

The active form of vitamin D directly protects
the blood-brain barrier
in multiple sclerosis

(多発性硬化症では活性型ビタミンDは
血液脳関門に対して直接的な保護作用を有する)

氏名 高橋 志織

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29年3月

目次

1.	要旨	3
2.	研究の背景	3
3.	目的	5
4.	方法	6
5.	結果	9
6.	考察	16
7.	結語	18
8.	謝辞	18
9.	参考文献	18

1. 要旨

【背景・目的】多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)に対して活性型ビタミンD(1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃)は治療作用を有すると報告されているが、詳細な機序は明らかでない。今回、我々はMS患者血清を用いて、活性型ビタミンDが直接的にBBBへ保護作用を有するかについて検討した。

【方法】ヒト不死化脳微小血管由来内皮細胞株(human brain microvascular endothelial cells, HBMECs)にビタミンD受容体が存在することを確認した。次に、TNF α を作用させた炎症条件下で、細胞接着分子やtight junction関連蛋白の発現に対する活性型ビタミンDの効果について、遺伝子・蛋白レベルで検討した。さらに、活性型ビタミンDを前もって作用させた後に、MS患者血清(再発寛解型、二次進行型)を作用させ、HBMECsのvascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), phospho-NF κ B (p-NF κ B), claudin-5, ZO-1蛋白発現がどのように変化するかを解析した。

【結果】HBMECsでのビタミンD受容体の発現を確認した。活性型ビタミンDはTNF α により誘導されたZO-1低下とclaudin-5低下、電気抵抗値の低下を改善させ、TNF α により増加したICAM-1蛋白量を抑制した。さらに活性型ビタミンDはTNF α によるNF κ Bの活性化を抑制した。患者血清を用いた実験では、活性型ビタミンDは再発寛解型/二次進行型MS血清作用後のHBMECsでのVCAM-1増加とp-NF κ B増加を抑制させた。また、活性型ビタミンDは、急性期再発寛解型MS患者血清作用後のHBMECsのZO-1低下とclaudin-5低下を改善させた。

【考察】活性型ビタミンDは、HBMECsに直接作用し、細胞接着分子を減少させ、tight junction関連蛋白を増加させることで、MSにおけるBBB破綻を抑制することが示された。活性型ビタミンDは、MSの発症・再発予防の新たな治療標的となる可能性が考えられた。

2. 研究の背景

多発性硬化症は、主として中枢神経白質に脱髄巣が時間的、空間的に多発することを特徴とする慢性炎症性脱髄疾患であり¹⁾、急性視神経炎による視力低下や脳・脊髄病変による対麻痺など様々な中枢神経障害に基づく症状がみられる。MSは中枢神経髄鞘抗原を標的とした自己免疫疾患と推定されており、遺伝的因子と環境因子が影響する多因子疾患と考えられている²⁾。

近年、MSの環境因子としてビタミンDが注目されており³⁾、血中ビタミンD濃

度の低値がMSの発症や再発に関与していると多数報告されている^{4,8)}。ビタミンDの代謝物は複数あるが、 $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$: $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は活性型ビタミンDで最も強い免疫調節作用を有するとされる。 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は半減期が5~8時間と短いため、血中ビタミンD濃度の指標として半減期が約3週間と比較的長い25-hydroxyvitamin D 25-(OH) Dが測定されることが多い。米国における大規模な前方視的cohort studyでは、血清 25-(OH) D 濃度の低値がMS発症のリスクになることが示された⁵⁾。最近の本邦での検討でも、二次進行型MS (secondary progressive MS, SPMS) 患者の血清25-(OH) D濃度が再発寛解型MS (relapsing and remitting MS, RRMS) 患者や健常人に比べて有意に低いことや、MS患者の25-(OH) D血中濃度がexpanded disability status scale (EDSS) やmultiple sclerosis severity score (MSSS)と逆相関することが示され、我が国においてもMSの罹患率や重症度と血中ビタミンD濃度との関連性が明らかになった⁹⁾。

ビタミンD濃度の低下と、MSの発症や再発、予後との因果関係は極めて濃厚と考えられるが、その作用メカニズムは解明されていない。ビタミンDはほとんどが、核内受容体であるビタミンD受容体 (vitamin D receptor: VDR) を介してその作用を発現する。 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はVDRと結合し、9-*cis*-レチノイン酸をリガンドとする核内受容の一種であるレチノイドX受容体とヘテロ二量体を形成し、ついでDNA上のビタミンD応答領域 (vitamin D response element: VDRE)に結合し、標的遺伝子の転写活性を調節する。VDRは様々な免疫細胞でも発現することが知られており、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞に多く発現しているとされる¹⁰⁾。T細胞を含むすべての免疫担当細胞がVDRを発現していることから、ビタミンDは免疫担当細胞へ作用しMSの発症や再発に関わっている可能性が指摘されている¹¹⁻¹³⁾。

実際に、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を用いた検討で $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ やビタミンDアナログ薬投与群ではEAEの神経症状が改善することが多くの報告で示されており、その機序として活性型ビタミンDがヘルパーT細胞のTh1/Th2バランスをTh2側にシフトさせることや、Th17細胞への分化を抑制するメカニズムが考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。一方で、VDRは免疫担当細胞だけではなく、中枢神経系を構成するニューロンやオリゴデンドロサイトやアストロサイトにも発現していることが確認されている^{17,18)}。これらの細胞に $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ が直接作用し、免疫調節作用だけでなく、ニューロンの分化や伸長、神経成長因子の産生を制御して脳機能に影響

を与えるといった、ビタミンDの新たな生理作用が近年注目されている¹⁸⁻²²⁾。

多発性硬化症では、中枢神経のバリアシステムである血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の破綻が中枢神経の炎症に先行する重要なプロセスと考えられている。BBBは脳微小血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの3つの細胞と2つの基底膜から構成され、バリア機能の本体は微小血管を構成する内皮細胞であり、隣接する細胞間でclaudin-5やZO-1, occludin等で構成されるtight junctionによって物質の往来を阻止し、中枢神経系の内外を隔てるバリア機能を担っている。BBB破綻には大別して、脳微小血管内皮細胞の細胞接着分子 (VCAM-1, ICAM-1)の増加を介した炎症細胞の中枢神経内浸潤と、tight junction (claudin-5, ZO-1など) の破綻により微小循環内の液性因子が内皮細胞間を通り中枢神経内へ漏出する2つの機序がある。我々はこれまでに、MS患者血清がclaudin-5蛋白量を低下させ、バリア機能の指標である電気抵抗値を低下させ、VCAM-1の蛋白量を増加させることでBBBを破綻させることを報告している²³⁾。

