋白量に変化はみられなかった(figure 5N,O).





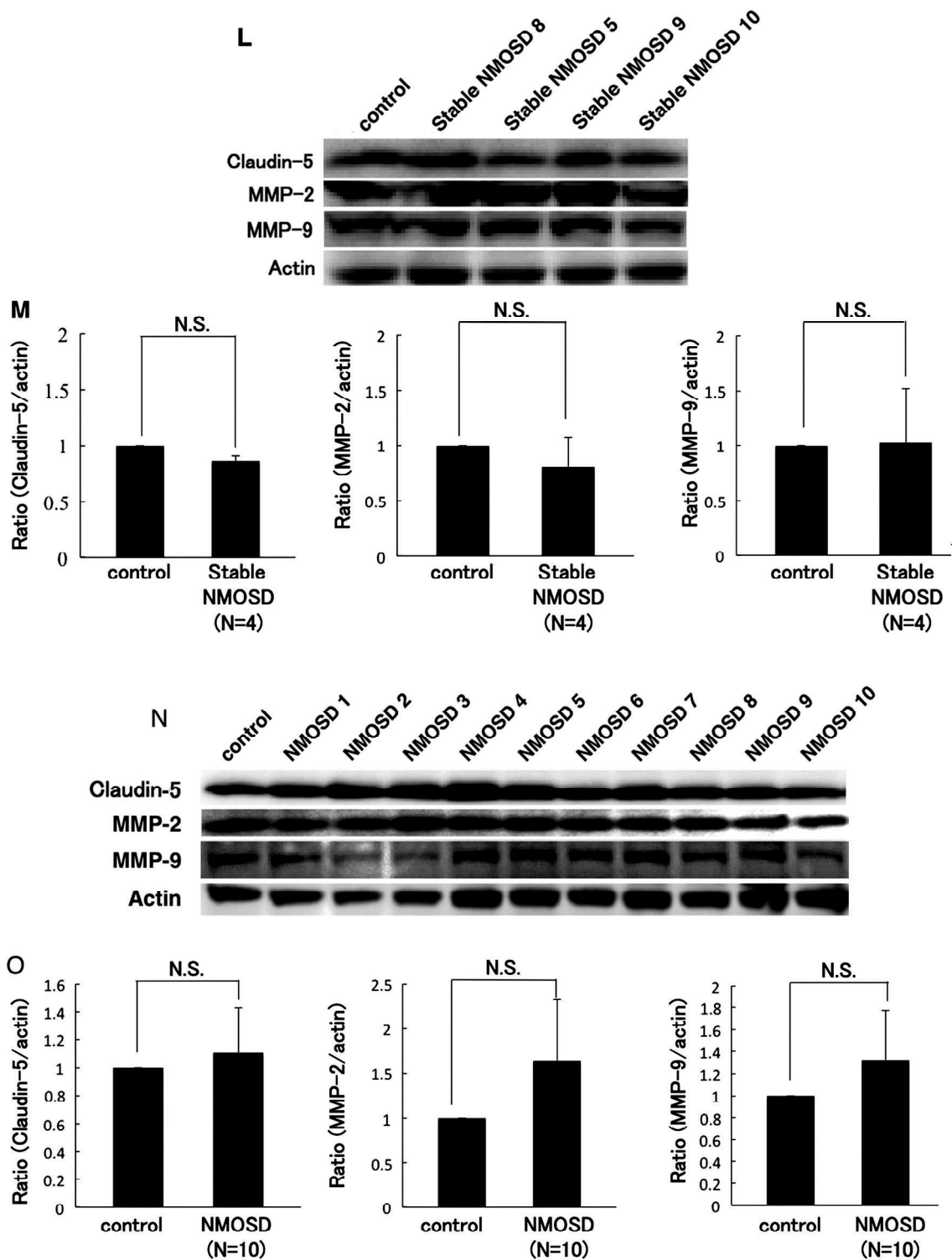


Figure 5

MMP-2/9の血清中濃度をNMOSD患者群とMS患者群と健常人群で測定した。棒線は各群での平均を示している。3群間で有意差はみられなかった(A,B)。NMOSD患者血清作用後のBMECsでのMMP-2/9発現をリアルタイムPCRで相対的評価した。BMECsでのMMP-2やMMP-9はNMOSD患者血清作用後に有意にアップレギュレーションされていたが、MS患者血清や健常人

