

学位論文（博士）

New BBB Model Reveals That IL-6 Blockade
Suppressed the BBB Disorder, Preventing
Onset of NMOSD

（新規 BBB モデルを用いた，IL-6 受容体阻害薬の BBB
破綻抑制と NMOSD 再発予防効果の検討）

氏名 藤川 晋

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

臨床神経学講座

令和 4 年 1 月

目 次

1. 緒言	1
2. 要旨	7
3. 目的	8
4. 材料・方法	8
5. 結果	13
6. 考察	26
7. 結語	30
8. 謝辞	30
9. 参考文献	31

緒言

NMOSD と AQP4 抗体

Devic は、1894 年に視神経炎と横断性脊髄炎を呈した 45 歳女性例を、視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica, NMO) として報告した (Devic, 1894) . 欧米では、NMO は Devic 病とも呼ばれ、その名の通り視神経と脊髄に病変の主座を有する中枢性炎症性疾患という独立した疾患群としてとらえられてきた。本邦では、長らく NMO は、「視神経脊髄型の多発性硬化症」という多発性硬化症の一亜型として扱われ、これらの症例では、一般的な多発性硬化症と比較して、再発頻度が高いうえに神経障害がより高度で、一度の再発で失明や対麻痺に至るなど、生涯にわたって著しい ADL の低下に苛まれる患者が少なくないことが指摘されていた (Kira, 2003) . 2004 年に Lennon らは NMO 患者に特異的にみられる抗体 NMO-IgG を発見し、NMO-IgG は「視神経脊髄型の多発性硬化症」として分類されていた患者群にも特異的に検出されることから (Lennon et al., 2004) , 「視神経脊髄型の多発性硬化症」は NMO (Devic 病) と同一のものとして理解されるようになった。また、NMO-IgG に定義づけられる疾患群として NMO spectrum disorders (NMOSD) という疾患概念が提唱された (Wingerchuk et al., 2007) . NMO-IgG の標的抗原としてアストロサイトの足突起に高発現する aquaporin-4 (AQP4) が同定され (Lennon et al, 2005) , NMOSD の病態は AQP4 抗体による補体介在性のアストロサイト傷害であることが種々の報告によって示された (Zhang et al, 2011; Hinson et al., 2012; Roemer et al., 2007; Misu et al., 2007; Misu et al., 2009; Bradl et al., 2009) . NMOSD が多発性硬化症と区別されたことによって、NMOSD の再発予防としては、NMOSD に無効または有害である多発性硬化症の疾患修飾薬 (Shimizu et al., 2010; Kira et al., 2014) ではなく、自己免疫疾患一般に広く用いられる経口副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤の使用が標準化した。しかし、副腎皮質ステロイドや免疫抑制剤使用下でも再発し重度の後遺症を残す例が少なくないことや、長期間の副腎皮質ステロイド投与に伴う有害事象といった問題があり、NMOSD の病態に着目した新規治療薬の開発が求められてきた。

NMOSD 治療薬としての IL-6 阻害薬：IL-6 によるプラズマブラストからの AQP4 抗体 産生抑制

Chihara らは、AQP4 抗体の産生細胞が末梢血のプラズマブラストであることを見出し、Interleukin-6 (IL-6) がプラズマブラストを活性化し AQP4 抗体の産生を誘導することから、IL-6 阻害薬が AQP4 産生誘導を抑制する NMOSD 治療薬となる可能性を指摘した (Chihara et al., 2011) . NMOSD 患者では、多発性硬化症や非炎症性神経疾患と比較して、脳脊髄液、血清中の IL-6 濃度が高いことから (Matsushita et al., 2013; Uzawa et al., 2009; Uzawa et al., 2010) , NMOSD の病態に IL-6 シグナリングが深く関わっていることが示唆され、臨床研究においても IL-6 抗体製剤が NMOSD の治療に有効であることが示されてきた (Araki et al., 2014; Ayzenberg et al., 2013) . 2020 年 8 月に本邦で上市された NMOSD の再発予防薬サトラリズマブは、近年開発された IL-6 受容体に対するヒト化免疫グロブリン 2 モノクローナル抗体であり、膜結合型と可溶性のいずれの IL-6 受容体に対しても特異的に結合し、IL-6 のシグナル伝達経路を特異的に阻害する (Reichert, 2017) . サトラリズマブはアミノ酸配列の改変が施されることで、抗原と結合して細胞内に取り込まれた後に抗原から解離し、胎児性 Fc γ 受容体に強く結合してエンドソームでの分解を免れ、再び血中で標的抗原に結合できるという「リサイクリング抗体」としての特性が付与されている (Igawa et al., 2010a; Igawa et al., 2010b) . 既存治療薬との併用で行われた第 III 相二重盲検プラセボ対照比較試験および単剤投与で行われた第 III 相二重盲検プラセボ対照比較試験で、サトラリズマブはプラセボ群に比較して優れた再発リスク減少効果を示した (Yamamura et al., 2019; Traboulsee et al., 2020) . サトラリズマブは NMOSD の病態に着目して開発された再発予防薬であり、古典的治療の問題点を克服できる可能性がある薬剤としての期待を受けて盛んに臨床応用されつつある.

