

血液脳関門と血液神経関門構成細胞により産生
されるサイトカイン，ケモカインおよび生理活
性物質の相違についての検討

氏名 大石 真莉子

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31年1月

目次

1.	要旨	3
2.	研究の背景	4
3.	目的	5
4.	方法	6
5.	結果	6
6.	考察	8
7.	結語	11
8.	謝辞	11
9.	参考文献	12

1. 要旨

【背景・目的】血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) および血液神経関門 (blood-nerve barrier : BNB) は、中枢神経系/末梢神経系で特異的なバリアシステムを形成する。BBB内では脳微小血管内皮細胞/ペリサイト/アストロサイトの3者から構成され、BNBでは末梢神経微小血管内皮細胞/ペリサイトの2者から構成される。これら細胞の詳細な細胞生物学相異はいまだ不明である。本研究の目的は、BBBおよびBNBを構成する細胞により産生されるサイトカイン・ケモカイン量を定量化し、それぞれの細胞での発現量を比較した。

【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) , ヒト脳微小血管内皮細胞 (brain nerve microvascular endothelial cells : BMECs) , ヒト末梢神経内膜内微小血管内皮細胞 (peripheral nerve microvascular endothelial cells : PnMECs) , ヒト脳・末梢神経由来ペリサイト, ヒト脳由来アストロサイトを用いて、それぞれの細胞が発現する27種類のサイトカイン/ケモカイン量を、マルチプレックスによるイムノアッセイ法を用いて定量化した。

【結果】塩基性線維芽細胞増殖因子 (Basic fibroblast growth factor : bFGF) およびregulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) はBBBでは主にアストロサイト, BNBでは末梢神経由来ペリサイトにより産生されていた。血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor : VEGF) および10kDaインターフェロン誘導性タンパク質 (IP-10) はアストロサイトによって分泌されていた。IL-18, IL-6, IL-8およびmacrophage chemoattractant protein(MCP) -1は、アストロサイトよりも脳/末梢神経由来ペリサイトにより豊富に産生されていた。BMECは、PnMECやHUVECに比較し、より多くのbFGF, IP-10, RANTES, TNF- α を産生していた。

【結論】末梢神経由来ペリサイトは、脳由来ペリサイトやアストロサイトと同じく、bFGF, RANTESなどのサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を豊富に産生していた。この結果は、BBBで脳由来ペリサイトとアストロサイトの両者がBBB機能を調整する役割を果たしているように、BNBでは末梢神経ペリサイトがBNB機能維持に貢献することを示している。

2. 研究の背景

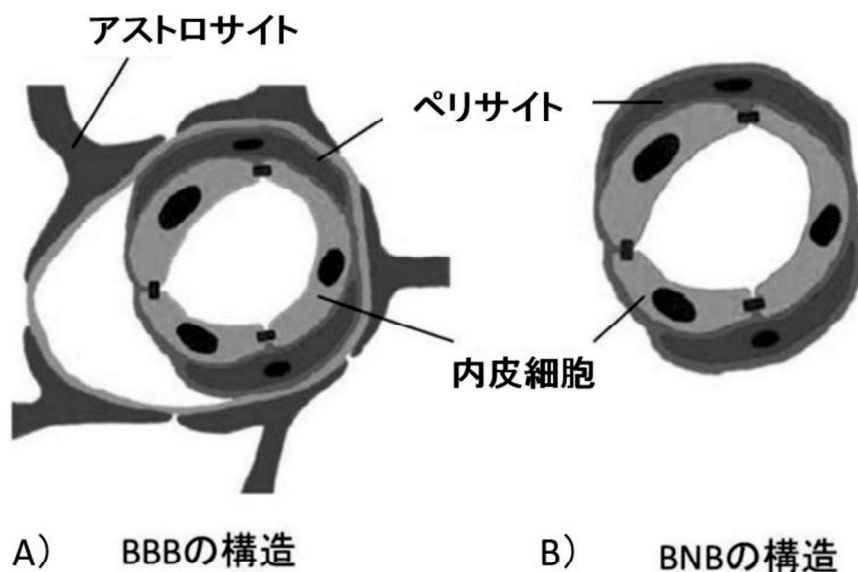
神経系には **blood-neural barrier** と総称される構造物があり、その強固なバリアシステムにより全身の循環系から隔絶されている¹⁾。中枢神経系には血液脳関門 (**blood-brain barrier: BBB**)、血液脊髄関門 (**blood-spinal cord barrier**)、血液脳脊髄液関門などの 3 つのバリアシステムが存在し、中枢神経系の内部環境を維持している。一方、末梢神経系には中枢神経系における BBB に類似したバリアシステムである血液神経関門 (**blood-nerve barrier: BNB**)が存在し、循環血液成分の神経内膜組織への移行を阻んでいる。多くの自己免疫性神経疾患で BBB/BNB 機能の破綻が臨床的に観察されている。多発性硬化症や視神経脊髄炎の発症には BBB 破壊が関与し、ギラン・バレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発神経炎などの自己免疫性末梢神経障害では BNB 破綻が病態発症に密接に関わっていることが明らかとなっている¹⁾。