血清を作用させた群では変化はみられなかった(平均±SEM, n=10, *p<0.001). NMOSD患者血清を作用後のBMECsのMMP-2とMMP-9の蛋白量をウェスタンブロット法で確認した. NMOSD患者血清を作用させるとMMP-2とMMP-9の蛋白量が有意に増加していたが(平均±SEM, n=10)(E), MS患者血清や健常人血清では変化はみられなかった(平均±SEM, n=10, *p<0.01)(F,G). 棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=10, MMP-2: p<0.01, MMP-9: p<0.05)(H,I). 抗BMECs抗体の有無はBMECsで分泌されるMMP-2やMMP-9の蛋白量に影響しなかった(J,K). 寛解期NMOSD患者血清(患者番号5,8,9,10)ではBMECsにおけるclaudin-5やMMP-2, MMP-9の蛋白量に変化はなかった(L). 棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=4)(M). ヒト血液神経関門構成細胞でのclaudin-5やMMP-2, MMP-9蛋白量は急性期NMOSD患者血清を作用させても変化はみられなかった(N). 棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=10)(O). control: DMEMでFBSを20%に希釈した条件培地, NMOSD: 10%FBSを含むDMEMで急性期NMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, MS: 10%FBSを含むDMEMでMS患者血清を10%に希釈した条件培地, normal: 10%FBSを含むDMEMで健常人血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD with anti-BMECs Ab: 10%FBSを含むDMEMで抗BMECs抗体陽性の急性期NMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD without anti-BMECs Ab: 10%FBSを含むDMEMで抗BMECs抗体陰性の急性期NMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, stable NMOSD: 0%FBSを含むDMEMで寛解期NMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地.

NMOSD患者由来免疫グロブリンG (NMO-IgG)のBBB由来血管内皮細胞への影響

Figure 6A-EではNMOSD患者血清中から精製したIgGのBBB機能への影響を示した. 我々は血清採取時未治療の5名のNMOSD患者血清(患者番号2,4,5,6,9; 4名はtypical NMOSDであり, 1名は脊髄長大病変のみのNMOSD)から免疫グロブリンG(NMO-IgG)を精製した. NMO-IgGをTY10に作用させると, 細胞のVCAM-1蛋白量が増加したが, claudin-5, MMP-2, MMP-9蛋白量に変化がなかった. 健常成人血清から精製したIgGをTY10に作用させても, これらの蛋白量に変化がなかった. NMO-IgGからhAST-AQP4細胞を用いた免疫吸着法により抗AQP4抗体を除去しても, TY10のVCAM-1蛋白量に変化がなかった (Figure 6E, F).