BBBへのビタミンDの作用については、近年、マウスの脳血管内皮細胞を用いた虚血条件下の実験で、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がMMP-9の増加および、tight junction (claudin-5, ZO-1, occludin)関連蛋白の低下やNF κ Bの活性化を抑制し、バリア機能を改善させる可能性について報告されている²⁴⁾。BBBの首座であるヒト脳微小血管内皮細胞にもVDRが存在することが予想され、血中の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がBBB構成内皮細胞に直接的作用し、細胞接着因子やtight junction関連蛋白の挙動を変化させ、MSの病態に影響を与えると予想されるが、現在詳細なメカニズムは明らかになっていない。

3.目的

本研究は、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がBBBに直接作用し保護効果を有するか検証するため、当科で樹立したヒトBBB構成内皮細胞株 (human brain microvascular endothelial cell lines: HBMECs, 細胞名“TY10”) を用いて、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がTY10のtight junction関連蛋白 (claudin-5, ZO-1) や細胞接着分子 (ICAM-1, VCAM-1), 転写因子 (NF- κ B) の発現に影響を与えるかについて細胞学的検討を行った。

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計画され、山口大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。材料として当院に入院または通院している、改訂版McDonald診断基準²⁵⁾を満たすMS患者9名と健常者3名の合計12名(男性5名, 女性7名, 平均年齢43歳)から採取した血清を用い、再発寛解型MSの再発期患者 relapse phase of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS-R) 3名, 再発寛解型MSの安定期患者 stable phase of RRMS (RRMS-S) 3名, 二次進行型MS患者 secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) 3名, 健常者3名の4群に分けた。全ての病型のMS患者でIFN- β を使用していた。RRMS-R患者 3名は頭部MRIでガドリウム造影病変を有し, 新たな再発症状が出現した1週間以内に血清を採取した。RRMS-S患者は1年以上寛解状態を保っている患者とした。SPMS患者は, 明確な再発は無いがEDSS score3.5以上で, EDSS scoreの進行性増悪を認めた患者群とした。すべての検体は解析までの間, 採取後直ちに-80°Cで保存し, 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

①培養細胞

本研究で我々が用いたTY10細胞は, 文書にて同意が得られた髄膜腫患者より手術の際に腫瘍へのアプローチを確保するために切除された正常脳の一部を材料とした。脳組織よりBBBを構成する脳微小血管内皮細胞を単離した後に, レトロウイルスベクターを用いて温度感受性SV40ラージT抗原(tsA58)およびヒトテロメラーゼ遺伝子を導入した条件的不死化細胞株である²⁶⁻²⁸⁾。培養はコンフルエントになるまでは33°C, 5% CO₂の条件で行い, EBM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA) に抗生剤とウシ胎児血清(fetal bovine serum: FBS) (Sigma, St. Louis, MO, USA)を20%濃度になるよう加えて調整したものをを用いた。コンフルエント後の各種実験では基礎培地として抗生剤入りのDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma)を用いた。また, 当科で樹立したヒト由来アストロサイト株 (human astrocyte cell line: hAST)²⁹⁾, ペリサイト株 (human brain pericyte cell line: HBPCT)³⁰⁾の培養はDMEMに 10% FBSを添加した培地を使用した。

②抗体・試薬

抗claudin-5抗体と抗ZO-1抗体はInvitrogen (San Francisco, CA, USA)より,

抗VDR抗体，抗ICAM-1抗体および抗p-NFκB抗体はSanta Cruz (Santa Cruz, CA, USA)より，抗VCAM-1抗体はR&D system(Minneapolis, MN, USA)より購入した． $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ とhuman recombinant tumor necrosis factor- α TNF α はWako (Osaka, Japan)より購入した． $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解して使用した．

③ $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ とTNF α の投与方法

TY10を37°C，5% CO₂の条件で，EBM-2に20%FBSを加えた培養液で培養した．細胞がコンフルエントになった後にEBM-2を吸引し，Hanks (Life technologies, NY, USA)で洗浄し， $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を 10^{-9}M ， 10^{-8}M ， 10^{-7}M の濃度に調整したDMEMを添加し，37°C，5% CO₂の条件で24時間培養した．Controlとして $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を含まないDMEMに作用させたTY10を用いた．その後，TNF α 1ng/mlを投与し，37°C，5% CO₂の条件で24時間培養した．mRNAの採取はTNF α の投与から12時間後に，蛋白の採取，免疫染色は24時間後に行った．

④細胞培養と患者血清の投与方法

患者血清として，RRMS-R, RRMS-S, SPMSの血清を各々3例ずつ合計9症例用いた．また，ウシ胎児血清，健常者3名をコントロールとして用いた．細胞がコンフルエントになった後にHanksで洗浄し，10%に希釈した患者血清のみをDMEMに添加して24時間培養した場合と，10%に希釈した患者血清に加え $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を24時間作用させた場合についてtight junction構成因子(claudin-5, ZO-1), VCAM-1, p-NFκBの蛋白量の変化をwestern blot法で検討した

⑤real time PCRによる解析

PBSで洗浄した細胞からtotal RNAを採取し，120ngのtotal RNAから1本鎖cDNAを作成した．ICAM-1, ZO-1, claudin-5, G3PDHのヒトプライマーのシーケンスは以下のものを使用した．24位水酸化酵素 $1,25\text{(OH)}_2\text{D-24-hydroxylase}$ (CYP24A1) forward (cccact agc acc tcg tac caa c), CYP24A1 reverse (ccg tag cct tct ttg cgg tag tc), ICAM-1 forward (ccg gaa ggt gta tga act g), ICAM-1 reverse (tcc atg gtg atc tct cct c), ZO-1 forward (ttt aag cca gcc tct caa ca), ZO-1 reverse (ctg ctg gct tgt ttc tct ac), claudin-5 forward (ctg ttt cca tag gca gag cg), claudin-5 reverse (aag cag att ctt agc ctt cc), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) forward (gtc aac gga ttt ggt ctg tat t) and G3PDH revers (agt cit ctg ggt ggc agt gat). Stratagene Mx3005P (STRATAGENE, Cedar Creek, Texas, USA)を用いて定量的 real time 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。