BBB は中枢神経実質に存在する微小血管に局在し、管腔に面した内層から順に、①脳微小血管内皮細胞 (BMECs)、②ペリサイト、③アストロサイトの 3 種類の細胞と 2 枚の基底膜から構成されている^{2,3)}。隣接する内皮細胞はタイトジャンクションを形成し、物質の自由な往来を制限している(図 1-A)。BNB は血管内と神経内膜組織を隔てる神経内膜内微小血管と神経周膜の最内層の 2 か所に局在する。BNB は①末梢神経微小血管内皮細胞 (PnMECs)、②ペリサイトの 2 種類の細胞から構成され、BBB の基本構造からアストロサイトを除いた構造となっている^{4,5)} (図 1-B)。

BBB では、アストロサイトが TGF- β や bFGF などの生理活性物質を分泌し、内皮細胞のタイトジャンクション蛋白発現や透過性などの BBB 機能に影響を与えることにより、BBB を制御する役割を担っている^{2,3)}。近年では、BBB 制御におけるペリサイトの役割が注目されている。一方で BNB はかつて BBB と比較し、バリア機能は劣ると考えられていたが、近年では BBB とほぼ同等の機能を持つ強固なバリアシステムであると認識されるようになった^{1,7,8)}。血液神経関門由来ペリサイトの役割は全く分かっていなかったが、我々はこれまでに、ヒト血液神経関門由来ペリサイト細胞株樹立に成功し、ペリサイトが bFGF などの生理活性物質を分泌し、BNB バリア機能を高めることを報告した⁹⁾。BBB におけるアストロサイトやペリサイトと同様の役割を、BNB ではペリサイトが果たしている可能性が推測されるが、これらの細胞の詳細な細胞生物学的差異についてはいまだ不明な点が多い。BBB/BNB を構成する細胞の細胞分子生物

学的な相異を理解することは、自己免疫性中枢神経疾患/末梢神経疾患の病態解明や新規治療法開発につながると考えた。

図1



3.目的

BBB/BNBの破綻は様々な神経疾患の病態に重要な役割を果たしているが、BBB/BNB構成細胞の細胞生物学的な特徴は明らかとなっていない。我々はこれまでに、ヒトBBB構成脳微小血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト、ヒトBNB構成末梢神経微小血管内皮細胞、ペリサイトから成る条件的不死化細胞株の樹立に成功し報告した。本研究では、BBB構成細胞株（内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト）、BNB構成細胞株（内皮細胞、ペリサイト）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs）の6つの細胞株での27種類のサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質の発現量を、マルチプレックスイムノアッセイ法を用いて定量比較し、BBB/BNB構成細胞の細胞生物学的特徴を明らかとすることを目的とした。

4. 方法

①細胞株

当科で樹立したヒトBBB/BNB構成細胞株であるBMECs, PnMECs, 脳由来ペリサイト株, 末梢神経由来ペリサイト株, アストロサイト株を用いた^{9,10,11,12}. HUVECは市販の細胞を用いた(タカラバイオ).