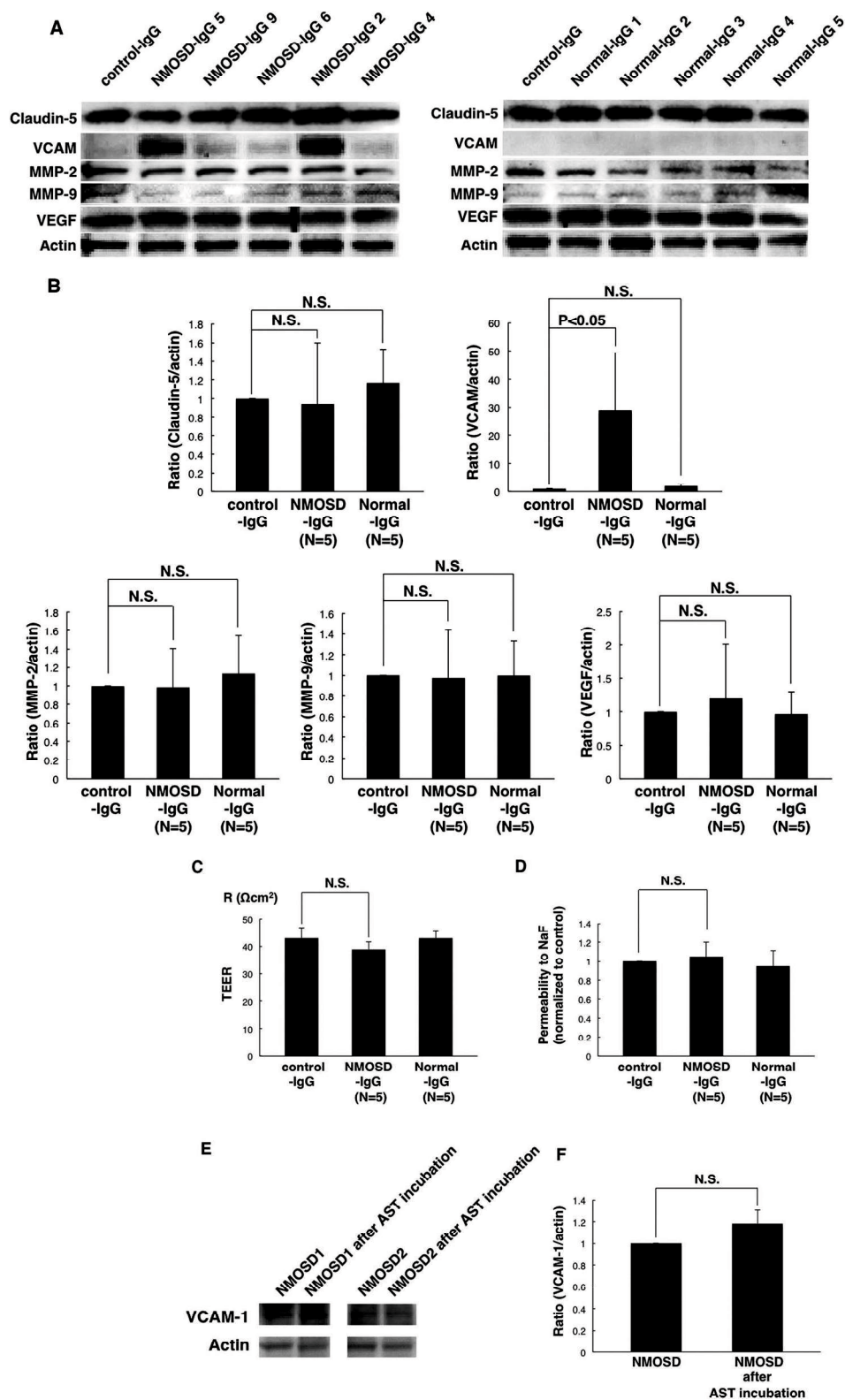


Figure 6

抗BMECs抗体が陽性で未治療の時期に血清採取した4名のtypical NMOSD患者と1名の脊髄長大病変のみの患者から成る5名のNMOSD患者(患者番号2,4,5,6,9)をランダムに抽出した。これ

らの抗BMECs抗体陽性NMOSD患者血清から精製したIgGの、BMECsのVCAM-1、claudin-5の発現への影響をウェスタンブロット法で確認した(A)。NMOSD患者血清から精製したIgGを作用させると、BMECsにおけるVCAM-1蛋白量は有意に上昇していたが、一方健常人血清から精製したIgGを作用させても変化は見られなかった。NMOSD患者血清を作用させてもBMECsにおけるclaudin-5、MMP-2/9、VEGFの蛋白量は変化がなかった。棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=5, *p<0.05)(B)。BMECsの電気抵抗値とNaF透過性はNMOSD患者血清から精製したIgGを作用させても変化はみられなかった(C,D)。抗AQP4抗体価を低下させてもBMECsのVCAM-1発現に影響はなかった(E)。棒グラフは本実験で行ったデンシノメトリー値を反映している(平均±SEM, n=3)(F)。control-IgG: FBSから精製したIgGを含む条件培地, NMOSD: NMOSD患者血清から精製したIgGを含む条件培地, normal-IgG: 健常人血清から精製したIgGを含む条件培地, NMOSD: 10%FBSを含むDMEMでNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地, NMOSD after AST incubation: AQP4を高発現しているアストロサイトと共に150分間インキュベーションしたのちのNMOSD患者血清を10%に希釈した条件培地。