⑥western blot法による解析

蛋白の抽出はTY10よりlysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% NP40, complete protease inhibitor mixture) を用いて行い, 遠心沈殿 (14,000rpm for 5 minutes)させた後の上清を用いた。蛋白濃度はQuickStart™ Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定した。10μgの蛋白を2-mercaptoethanolとともに100°Cで5分間処理し, 10% SDS-PAGE (Bio-Rad)によって分離した後, Polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (Amersham, Chalfont, UK) に転写した。PVDF膜を, blocking buffer (5% skimmed milk in 25mM Tris-HCl pH 7.6, 125nM NaCl, 0.5% Tween 20) で希釈した1次抗体を反応させた後 (室温, 1時間), TBS-T (25mM Tris-HCl pH 7.6, 125nM NaCl, 0.5% Tween 20)で4回洗浄し, 2次抗体 (anti-rabbit, anti-mouse ×3000) を反応させた (室温, 1時間)。TBS-Tで4回洗浄した後に, イムノスターZeta/イムノスターLD (WAKO)で化学発光を行った。β-tubulin, actinをインナーコントロールとして用い, Quantity One software program (Bio-Rad)でバンドの定量化を行った。

⑦電気抵抗値の評価

TY10細胞をコラーゲンコートした24 well培養プレートで培養し, コンフルエントとなった後にHanksで洗浄し, DMEMに溶解した $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (10^{-9} , 10^{-8} , $10^{-7}M$)を単独作用させた条件下と, $TNF\alpha$ を含んだDMEMに $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (10^{-9} , 10^{-8} , $10^{-7}M$)を作用させた条件下で, それぞれ24時間培養した後に, 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。

⑧免疫染色法による解析

TY10細胞を, 24well培養プレートまたはLab-Tek II チャンバースライド (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) で培養した。コンフルエントに達した後, 細胞をPBSで洗浄し, 100%エタノールを用いて30分間4°Cまたは4%パラホルムアルデヒドを用い20分間4°Cで固定した。次に0.3または1% Triton-Xで15分間透過処理した後, 常温で1時間2%FBS/PBSでblockingを行った。1次抗体(抗VDR抗体, 抗ZO-1抗体, 抗claudin-5抗体, 抗NFκB抗体)を1:200で希釈し4°Cでover nightで反応させた。その後PBSで洗浄し, anti-rabbit, anti-mouse FITC抗体 (2次抗体) を, 2%FBS/PBSにて1:500で希釈し1時間常温で反応させた。Negative controlには1次抗体を作用させず, 2次抗体のみを反応させた。TY10の細胞核を4',6-

diamidino-2-phenylindole (DAPI)で染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(3)解析

平均値を標準誤差と共に報告した。Fig 2,3,4でのグループ間の有意差は、Mann-Whitney U検定を用いて統計学的解析を行った。Fig 5の有意差 ($1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の前処理の有無による2群の差) については、対応のあるt検定で評価した。統計学的解析は信頼度 $p<0.05$ として行った。

5. 結果

ヒトBBB構成内皮細胞株 (TY10) にビタミンD受容体 (VDR) が存在する

RT-PCRを用いて、HBMECs (細胞名 TY10), hAST, HBPCTにVDRの存在をmRNAレベルで確認した。また、活性型ビタミンDにより特異的にかつ容量依存的にアップアギュレートされることが報告されているCYP24A1のmRNA発現が、TY10やhASTで確認された (figure 1A)。Western blot法にて、TY10, hAST, HBPCT全ての細胞株由来の蛋白抽出液中に、抗VDR抗体が認識する約50 kDaのバンドを検出し、VDRが存在することを確認した (figure 1B)。また免疫染色法では、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を作用させていない条件下で、VDRはTY10の細胞質および細胞境界に発現した (figure 1C)。さらに $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を加えた条件下では、核内でのVDRの染色性が増加した (figure 1D)。