②マルチプレックス免疫アッセイ法

37°Cで5日間培養した6つの細胞株からBioplex cell lysis kit (Bio-rad社)を用いて, 蛋白を抽出した. 等量22.5 μ gの蛋白中に含まれる27種類のサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質をBio-Plex[®] ヒトサイトカイン27-plexキットとBio-Plex[®]サイトカイン試薬キット (Bio-Rad社)を用いてマルチプレックス免疫アッセイ法にて分析し, 定量化した. 測定した27種類のサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質は以下の通りである. interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8/IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), VEGF, 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor :G-CSF), 血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor :PDGF)-11, 線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor :FGF)-2, 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor :GM-CSF), 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor:TNF)- α , インターフェロン (IFN)- γ , CCL2/macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1), CCL3/macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), CCL4/MIP-1 β , CCL5/regulated upon activation, CCL11/eotaxin, CXCL10/IP-10, RANTES.

③解析

サイトカイン/ケモカイン/生理活性物質の濃度は, 様々な濃度の標準アッセイから得られた各分子セットについての標準曲線を参照することによって計算した. 統計解析はPrism 7ソフトウェアプログラム (Graph Pad Software)を用いて行い, 個々の群間の一元配置分散分析はTukeyの多重比較検定を用いて行った. 全ての値は平均値 \pm 平均値の標準誤差として示した. 統計学的解析では信頼度を *P<0.001として行った.