6. 考察

NMOSD患者では、抗AQP4抗体は末梢の形質細胞から主に産生されていることが報告されている^{6,28)}。動物実験ではAQP4抗体陽性NMO患者血清から採取したIgG (NMO-IgG)を単に正常ラットに経静脈的に投与してもNMO病変を惹起させることができないが、BBBの破綻を伴うMBP反応性T細胞を移入した実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)ラットにNMO-IgGを経静脈的に投与すると、症状が重症化し、NMOに特徴的な病理像が再現できる¹⁰⁾²⁹⁾。また、Saadounらの報告では、マウスの脳内にNMOSD患者から採取したIgGとヒト補体を経頭蓋的に直接同時投与と局所的にNMOSDの組織学的特徴をもつ病変が惹起されている³⁰⁾。これらの結果は、AQP4抗体が正常なBBBを通過しないことを示唆するものであり、NMOの病態形成にBBBの破綻が先行する必要があることを示す有力な傍証であると考えられる。臨床的な側面からも、NMO患者脳脊髄液では、急性期にIgGやアルブミンの髄液/血清比、可溶性VCAM濃度が上昇することが示されており³¹⁾、NMOではBBBが破綻していることが間接的に証明されている。

本研究では、ヒトBBB由来内皮細胞株を用いて、急性期NMO患者血清がBBB

破綻をきたす分子メカニズムの解明を試みた。(1) 急性期NMOSD血清をBBB由来内皮細胞株に作用させると重要なTJ関連分子であるclaudin-5の発現が低下し、経内皮電気抵抗(TEER)、透過性が低下すること、(2) MMP-2/9阻害剤をNMOSD患者血清に併せてBBB由来内皮細胞に作用させると、claudin-5の発現とTEERが増加しBBB機能を高める方向に働くこと、(3) NMOSD患者血清を作用させるとBBB由来内皮細胞から放出されるMMP-2/9の発現が増加すること、(4) NMOSD患者血清と患者血清から精製したIgGを作用させるとBBB構成内皮細胞のVCAM-1発現が増加すること、(5) NMOSD患者血清中に含まれるAQP4抗体価を低下させ、BBB由来内皮細胞株に作用させても、未処理の血清を作用させた場合と比べてBBB破綻の程度(claudin-5, VCAM-1発現の程度)に有意な差がみられないこと、などを示した。これらの結果により、NMOSD患者血清に含まれる液性因子が直接的にBBBを破綻させること、NMOSD患者血清に含まれるAQP4抗体以外の液性因子がBBB構成内皮細胞に作用し、血管内皮からautocrineに分泌されるMMP-2/9の発現を増加させBBB破綻をきたす可能性があること、AQP4抗体そのものはBBBを破綻させず、BBB構成内皮細胞のVCAM-1発現を増加させる作用を有する未知のBBB構成血管内皮細胞に対する自己抗体が存在する可能性があることが解明され、NMOSDでのBBB破綻の詳細な分子メカニズムが明らかとなった。

MMP-2やMMP-9は細胞外器質分解の中心的役割を担うメタロプロテアーゼで、MS患者や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)ではMMP-2/MMP-9によるtight junction蛋白の切断を伴うBBB破綻が病態形成に重要な役割を果たす可能性が想定されている。NMO患者の脳脊髄液ではMS患者や健常成人と比較し、MMP-9が有意に増加していることが示されており、その増加が疾患の臨床的/画像的重症度と相関していると報告されている。本研究の結果から、MMP-2/MMP-9のsourceとして血管内皮細胞が想定され、血管内皮細胞からautocrineに局所的に産生されるMMP-2/MMP-9がBBB破綻に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

MMP-2/MMP-9阻害薬はNMO急性期に投与することでBBB破綻を軽快させAQP4抗体の中枢神経内流入を阻害することでNMOの新規治療戦略につながる可能性がある。また、本研究により、広域MMP阻害薬であるGM6001はNMOSD患者におけるBBB破綻を改善させる治療法となる可能性が考えられた。以前の報告ではGM6001がEAEの発症におけるBBB破綻を改善させ、臨床的EAEの発