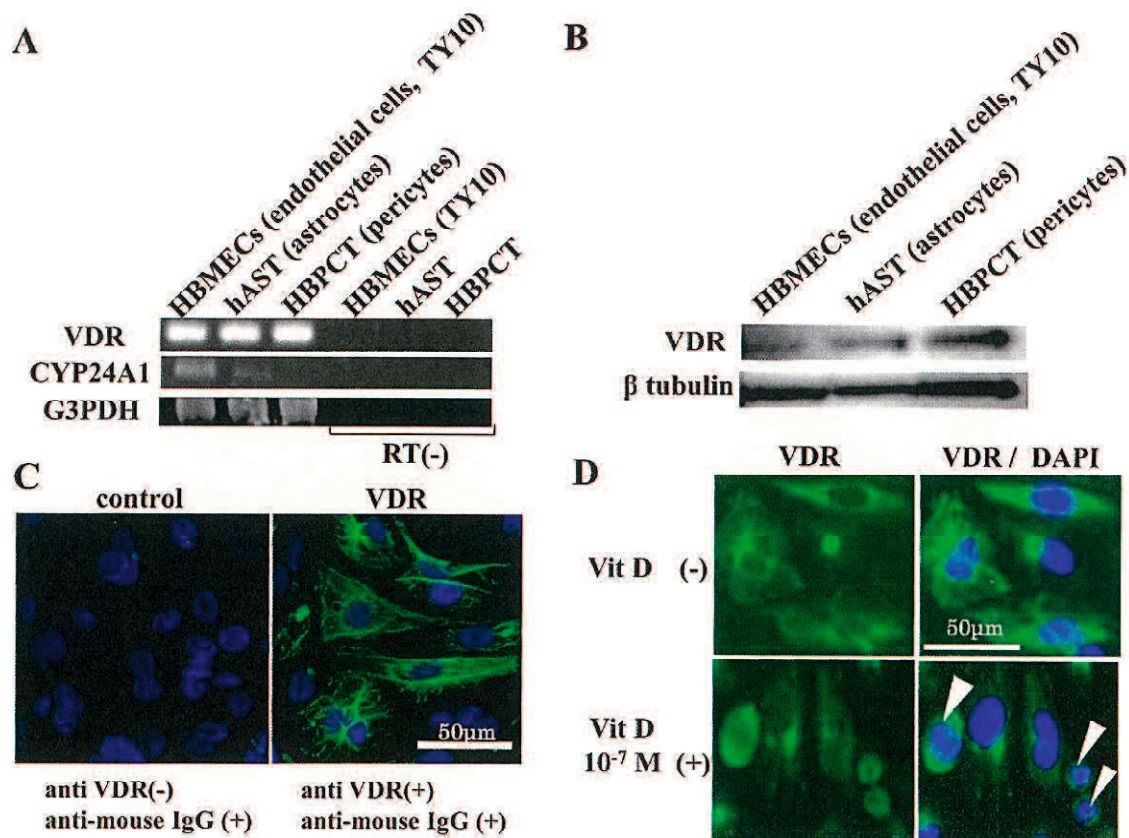


Figure 1

(A) RT-PCRで、HBMECs (細胞名 TY10), hAST, HBPCTにVDRの存在をmRNAレベルで確認した。また、CYP24A1のmRNA発現を、TY10やhASTで認めた。(B) western blot法で、TY10, hAST, HBPCT全ての細胞株由来の蛋白抽出液中に、抗VDR抗体が認識する約50 kDaのバンドを検出した。(C) 免疫染色では、活性型ビタミンDを作用させていない条件下で、VDRはTY10の細胞質および細胞境界に発現した。(D) 活性型ビタミンDを加えた条件下では、TY10核内のVDR (green)の染色性が増加した。

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はTY10のバリア機能を増強する。

次に、TY10細胞に $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を作用させた条件下で、細胞接着因子やtight junction関連蛋白の挙動にどのような変化がみられるかwestern bolt法を用いて解析した。 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は濃度依存性に、ICAM-1の蛋白発現量を減少させ、ZO-1とclaudin-5の蛋白発現量を増加させた (figure 2A-D). 更に、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 10^{-7}M は、電気抵抗値を増強した (figure 2E).

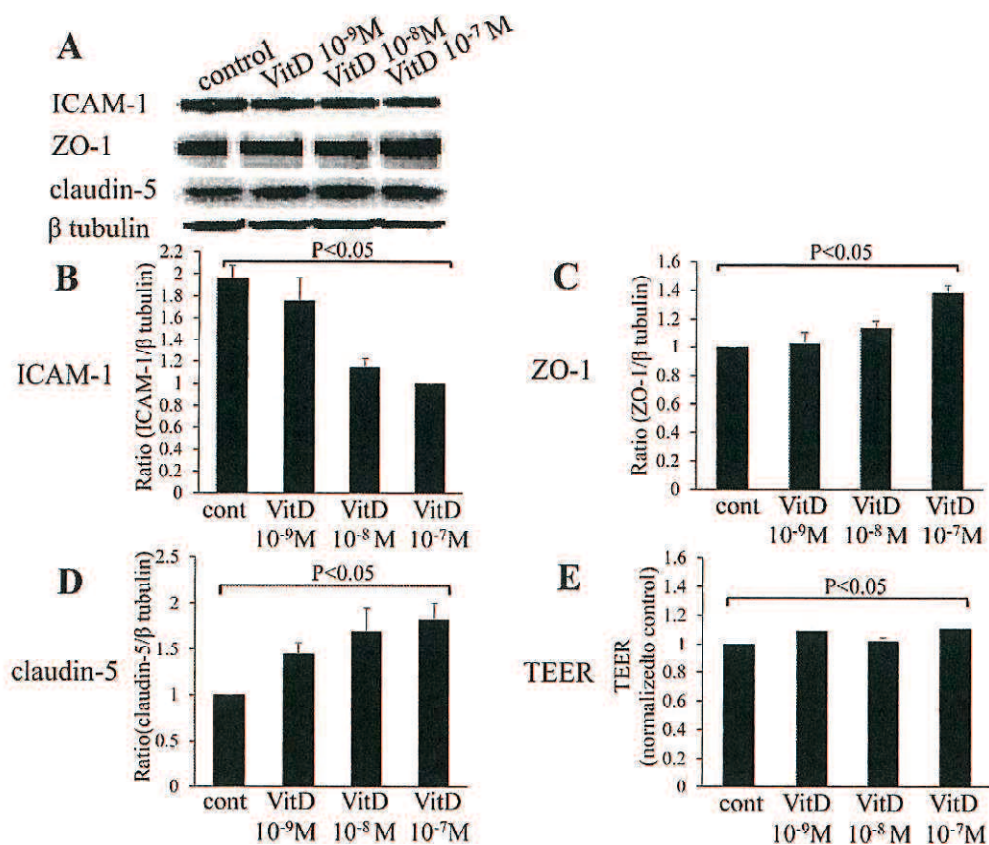


Figure 2

TY10細胞における、細胞接着分子(ICAM-1)とtight junction関連蛋白 (ZO-1, claudin-5)に対する $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (VitD)の効果について確認した。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 \pm SEM, $n=3$)。 (A)(B)(C)(D) $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ は濃度依存性に、ICAM-1の蛋白発現量を減少させ、ZO-1とclaudin-5の蛋白発現量を増加させた(平均 \pm SEM, $n=3$)。 (E) 10^{-7} M $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ はTY10の電気抵抗値を増強した (平均 \pm SEM, $n=3$)。

$1\alpha,25-(OH)_2D_3$ は、 $TNF\alpha$ により障害されたバリア機能の破綻を抑制する。

$TNF\alpha$ の作用により増加したICAM-1と、減少したZO-1, claudin-5は $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (10^{-7} M)を作用させることにより、mRNA, 蛋白レベルでともに有意な改善がみられた (figure 3A-E)。また、 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ (10^{-7} M)は $TNF\alpha$ により減少した電気抵抗値を改善させた (figure 3F)。次にZO-1, claudin-5の細胞内分布を免疫染色法で検討したところ、 $TNF\alpha$ によって細胞間境界のZO-1, claudin-5の染色性は減少したが、 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ により、ZO-1, claudin-5の細胞間境界の分布が回復した (figure 3G)。