5. 結果

表1に、BBB/BNB構成細胞における27個のサイトカイン/ケモカイン/成長因子のプロファイルを示す。

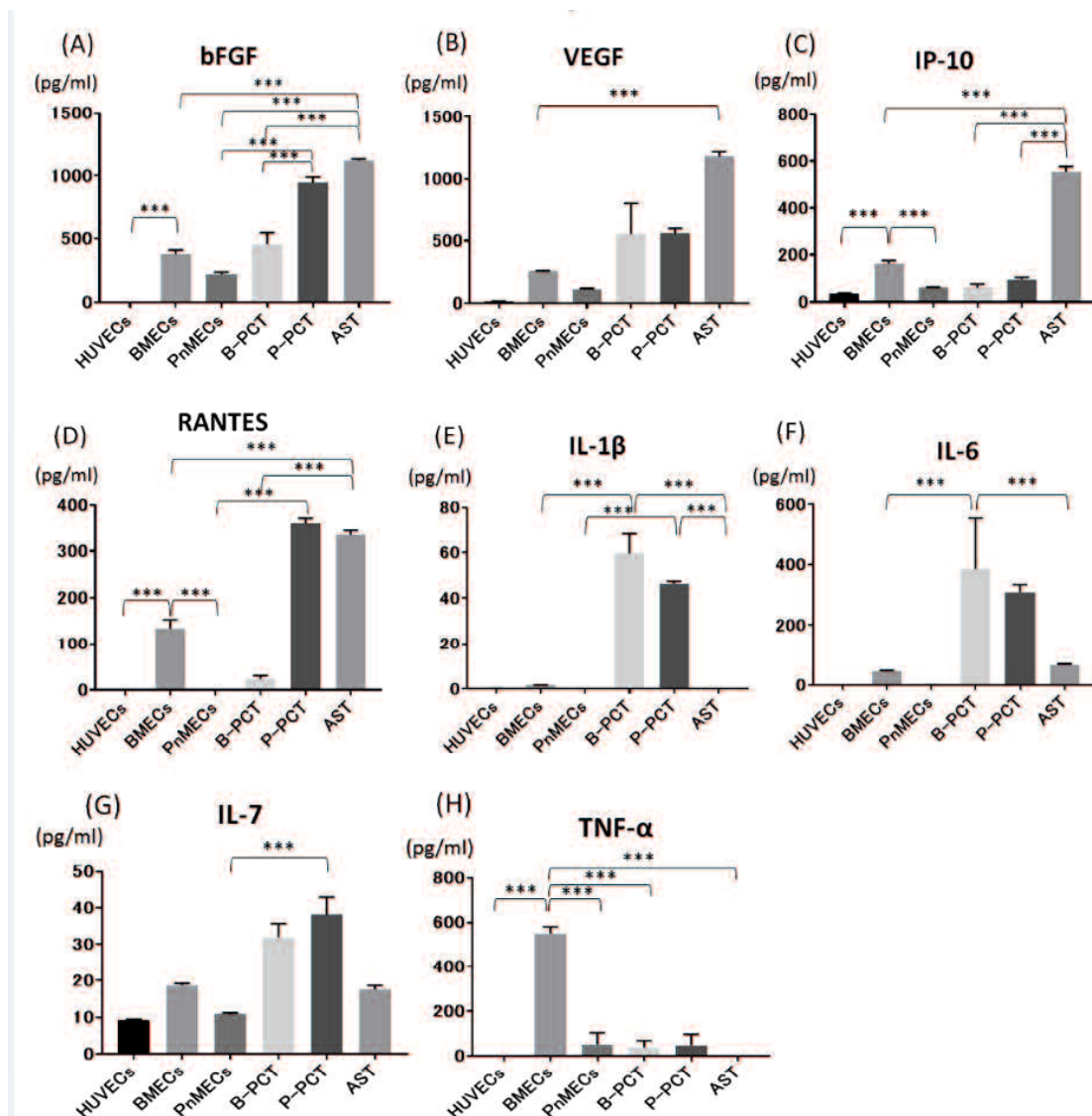
表1

	BMECs (n=4)	PnMECs (n=4)	HUVECs (n=4)	B-PCT (n=4)	P-PCT (n=4)	AST (n=4)
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)	
IL-1 β	1.64 (0.06)	0 (0)	0 (0)	59.5 (18.0)	46.4 (2.3)	0 (0)
IL-1ra	114 (8.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	432 (24)
IL-2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IL-4	0 (0)	0.73 (0.51)	0.05 (0.06)	0.80 (0.92)	1.06 (0.97)	0 (0)
IL-5	1.33 (0.24)	1.29 (0.04)	0.22 (0.24)	0.31 (0.16)	0.19(0.20)	0 (0)
IL-6	45.3 (5.84)	0.42 (0.85)	2.6 (0.32)	385 (339)	309 (50)	65.9 (6.8)
IL-7	18.7 (1.0)	10.8 (0.8)	5.0 (1.5)	31.9 (7.3)	38.1 (9.1)	17.5 (2.2)
IL-8	26.0 (6.4)	5.01 (1.23)	235 (38)	360 (374)	517 (77)	75.4 (10.5)
IL-9	4.81 (2.18)	3.56 (1.22)	0 (0)	3.57 (1.81)	3.71 (0.40)	9.95 (0.50)
IL-10	51.7 (7.6)	0 (0)	0 (0)	42.6 (62.8)	35.5 (21.5)	77.6 (6.5)
IL-12	20.8 (2.0)	1.48 (2.97)	0.71 (0.44)	47.9 (47.8)	47.0 (15.0)	60.0 (8.7)
IL-13	2.30 (0.17)	2.18 (0.33)	2.79 (0.35)	7.67 (1.80)	9.40 (2.14)	1.81 (0.18)
IL-15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IL-17	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Eotaxin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4.63 (0.29)
bFGF	376 (66.1)	218 (36.6)	8.12 (0.72)	455 (182)	949 (84.3)	1119 (30)
G-CSF	467 (42.7)	469 (41.9)	15.4 (10.0)	68.9 (57.2)	453 (76)	362 (7.2)
GM-CSF	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IFN- γ	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IP-10	161 (29)	60.2 (28.3)	34.1 (5.7)	60.2 (31.1)	96.4 (14.1)	553 (47)
MCP-1	21.3 (1.3)	0 (0)	332 (39)	1584 (1210)	1121 (227)	1027 (88)
MIP-1a	2.23 (0.36)	0.18 (0.35)	0.42 (0.85)	0.86 (1.18)	0.64 (1.29)	0 (0)
PDGF-BB	20.8 (4.0)	44.5 (12.6)	13.7 (3.2)	22.6 (6.0)	25.1 (10.8)	9.93 (0.89)
MIP-1b	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RANTES	134 (37)	0 (0)	0 (0)	22.7 (16.3)	361 (426)	336 (20)
TNF- α	550 (61)	52.0 (103)	0 (0)	37.9 (62.2)	48.9 (97.0)	0 (0)
VEGF	256 (9)	114 (11)	16.0 (3.9)	552 (503)	557 (83)	1180 (73)