NMOSD における IL-6 による BBB 破綻

末梢血のプラズマブラストから産生された AQP4 抗体が中枢神経のアストロサイトを傷害して NMOSD を発症させるためには、AQP4 抗体が血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を通過する必要がある。すなわち、BBB の破綻によって、自己抗体を含む液性因子の流入が生じる過程こそ、NMOSD 発症の重要な段階であると我々の研究室では考えてきた。NMOSD 患者では、BBB の透過性の指標であるアルブミンの脳脊髄液/血清比が脳脊髄液中の IL-6 濃度に相関する (Uchida et al., 2017)。また、IL-6 は血管内皮細胞の密着結合蛋白の発現を用量依存的に減少させ、ヒト脳微小血管血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells, hEC) の透過性を亢進させる (Rochfort et al., 2014)。これらの事実は、NMOSD では BBB の破綻に IL-6 が関与していることを示唆するものであった。我々の研究室は、AQP4 を発現させたヒトアストロサイト細胞株 (human astrocytes, hAST) を用いた検討で、NMO-IgG がアストロサイト上の AQP4 に作用することでアストロサイトからの IL-6 産生を誘導し、BBB 機能を減弱して白血球の浸潤を増加させることを明らかにした (Takeshita et al., 2017)。そこで我々は、サトラリズマブは、IL-6 による末梢血中のプラズマブラストからの AQP4 抗体産生誘導を阻害するだけでなく、中枢神経のアストロサイトから産生される IL-6 が引き起こす BBB 破綻に対して抑制効果を発揮することで、NMOSD 発症予防効果をもたらすのではないかと着想した。

理想的 BBB モデル

NMOSD での BBB の破綻機構におけるサトラリズマブの治療メカニズムは未知のままである。その理由として、これまで NMOSD の病態の精査を可能とする理想的な *in vitro* BBB モデルが存在しなかったことが挙げられる。BBB は血管内皮細胞間の密着結合のみによって成立しているのではなく、血管内皮細胞に近接したペリサイト、アストロサイトといった BBB 構成細胞間の相互作用や (Choi et al., 2008)、循環血の血管内皮細胞へ流速負荷が (Tarbell, JM. 2020)、BBB 機能に影響を与えている。したがって、理想的な BBB モデル

は、血管内皮細胞だけでは成立し得ず、上述のようなヒト BBB の生理環境を再現し、なおかつ実験装置としての有用性・利便性を兼ね備えている必要がある。我々の研究室では理想的な BBB モデルが有すべき特性として以下の 4 点が必要と考えた (Takeshita et al., 2012) . 1) BBB 機能を恒常的に保持したヒト由来の BBB 構成細胞を使用していること. 2) 血管内皮細胞がペリサイトおよびアストロサイトの足突起と直接的に接触していること. 3) 生理的な流速負荷が再現できること. 4) BBB モデルを通過した白血球を回収しさらなる分析に用いることが可能なこと. 我々は、これらの特性を有する *in vitro* BBB モデルを作製するために、温度感受性 SV40 (simian virus 40) ラージ T 抗原遺伝子の導入によって温度条件的不死化細胞とした、hEC (TY-10) , AQP4 を発現した hAST, ヒトペリサイト株 (human pericytes, hPCT) を用い、これらの細胞は、形態学および生理学的に BBB の特性を有することを確認した (Sano et al., 2010; Shimizu et al., 2013; Haruki et al., 2013; Shimizu et al., 2008) . 既に我々の研究室は、hEC と hAST を用いた生理的流速負荷型 *ex vivo* BBB モデルを構築し、血管内皮に対する生理的血流負荷を再現した条件下で白血球の血管内皮通過を評価することに成功した (Man et al., 2012; Takeshita et al., 2014; Takeshita et al., 2016) . しかしながら、ペリサイトとアストロサイトの足突起の両者が血管内皮細胞に直接接触する状態で共培養した理想的な *in vitro, ex vivo* BBB モデルは存在しなかった。そのため、NMOSD の病態解明を目的として、BBB のバリア機能、白血球の血管外浸潤と脳内への移行を評価することはこれまで不可能であった。