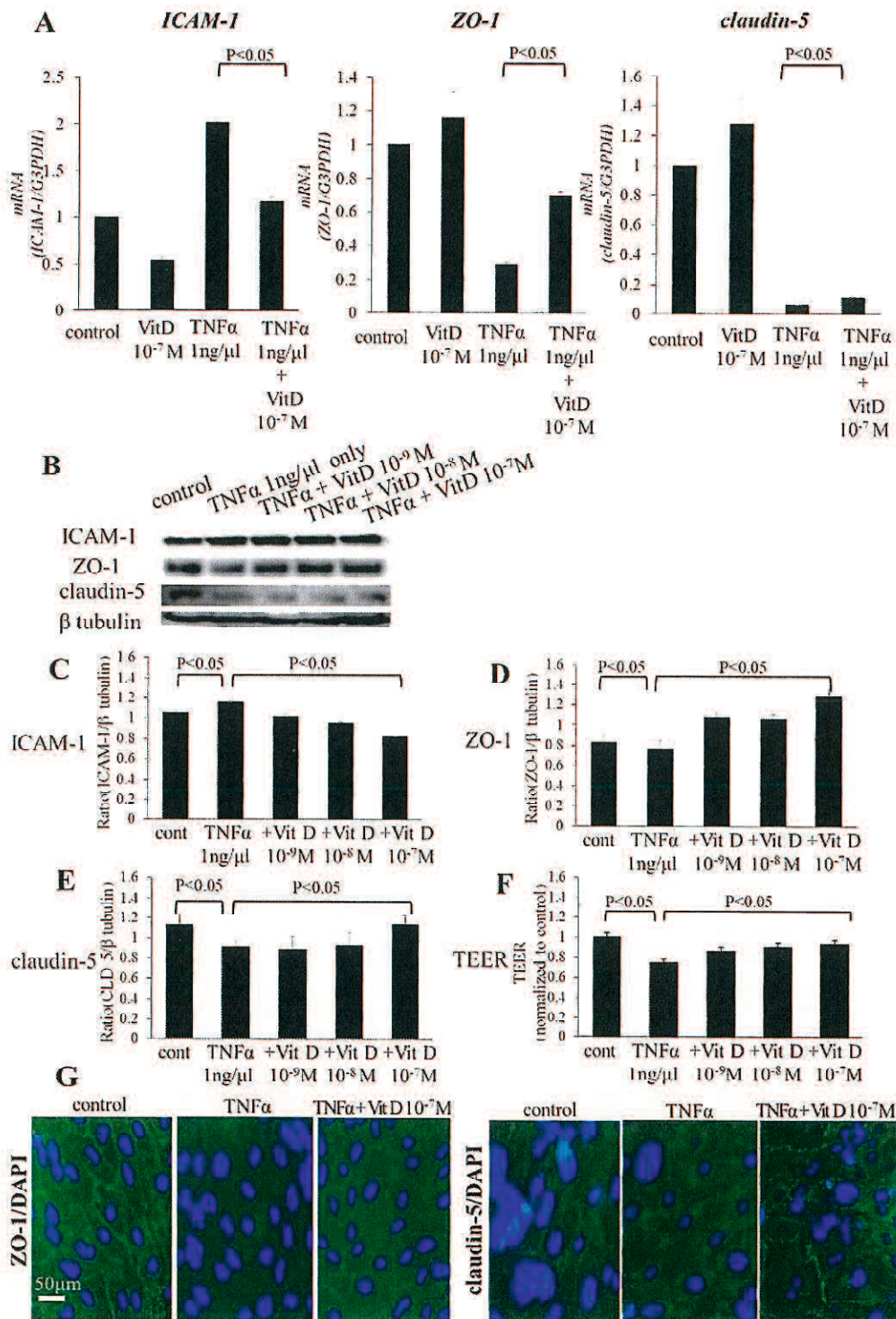


Figure 3

(A) TY10細胞にTNF α を作用させた条件下で、 10^{-7} M $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ がmRNAレベルでICAM-1, ZO-1, claudin-5の発現量に変化があるか解析した。 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ はICAM-1のmRNA発現を減少させ、ZO-1とclaudin-5のmRNA発現を増加させた。(B) TNF α により影響を受けたICAM-1, ZO-1, claudin-

5蛋白に対して、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ が抑制効果を有するかwestern blot法で検討した。(C)(D)(E) $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は、 $\text{TNF}\alpha$ により増加したICAM-1蛋白量を減少させ、低下したZO-1とclaudin-5蛋白量を増加させた。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 \pm SEM, $n=3$) (F) さらに $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は $\text{TNF}\alpha$ により減少した電気抵抗値を改善させた(平均 \pm SEM, $n=3$)。 (G) 免疫染色でZO-1, claudin-5の細胞内分布を検討した。 $\text{TNF}\alpha$ により細胞間境界のZO-1, claudin-5の染色性は減少したが、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を作用させるとZO-1, claudin-5の細胞間境界の分布が回復した (ZO-1, claudin-5:緑, DAPI:青)。

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ は、 $\text{TNF}\alpha$ によるNF κ Bの活性化を抑制する。

NF κ Bは活性化に伴い核内へ移行することが知られている。 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がNF κ Bの活性化を抑制するか否かを免疫染色法で検討した。 $\text{TNF}\alpha$ を作用させるとNF κ Bは活性化されp-NF κ Bとして核内移行し免疫染色で確認できたが、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を加えた条件下では細胞核内にp-NF κ Bは染色されなかった。