アストロサイトでのbFGF, RANTESの発現量は、脳由来ペリサイト/BMECsと比較し有意に高かった。また、末梢神経由来ペリサイトのbFGF, RANTESの発現量は、PnMECからの発現量に比べて有意に高かった (図1 A,D) 。 bFGF, RANTESともに末梢神経由来ペリサイトで脳由来ペリサイトと比較し多く発現していた。アストロサイトにおけるVEGF, IP-10の発現量は、脳由来ペリサイトまたはBMECsと比べて有意に高かった (図1B, C) 。 脳由来ペリサイトからのIL-1 β , IL-6の発現量はアストロサイトおよびBMECsからの発現量と比べて有意に高く (図1E, F) , 末梢神経由来ペリサイトにおけるIL-1 β , IL-7の発現量はPnMECよりも有意に高かった。 (図1 E,G) 。 BMECsにおけるbFGF, RANTES, IL-10およびTNF- α のレベルは、HUVECおよび

PnMECからの発現量よりも有意に高かった (図1A,C,D,H) .

図 2



6. 考察

我々の樹立したヒトBBB / BNB構成細胞株を用いて、マルチプレックス蛍光ビーズベースの免疫アッセイ法により27種類のサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を定量化し、どの細胞がこれらの主要なサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質の主な供給源であるかを評価した。我々は以前に、BNBではbFGFを作用させるとPnMECsのバリア機能が増加すること、VEGFを作用さ

せるとバリア機能が弱められることを報告した⁹⁾。本研究では、bFGFがBBBではアストロサイト、BNBではペリサイトによって主に分泌されることを示した。BBBでアストロサイトが担うBBBバリア機能を強化するという役割を、BNBでは末梢神経由来ペリサイトが担っていることが推測された。一方で、BBB機能を弱めるVEGFは、主にアストロサイトによって産生されており、BBBでのバリア調節に対するアストロサイトの重要な役割を反映していると考えられる²⁾。

ペリサイトは、内皮細胞に接してすぐ外側に基底膜を介して位置する不整形、多角形の細胞であり、内皮細胞に極めて近接した位置関係にある。ペリサイトがパラクラインに放出する様々な栄養因子、生理活性物質が内皮細胞機能に大きな影響を与えることが近年報告されており、BBB/BNBでもペリサイトがバリア機能維持に大きな影響を及ぼすことが相次いで報告されている^{13,14)}。ペリサイトは全て臓器の末梢血管の血管壁に存在しているが、その数や役割は臓器により異なる。一般臓器である筋肉や肺の毛細血管での内皮細胞：ペリサイトの比率が10～100:1であるのに対して中枢神経では1～4:1と高く、中枢神経ではペリサイトの数が多いことが知られている¹⁵⁾。発生生物学的なペリサイトの起源は臓器ごとに異なり、脳のペリサイトは神経提細胞から由来するが、肺や肝臓、腸管のペリサイトは中胚葉から由来することが知られている¹⁶⁾。近年、骨髄内にある細胞がTGF- β の刺激によりペリサイトに分化し脳のBBBを構成する微小血管にペリサイトとして局在することが報告された¹⁷⁾。骨髄由来のペリサイトが末梢神経のBNB構成血管に局在するかは現在のところは分かっていない。これらの知見はBBBとBNBでのペリサイトの細胞学的な相異を理解する上で重要である。