症を阻害させたことが示されている³²⁾。しかし、広域MMP阻害薬は全身の組織のMMP活性を阻害するため、予期せぬ副作用を生じる可能性がある³³⁾。血管内皮のMMP-2/9の作用を選択的に阻害する薬剤が望ましく、今後研究を進展させていくことが重要であると考えられた。

VCAM-1は血管内皮細胞上に発現する接着因子でリンパ球が発現する β 1インテグリンであるVLA-4と接着し、BBBを超えるリンパ球の遊走に関与していると考えられている³⁴⁾。VCAM-1は未刺激で正常の血管内皮細胞上に殆ど存在せず、IL-1やTNF- α のような炎症性サイトカインの刺激によって初めて誘導されることから、炎症反応過程に密接に関与すると考えられている³⁵⁾。本研究で、NMO-IgGによりBBB構成内皮細胞のVCAM-1発現が増加したことから、NMO-IgGが急性期NMOでのリンパ球の中枢神経内侵入、それに伴う炎症を惹起する作用を有する可能性が想定された。ナタリズマブはVLA-4の構成成分である α 4-integrinに対するモノクローナル抗体であり、 α 4-integrinsと血管内皮細胞表面に発現するVCAM-1の相互作用を阻害することでBBBへのリンパ球の侵入を阻止する多発性硬化症の新規治療薬である³⁶⁾³⁷⁾。本剤はMSの病因そのものである中枢神経系ミエリンに対する免疫現象の抑制ではなく、BBBにおける白血球の侵入を抑止することにより多発性硬化症の増悪が抑制できることを示した画期的な薬剤である。我々の研究結果から、ナタリズマブによるVLA-4/VCAM-1システムの阻害がNMOSDに臨床的効果を示す可能性が考えられたが、過去の症例報告ではナタリズマブがNMOには有効ではない可能性が示唆されている³⁸⁾⁻⁴⁰⁾。この報告によると、ナタリズマブを投与されたNMO例の検討では、明らかな再発抑制効果はみられず、むしろ治療中止後に重症度の進行がみられていた。この機序として、ナタリズマブがT細胞とB細胞の中枢神経内への遊走を阻止することで、末梢血中のB細胞や形質細胞数が増加して末梢における抗AQP4抗体産生が増加し、NMOの活動性を高めた可能性が推測されている。この結果は、NMOの治療はMSの治療とは根本的に異なる必要があることを示唆する。また、血管内皮細胞のVCAM-1に選択的に作用する薬剤がNMO治療戦略となる可能性を提示していると考えられた。

7. 結語

本研究により、NMOSD急性期でのBBB破綻に、血清中に含まれる何らかの液性因子による血管内皮によるautocrineに産生されるMMP-2/9増加が重要な役

割を果たすこと示された。NMOSDの治療ではBBBを超えた抗AQP4抗体の中樞神経内への流入を効率的に阻害することが重要であると考えられ、発症早期にBBB破綻に対して効率的に介入する治療法を開発することが、重篤な後遺症を残す本症できわめて重要である。更なる分子メカニズムの解明が今後の重要な研究課題であると考えられた。

8.謝辞

本研究に際し実験の遂行・データ分析や論文作成にご尽力頂いた清水文崇先生, 実験の遂行・データ分析にご協力いただいた齋藤和幸先生, 春木明代先生, 佐野泰照先生, 藤澤美和子先生, 安部真彰先生, 古賀道明先生, 抗AQP4抗体価の測定にご尽力頂いた東北大学医学部神経内科 高橋利幸先生, 本研究にあたりご指導ご鞭撻頂きデータ分析・論文作成にご尽力頂いた神田 隆先生に深謝致します。

9.参考文献

- 1) Jarius S, Wildemann B. The history of neuromyelitis optica. *J Neuroinflammation* 2013;10:8.
- 2) Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;264:2106–12.
- 3) Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 2007;69:2221–31.
- 4) Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* 2010;6:383–92.
- 5) Misu T, Fujihara K, Kakita A, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain* 2007;130:1224–34.
- 6) Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 2007;130:1235–43.
- 7) Jacob A, McKeon A, Nakashima I, et al. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO spectrum disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:922–30.
- 8) Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet*