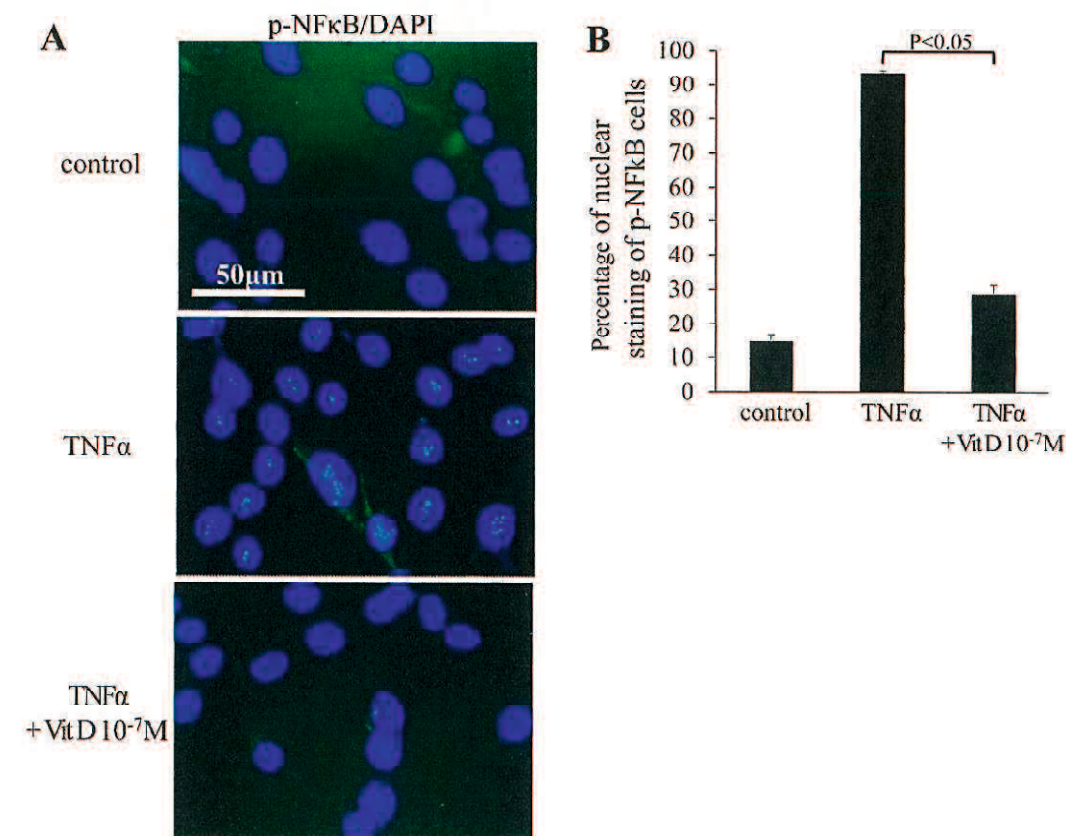


Figure 4

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がNF κ Bの活性化を抑制するか否かを免疫染色法で検討した。(A) $\text{TNF}\alpha$ を作用させるとp-NF κ Bの核内移行が確認できたが、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を加えた条件下では細胞核内への

p-NFκB の移行はみられなかった。(B) p-NFκB の核染色率を棒グラフで示した。1α,25-(OH)₂D₃ を加えた条件下では p-NFκB の核染色率は有意に低下していた。(平均±SEM、n=4)

1α,25-(OH)₂D₃はMS患者血清により生じたバリア機能の破綻を抑制する

次に、1α,25-(OH)₂D₃がMS患者血清 (RRMS-R患者 3名, RRMS-S患者 3名, SPMS患者 3名)によるバリア機能の破綻に対し抑制効果を示すか否かを検討する目的でwestern blot法で解析を行った。MS患者血清と比較するため、negative controlとしてウシ胎児血清、健常者3名で評価した (figure 5A)。その結果、1α,25-(OH)₂D₃は、RRMS-R, RRMS-S, SPMS全ての病型において、VCAM-1とp-NFκBの蛋白量を有意に減少させた。対照的にnegative controlでは、1α,25-(OH)₂D₃の有無にかかわらず、VCAM-1とp-NFκBの蛋白量に変化はなかった (figure 5B, C)。また、RRMS-R患者群では、1α,25-(OH)₂D₃を加えた条件下でZO-1とclaudin-5の蛋白量の有意な増加がみられた (figure 5D, E)。