TNF- α およびIL-1 β は炎症性サイトカインであり、BBBのバリア透過性を増大させることが知られている^{18,19)}。これらのサイトカインは、BBBでは内皮細胞またはアストロサイトによって分泌されることが報告されている^{20,21)}。本研究で得られた結果から、TNF- α は主にBMECsによって産生され、IL-1 β は脳/末梢神経由来ペリサイトによって主に分泌されていた。さらに、IL-6は炎症性サイトカインであり、これまではアストロサイトが主に発現すると考えられてきたが、我々の研究では生理的条件化では主に脳由来のペリサイトによって産生されることが明らかとなった^{2,12)}。これらのサイトカイン (TNF- α , IL-1 β およびIL-6) に対するモノクローナル抗体は現在いくつかの自己免疫疾

患の治療に使用されている²²⁾。しかし、中枢神経自己免疫疾患に対するこれらのモノクローナル抗体を用いた治療は、高分子であるモノクローナル抗体がBBBを通過できないため中枢神経に到達できないため、十分な有効性が示せていないことが問題となっている。今回の我々の研究から、生理的条件下では末梢循環から投与されたIL-1 β およびIL-6に対するモノクローナル抗体は内皮細胞を超えて、その標的であるIL-1 β とIL-6を主に産生するペリサイトにまで直接到達することはできないと考えられた。一方で、TNF- α モノクローナル抗体はTNF- α の主要な供給源であるBMECsに直接作用することが可能であり、末梢循環からの投与でその治療効果が期待できると推測される。

IP-10およびRANTESは、単球やリンパ球のBBB血管内皮を超えた遊走に関与している^{21,24,25)}。RANTESは一般的にはT細胞・血小板・マクロファージ・内皮細胞などから分泌され、CCR1/CCR3/CCR5受容体を介してT細胞・単球を活性化し遊走を促進させる。我々の研究では、IP-10は主にアストロサイトによって分泌され、RANTESは主にアストロサイトと末梢神経由来ペリサイトによって産生されることが明らかとなった。これらの結果はBBBではアストロサイト、BNBではペリサイトがリンパ球の活性化を促す役割を果たすことを示している。一方で、IL-7はB細胞およびT細胞の成熟に関与する重要なサイトカインである²⁶⁾。今回の研究で、IL-7は末梢神経由来ペリサイトによって主に産生されることが明らかとなったが、BNB機能にどのような影響を与えるかは解明されておらず、今後の検討が必要である。

BMECsにおけるbFGF、RANTES、IP-10の発現は他の内皮細胞(HUVECs/PnMECs)よりも高かった。BMECsにより分泌されたbFGFは、そのままBMECsに作用することによりBBB機能を維持していると考えられた。また、BMECsから産生されるRANTES、IP-10はBBBを超えたT細胞の脳内侵入を効率的に阻害するBBB特異抗体開発の標的の候補となり得ると考えられた。

今回の研究では、非刺激条件化での細胞間のサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質の発現差を比べたものであるため、lipopolysaccharide (LPS) やIFN- γ 刺激下でどの細胞がサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を産生するかは明らかとなっていない。我々は、最近、① 中枢神経自己免疫性疾患である視神経脊髄炎患者血清をBMECsに作用させるとBMECsからIP-10産生が増加すること、② 自己免疫性末梢神経疾患である慢性炎症性脱髄性多発ニューロパ

チー(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP)患者, とくに非典型的CIDPであるmultifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM)血清をPnMECsに作用させると, PnMECsから放出されるIP-10が増加することを報告した^{26,27}). 炎症性サイトカイン/患者血清などの刺激因子を作用させた後に, BBB/BNB構成細胞から放出されるサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質がどのように変化するかを知ることは, 病的状態でのこれらの物質の役割を理解する上で重要であるため, 今後の検討が必要である.

本研究から, BNBでは末梢神経由来ペリサイトがBNB機能を調節する重要なサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を分泌し, BBBでアストロサイトと脳由来ペリサイトの両者が担うBBB機能を調整する役割を一手に引き受けていると推測された. 更に, BBB/BNBを構成するそれぞれの細胞が, どのサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を主に分泌するかを理解することは, 新規の分子/細胞特異的標的生物学的薬剤の開発のための基礎的知識として重要であると考えられた.