本研究で行った検討

本研究において我々は、新たに確立した 3 層共培養系を用いて、静的 *in vitro* BBB モデルおよび流速負荷型 *ex vivo* BBB モデルを構築した。静的 *in vitro* BBB モデルでは、血管内皮を介した電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) と BBB を介した IgG の移行量の測定を可能とした。流速負荷型 *ex vivo* BBB モデルでは、白血球の migration を評価することを可能とした。本研究ではこれらの BBB モデルを用いて、NMO-IgG による BBB 破

綻に対するサトラリズマブの効果を検証した。加えて、中枢神経自己免疫疾患のモデル動物として用いられ、脊髄中の IL-6 が著明に増加していることが知られている実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE）動物（Serizawa et al., 2018）を用いて、マウス IL-6 受容体抗体（MR16-1）が *in vivo* における BBB 破綻に与える影響を評価した。

要旨

新規ヒト *in vitro* および *ex vivo* BBB モデル、*in vivo* モデルを用いて、NMOSD の病態生理とサトラリズマブの作用機序を、BBB 破綻の点から検討した。血管内皮細胞に対するペリサイトおよびアストロサイトの足突起の接触を再現した 3 層共培養系を構築し、これを用いて静的 *in vitro* モデルおよび流速負荷型 *ex vivo* モデルを作製した。これらの BBB モデルを使用し、バリア機能の持続測定、白血球の migration, NMO-IgG とサトラリズマブの BBB 透過性を評価した。*In vivo* 研究では、脊髄中で IL-6 が著増する EAE マウスの *in vivo* での BBB 破綻に対して、マウス IL-6 受容体抗体 MR16-1 が与える効果を評価した。*In vitro* および *ex vivo* での実験では、NMO-IgG がサトラリズマブおよび NMO-IgG の脳内透過性を亢進させること、サトラリズマブが NMO-IgG が誘導する T 細胞の migration と BBB 破綻を抑制することが示された。*In vivo* 研究では、IL-6 シグナル伝達の阻害によって、T 細胞の脊髄への浸潤が抑制され、脊髄炎の発症が抑えられた。これらの結果から以下のことが示された。（1）我々が作製した、3 層共培養による *in vitro* および *ex vivo* BBB モデルは、バリア機能、白血球の migration, 脳内移行性を評価するために理想的な BBB モデルである。（2）NMO-IgG は、バリア機能の減弱によって NMO-IgG 自身の透過性を亢進し、アストロサイトからの IL-6 分泌を誘導し、さらなるバリア機能の障害と細胞浸潤の制御破綻を引き起こす。（3）サトラリズマブは、NMO-IgG の共存下で BBB 通過が容易となり、BBB 機能障害と炎症細胞浸潤を抑制する結果、NMOSD の発症を予防する。

目的

新たに確立した BBB モデルを用いて、NMO-IgG による BBB 破綻に対するサトラリズマブの効果を検証すること、加えて、実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE）動物を用いて、IL-6 受容体抗体（MR16-1）が *in vivo* における BBB 破綻に与える影響を評価することを目的とした。

材料・方法

1. 被験者

全ての研究プロトコルは、山口大学医学系研究科および中外製薬の倫理委員会の承認を受けた。血液の供与者からは事前に同意を得た。

2. NMO-IgG, 対照 IgG, サトラリズマブ

NMOSD 患者 10 例のプール血清から単離した IgG 分画を NMO-IgG とした。対照 IgG は山口大学医学系研究科の健常人のプール血清から単離した。両者の IgG はプロテイン G を用いて精製した。AQP4 抗体および GRP78 抗体は NMO-IgG から検出されたが対照 IgG にはみられなかった。サトラリズマブは中外製薬で合成した。NMO-IgG, 対照 IgG, サトラリズマブは最終濃度が 100 μ g/ml となるように使用した。

3. 細胞培養

過去に我々の研究室で温度感受性 SV40 ラージ T 抗原をコードするプラスミドのトランスフェクションによって不死化した温度感受性不死化細胞株 hEC, hAST, hPCT を用いた（Sano et al., 2010; Shimizu et al., 2013; Haruki et al., 2013; Shimizu et al., 2008）。hEC, hAST は既報告の方法に従って培養した（Takeshita et al., 2014）。hPCT は、10% (v/v) の非働化ウシ胎児血清と抗菌薬（100 UI/mL ペニシリン G, 100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン）を

添加した Dullbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL) を培地とした。共培養の培地は Astrocyte medium を用いた。