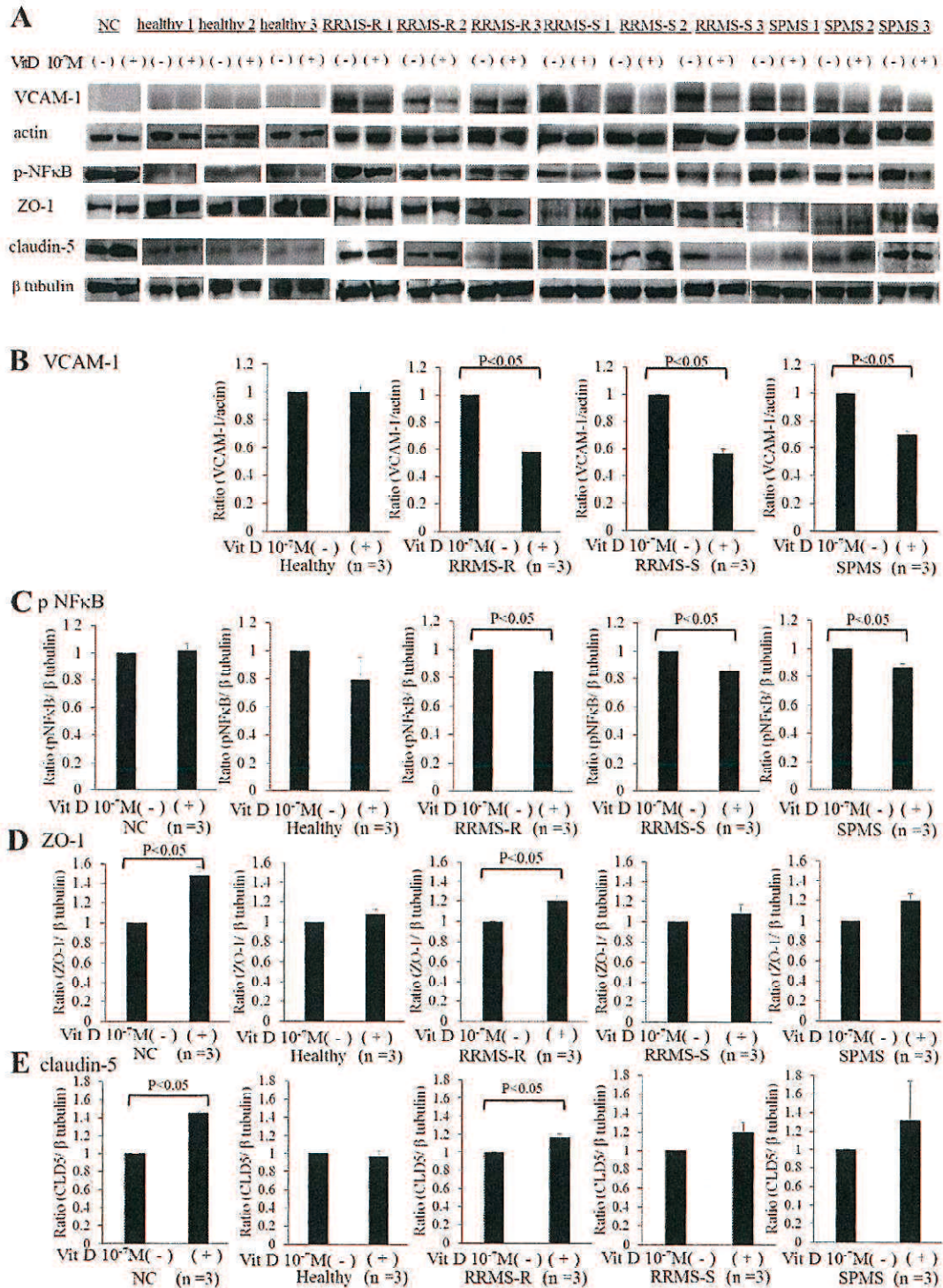


Figure 5

(A) $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がTY10細胞において、ウシ胎児血清、健常者 (3名)、MS患者血清 (RRMS-R患者 3名、RRMS-S患者 3名、SPMS患者 3名)の作用下で細胞接着分子 (VCAM-1)、転写因子 (p-NFκB)、tight junction関連蛋白 (ZO-1、claudin-5)の蛋白発現にどのような影響を及ぼすかwestern blot法で解析を行った。(B)(C)(D)(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, RRMS-R n=3, RRMS-S n=3, SPMS n=3). (B, C)全てのMS患者病型において, $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はVCAM-1とp-NF κ Bの蛋白量を有意に減少させた. (D, E) RRMS-R患者群では, $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を加えた条件下でZO-1とclaudin-5の蛋白量は有意に増加した.

6. 考察

近年, 中枢神経構成細胞におけるビタミンD受容体シグナルの関与について注目されている. 正常ヒト脳組織の神経細胞およびグリア細胞において, VDRと代謝関連酵素の24位水酸化酵素(CYP24A1)および 1α 位水酸化酵素(CYP27B1)の存在が明らかとなった^{18,31}). またMS患者の脳組織では, MRIで異常がみられない白質(normal appearing white matter: NAWM)および慢性活動性病変において, アストロサイトやミクログリアの細胞核と細胞質にVDRが存在していることが報告された³¹). さらに炎症性刺激により, アストロサイトとミクログリア細胞でCYP27B1の発現が増加し, また活動性MS病変ではNAWMと比較してCYP27B1のmRNA発現量が増加することが明らかとなっており, ビタミンDは多発性硬化症の活動性病変に対して内因性に関わっている可能性が推測されている³¹). 今回, 本研究では, ヒト脳微小血管内皮細胞とアストロサイトでのCYP24A1発現が明らかとなったが, ペリサイトではCYP24A1の発現はなかった. 最近, ペリサイトではCYP27B1発現が報告されており³²), BBBを構成する細胞間でビタミンDの代謝経路が異なる可能性が考えられた.

また, ビタミンDの内皮細胞に対する作用について報告が散見されている. Suzukiらは, ヒト冠動脈血管内皮細胞にVDRが存在し, $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がNF κ Bの活性化を阻害すると報告した³³). また, Martinesiらはヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)を用いた実験で, $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がTNF α により増加した細胞接着分子(VCAM-1, ICAM-1)を阻害したと報告している³⁴). 今回我々は, ヒト脳微小血管内皮細胞を含むすべてのBBB構成細胞にVDRが存在し, 活性型ビタミンDがtight junction関連蛋白を増加させ, 細胞接着分子の発現を減少させることでヒトBBB構成内皮細胞に直接的に影響を及ぼすことを初めて証明した. 本研究で内皮細胞に作用させた $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の濃度は $10^{-9}\sim 10^{-7}\text{M}$ であったが, この濃度は, MS患者を対象とした $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ³⁵)や 25-(OH)D ^{36,37})を用いた臨床試験と, 悪性腫瘍(前立腺癌, 胆管癌, 膵臓癌)に対する $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の臨床試験の投与量を参考に決定した³⁸⁻⁴⁰).

本研究ではNFκBは炎症反応を誘導する重要な細胞内伝達シグナルであるが、今回我々は $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ が直接的にp-NFκBの核内移行を阻害することを初めて証明した。さらに、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はVCAM-1とp-NFκBの蛋白発現を減少させることで、再発寛解型MS/二次進行性MS患者血清により生じたBBB破綻を抑制することを明らかにした。これらの結果より $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がNFκBの活性化を直接阻害することで、MS患者血清によるVCAM-1蛋白量増加を抑制したと考えた。

また、本研究では、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 作用下で急性期再発寛解型MS患者血清を作用させると、ZO-1/claudin-5蛋白量の低下を回復させることを示した。再発寛解型MS/二次進行性MSでは、BBBの破綻やBBBでのtight junction関連蛋白の減少がその病因に大きく関与すると考えられている⁴¹⁻⁴³。RRMS,SPMS患者の剖検例での脳標本では、活動性病変ではtight junction関連蛋白(ZO-1, occludin)の減少とVCAM-1の発現が増加していることが述べられている^{41, 42}。さらに当研究室ではこれまでに、MS患者血清を作用させると、単層培養したTY10のclaudin-5蛋白量低下とVCAM-1蛋白量が増加することを報告した²³。さらに、リン酸化fingolimodがBBB構成血管内皮細胞のclaudin-5蛋白量を増加させ、MS患者血清を作用させることで増加するVCAM-1蛋白量を低下させることを報告し、リン酸化fingolimodはBBB構成内皮細胞に直接的に作用し、tight junction関連蛋白の発現増加を介してBBB機能を高め、細胞接着分子の発現低下により病的リンパ球の中樞神経内侵入を抑制することでMSの再発抑制効果を示す可能性を考えた⁴⁴。本研究により、fingolimodと同じく活性型ビタミンDが、BBBを構成する血管内皮細胞に直接作用して、細胞接着分子を減少させ、tight junction関連蛋白を増加させることで、MS患者血清の作用による脳血管内皮細胞のバリア破綻に対して保護効果を認めることが示された。さらに今回の実験では、 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ はmRNAレベルでもclaudin-5やZO-1発現を増加させ、ICAM-1発現を低下させる結果が得られたが、VDREを介してこれら遺伝子の転写促進を生じた可能性が考えられた。近年、MSではBBBが主要な治療標的となりうることで新規生物学的製剤の登場により証明されつつある。ナタリツマブはVLA-4の構成成分である $\alpha 4\beta 1$ インテグリンに対するモノクローナル抗体であり、多発性硬化症に対する良好な再発防止効果が確認されているが、この製剤はVLA-4/VCAM-1を介したリンパ球のBBB血管内皮細胞への通過を阻害する作用を有する。一方で、この薬は強固なVLA-4/VCAM-1阻害作用を有することにより、JCウイルスの再活性化の関与が想定されている進行性多巣性白質脳症の発症が重要な副作用として報告されて