7. 結語

末梢神経由来ペリサイトは, 脳由来ペリサイトやアストロサイトと同じく, IL-1 β , RANTES, bFGFなどのサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を豊富に産生していた. この結果は, BBBで脳由来ペリサイトとアストロサイトの両者がBBB機能を調整する役割を果たしているように, BNBでは末梢神経ペリサイトがBNB機能維持に貢献する可能性を示している.

IP-10およびRANTESは, BBB血管内皮に多く発現しているため, これらの物質に対するモノクローナル抗体を投与することでBBBを超えた脳内への炎症細胞侵入を阻害することができる可能性がある. BBB/BNBを構成するそれぞれの細胞が, どのサイトカイン/ケモカイン/生理活性物質を主に分泌するかを理解することは, 新規の分子/細胞特異的標的生物学的薬剤の開発のために重要である.

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御尽力頂いた清水文崇先生, 佐野泰照先生, ご指導ご鞭撻頂き, 論文作成に御尽力頂いた神田 隆先

生に深謝いたします。

9. 参考文献

1. 神田 隆.序-血液脳関門の基礎知識.*Brain Nerve* 2013;65:117-20.
2. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 2013; 19: 1584-96.
3. Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev* 2012; 248: 228-39.
4. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 208-12.
5. Weerasuriya A, Mizisin AP. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 2011; 686: 149-73.
6. Poduslo J, Curran G, Berg C. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5705-9.
7. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1398-405.
8. Sá-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol* 2012; 45: 327-47.

9. Shimizu F, Sano Y, Abe MA, et al. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 2011; 226: 255-66.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97: 512-23.
14. Armulik A, Genové G, Mäe M et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010; 468: 557-61.
15. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 2005; 7: 452-64.
16. Yamazaki T, Mukoyama YS. Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes. *Front Cardiovasc Med* 2018; 5: 78

17. Yamazaki T, Nalbandian A, Uchida Y, et al. Tissue Myeloid Progenitors Differentiate into Pericytes through TGF- β Signaling in Developing Skin Vasculature. *Cell Rep*. 2017; 18: 2991-3004.
18. Kitic M, Hochmeister S, Wimmer I, et al. Intrastratial injection of interleukin-1 beta triggers the formation of neuromyelitis optica-like lesions in NMO-IgG seropositive rats. *Acta Neuropathol Commun* 2013; 1: 5.
19. Rochfort KD, Cummins PM. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium. *Microvasc Res* 2015; 100: 48-53.
20. Kia A, McAvoy K, Krishnamurthy K, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha. *Glia* 2018; 66: 1016-1033.
21. Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, et al. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 2006; 20: 449-55.
22. Noack M, Miossec P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017; 39: 365-83.
23. Zhang Y, Gao Z, Wang D, et al. Accumulation of natural killer cells in ischemic brain tissues and the chemotactic effect of IP-10. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 79.
24. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, et al. CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic

CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001; 166: 7617-7624.

25. Louboutin JP, Chekmasova A, Marusich E, et al. Role of CCR5 and its ligands in the control of vascular inflammation and leukocyte recruitment required for acute excitotoxic seizure induction and neural damage. *FASEB J* 2011; 25: 737-753.
26. Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol* 2012; 24: 175-89.
27. 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.
28. Shimizu F, Oishi M, Sawai S, et al. Increased IP-10 production by blood-nerve barrier in multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy and multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Dec 6. pii: jnnp-2018-319270.

尚、本論文は下記雑誌にアクセプトされた論文を和訳したものであり、*Clinical and Experimental Neuroimmunology* 誌から学位論文としての投稿を許可されている。

Oishi M, Shimizu F, Sano Y, et al. Difference in cytokines, chemokines and growth factors produced by blood-brain barrier and blood-nerve barrier-composing cells. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2019. doi: 10.1111/cen3.12507