- Neurol 2012;11:535–44.
- 9) Sharma R, Fischer MT, Bauer J, et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol* 2010;120:223–36.
 - 10) Bradl M, Misu T, Takahashi T, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 2009;66:630–43.
 - 11) Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008;131:3072–80.
 - 12) Kim W, Lee JE, Li XF, et al. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. *Mult Scler* 2012;18:578–86.
 - 13) Uzawa A, Mori M, Masuda S, et al. CSF high-mobility group box 1 is associated with intrathecal inflammation and astrocytic damage in neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:517–22.
 - 14) Vincent T, Saikali P, Cayrol R, et al. Functional consequences of neuromyelitis optica-IgG astrocyte interactions on blood-brain barrier permeability and granulocyte recruitment. *J Immunol* 2008;181:5730–37.
 - 15) Shimizu F, Sano Y, Takahashi T, et al. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:288–97.
 - 16) Hosokawa T, Nakajima H, Doi Y, et al. Increased serum matrix metalloproteinase-9 in neuromyelitis optica: implication of disruption of blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2011;236:81–6.
 - 17) Uzawa A, Mori M, Masuda S, et al. Markedly elevated soluble intercellular adhesion molecule 1, soluble vascular cell adhesion molecule 1 levels, and blood-brain barrier breakdown in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2011;68:913–17.
 - 18) Leppert D, Ford J, Stabler G, et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:2327–34.
 - 19) Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the “hemopexin” domain? *Matrix Biol* 1997;15:511–18.
 - 20) Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485–9.

- 21) Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 2007;6:805–15.
- 22) Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
- 23) Sano Y, Shimizu F, Abe M, et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. *J Cell Physiol* 2010;225:519–28.
- 24) 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.
- 25) Abe M, Sano Y, Maeda T, et al. 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.
- 26) Saito K, Shimizu F, Koga M, et al. Blood-brain barrier destruction determines Fisher/ Bickerstaff clinical phenotypes: an in vitro study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:756–65.
- 27) 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 Aging* 2013;34:1902–12.
- 28) Jarius S, Franciotta D, Paul F, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation* 2010;7:52.
- 29) Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, et al. Anti-aquaporin-4 antibody induces astrocytic cytotoxicity in the absence of CNS antigen-specific T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:205–10.
- 30) Saadoun S, Waters P, Bell BA, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain* 2010;133:349–61.
- 31) Jarius S, Paul F, Franciotta D, et al. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. *J Neurol Sci* 2011;306:82–90.
- 32) Gijbels K, Galargy RE, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune

- encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 1994;94:2177–82.
- 33) Augé F, Hornebeck W, Decarme M, et al. Improved gelatinase selectivity by novel zinc binding groups containing galardin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1783–6.
- 34) Engelhardt B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clin Exp Neuroimmunol* 2010;1:79–93.
- 35) Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev* 2012;248: 228–39.
- 36) Engelhardt B, Kappos L. Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 2008;5:16–22.
- 37) Miller DH, Soon D, Fernando KT, et al. AFFIRM Investigators. MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS. *Neurology* 2007;68:1390–401.
- 38) Barnett MH, Prineas JW, Buckland ME, et al. Massive astrocyte destruction in neuromyelitis optica despite natalizumab therapy. *Mult Scler* 2012;18:108–12.
- 39) Kleiter I, Hellwig K, Berthele A, et al. Failure of natalizumab to prevent relapses in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2012;69:239–45.
- 40) Jacob A, Hutchinson M, Elson L, et al. Does natalizumab therapy worsen neuromyelitis optica? *Neurology* 2012;79:1065–6.
- 41) Shimizu F, Kanda T. Disruption of the Blood-Brain Barrier in Inflammatory Neurological Diseases. *BRAIN and NERVE* 2013; 65: 165-176.
- 42) Shimizu F, Nishihara H, Sano Y, et al. Markedly Increased IP-10 Production by Blood-Brain Barrier in Neuromyelitis Optica. *PLOS ONE* 2015; 10: e0122000.
- 43) Dean W, Brenda B, Jeffrey B, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 2015; 85: 177-189.