いる。脳内の免疫能に影響を与えることなく安全にVCAM-1を阻害する薬剤として活性型ビタミンDが応用できる可能性があり、併せて、ニューロンやグリア細胞に対する保護作用、免疫調節作用も期待でき、臨床投与での有効性も確認できているため、安全に投与できるMS患者への再発予防薬、進行予防薬として期待できるため、更なる作用メカニズムの解明や大規模臨床研究が今後重要であると考えらる。

7. 結語

活性型ビタミンDは、ヒト脳微小血管内皮細胞に直接作用し、細胞接着分子を減少させ、tight junction関連蛋白を増加させることで、MSにおけるバリア破綻を抑制する可能性があり、活性型ビタミンDは、MSの再発・進行予防の新たな治療標的となる可能性が示された。

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前田敏彦先生、清水文崇先生、佐野泰照先生、実験の遂行・データ分析にご協力いただいた西原秀昭先生、竹下幸男先生、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. 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.
2. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008; 7: 268-277.
3. Niino M, Miyazaki Y, Fukazawa T, et al. Vitamin D and multiple sclerosis in Asians and Caucasians: environmental and genetic aspects. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2013; 4: 59-67.

4. Soilu-Hänninen M, Airas L, Mononen I, et al. 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005; 11: 266-271.
5. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006; 296: 2832-2838.
6. Simpson S Jr, Taylor B, Blizzard L, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010; 68: 193-203.
7. Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, et al. Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010; 67: 618-624.
8. Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, et al. Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012; 79:261-266.
9. Niino M, Fukazawa T, Miyazaki Y, et al. Association of serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2013; 4: 193-200.
10. Niino M: Vitamin D and its immunoregulatory role in multiple sclerosis. *Drugs Today (Barc).* 2010; 46: 279-290.
11. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2010; 9:599-612.
12. Simpson S Jr, Taylor B, Blizzard L, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2010; 68:193-203.
13. Baeke F, Takiishi T, Korf H, et al. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10: 482-496.
14. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 1996; 93: 7861–7864.

15. Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1103–1107

16. Branisteanu DD, Waer M, Sobis H, et al. Prevention of murine experimental allergic encephalomyelitis: cooperative effects of cyclosporine and 1 alpha, 25-(OH)2D3. *J Neuroimmunol.* 1995; 61: 151–160.

17. Eyles D, Almeras L, Benech P, et al. Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103: 538-545.

18. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, et al. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005; 29: 21-30.

19. Smolders J, Moen SM, Damoiseaux J, et al. Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: access and function. *J Neurol Sci.* 2011; 311: 37-43.

20. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, et al. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13: 100–105.

21. Shirazi HA, Rasouli J, Ciric B, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. *Exp Mol Pathol.* 2015; 98(2): 240-245.

22. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res.* 2007; 85(11): 2480-2490.

23. Shimizu F, Tasaki A, Sano Y, et al. Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier. *PLoS One.* 2014; 9: e92872.

24. Won S, Sayeed I, Peterson BL, et al. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. *PLoS One*. 2015; 10: e0122821.
25. 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.
26. 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: 519–528.
27. Sano Y, Kashiwamura Y, Abe M, et al. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passagenumber. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2013; 4:92–103.
28. Toshihiko Maeda, Yasuteru Sano, Masaaki Abe, et al. Establishment and characterization of spinal cord microvascular endothelial cell lines. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2013; 4:326-338.
29. 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; 15: 331(1-2): 136-144.
30. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, et al. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol*. 2008; 217(2): 388-399.
31. Smolders J, Schuurman KG, van Strien ME, Melief J, Hendrickx D, Hol EM, et al. Expression of vitamin D receptor and metabolizing enzymes in multiple sclerosis-affected brain tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013; 72(2): 91-105.

32. Nissou MF, Guttin A, Zenga C, Berger F, Issartel JP, Wion D. Additional clues for a protective role of vitamin D in neurodegenerative diseases: 1,25-dihydroxyvitamin D3 triggers an anti-inflammatory response in brain pericytes. *J Alzheimers Dis.* 2014; 42(3): 789-799.
33. Suzuki Y, Ichiyama T, Ohsaki A, et al. Anti-inflammatory effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in human coronary arterial endothelial cells: Implication for the treatment of Kawasaki disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 113(1-2): 134-138.
34. Martinesi M, Bruni S, Stio M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule expression in endothelial cells. *Cell Biol Int.* 2006; 30(4): 365-375.
35. Wingerchuk DM, Lesaux J, Rice GP, et al. A pilot study of oral calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D3) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005; 76: 1294-1296.
36. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, et al. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(3): 645-651.
37. Sotirchos ES, Bhargava P, Eckstein C, et al. Safety and immunologic effects of high- vs low-dose cholecalciferol in multiple sclerosis. *Neurology.* 2016; 86(4): 382-390.
38. Ben-Eltriki M, Deb S, Guns ES. Calcitriol in Combination Therapy for Prostate Cancer: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions. *J Cancer.* 2016; 7(4): 391-407.
39. Sookprasert A, Pugkhem A, Khuntikeo N, et al. Evaluation of efficacy, safety and tolerability of high dose-intermittent calcitriol supplementation to advanced intrahepatic cholangiocarcinoma patients--a pilot study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13: 161-167.

40. Blanke CD, Beer TM, Todd K, et al. Phase II study of calcitriol-enhanced docetaxel in patients with previously untreated metastatic or locally advanced pancreatic cancer. *Invest New Drugs*. 2009; 27(4): 374-378.
41. Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, et al. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol*. 2003; 201: 319–327.
42. Plumb J, McQuaid S, Mirakhur M, et al. Abnormal endothelial tight junctions in inactive lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2002; 12: 154–169.
43. Leech S, Kirk J, Plumb J, et al. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33: 86– 98.
44. Nishihara H, Shimizu F, Sano Y, et al. Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3):e0121488.