4. 3層培養系

細胞培養挿入シート (Corning Life Science, Tewksbury, MA) の多孔質膜 (3 μ m 径) の管腔側に hPCT を、反管腔側に hAST を培養した。hEC は UpCell™ ディッシュ (Thermo Fisher Science, Waltham, MA) 表面に培養した。UpCell™ 表面に固定化された温度応答性ポリマーは 32°C を境に疎水性の細胞接着表面から親水性の細胞遊離表面となることから、環境温度を 20°C にすることにより、コンフルエントに培養された細胞と細胞外マトリクスをシート状のまま回収した。シート状に回収された hEC を、細胞培養挿入シートに hAST と共培養された hPCT の上に移した。

5. cellZscope を用いた TEER のリアルタイム測定

3層培養挿入シートを自動細胞モニタリングシステム cellZscope (CellSeed Inc., Tokyo, Japan) に装着した。血管 (hEC) 側または脳実質 (hAST) 側に、サトラリズマブと NMO-IgG または対照 IgG を加えた後、cellZscope を用いて毎分毎の TEER を 96 時間測定した。

6. migration 測定

ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) の流速負荷条件下での migration 測定には、3D BioFlux flow chamber device を用いた (Fluxion Bioscience, San Diego, CA) (Takeshita, et al., 2014)。メンブレンを通過した PBMC は血球計算板を用いて定量した後、フローサイトメーターで定量した移行細胞数によって正規化した。細胞を回収し室温下で 1% paraformaldehyde によって 10 分間固定した後に、0.1mM ethylenediaminetetraacetic acid を含むリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、マウス IgG でブロッキングした。回収した細胞を anti-human CD45 eFluor450, CD8a APC-eFluor780

(eBioscience, San Diego, CA) , CD3A-Ilexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, CA) , CD19BV711, CD4 PE-CF594 (BD Biosciences) でラベルした. BD FACSCantoII (BD Biosciences) を用いてデータを収集し, FlowJo software (v.10.4.1; Treestar, Ashland, OR) で分析した.

7. 赤外線イメージングシステムによる移行 IgG 測定

対照 IgG とサトラリズマブを, メーカーのプロトコールに従って IRDye 800CW protein (IRDye 800CW Protein Labeling Kit; LI-COR, Lincoln, NE) でラベルした. 3 層培養インサートの hEC 側に, ラベルされた対照 IgG またはサトラリズマブを添加した後, チャンバーに移行した微量 IgG を Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) で測定することで, 既報告の方法に従って BBB 透過係数 (apparent permeability coefficient, Papp; mm/秒) を計算した (Takeshita et al., 2014) .

8. 分光光度計による移行 IgG の測定

3 層培養インサートの hEC 側に, NMO-IgG または対照 IgG を添加し 12 時間インキュベートした. Easy-Titer Antibody Assay Kit (Thermo) のマニュアルに従って, anti-human IgG でコートされたビーズをウェルの底側に加えて 60 分間インキュベートした. ウェルの底側に累積した IgG を分光光度計で測定した. 移行した IgG の総量は, 対照 IgG を 1 として正規化した.

9. Enzyme-linked immunosorbent assay による移行サトラリズマブの測定

3 層培養インサートの hEC 側に, サトラリズマブと NMO-IgG またはサトラリズマブと対照 IgG を加え 24 時間インキュベートした後, チャンバーに移行したサトラリズマブ濃度を, サトラリズマブ抗体を用いた Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって測

定した。移行したサトラリズマブの総量は、対照 IgG とサトラリズマブを加えた場合を 1 として正規化した。

10. EAE マウスの実験デザイン

雌 C57BL/6J マウス（7 週齢, Charles River Laboratories Japan, Inc., Kanagawa, Japan）を使用した。結核菌抽出物 H37Ra（Difco laboratories）を添加した完全型フロイントアジュバンドで乳化した myeline oligodendrocyte glycoprotein 35-55 ペプチド（MOG35-55, Peptide International, Louisville, KY）50 μ g をマウスに皮下投与することで EAE を誘導した。day 0 に 250 百日咳毒素（List Biological Laboratories, Campbell, CA）IV を、day 2 に腹腔内投与した。対照マウスには完全型フロイントアジュバンドと生理食塩水のみで処置した。IL-6 抗体（MR16-1）は、中外製薬研究所で樹立したハイブリドーマを用いて作製した。MOG35-55 を免疫した day 7 に EAE マウスに MR16-1（8 mg/mouse）を腹腔内投与した。MOG35-55 を免疫した day15 または 16 に、脊髄、脾臓、血清を採取し、免疫組織化学染色、フローサイトメトリー、TEER 測定に用いた。EAE マウスの臨床症候を以下のスケールに従ってスコア化した。0, 明らかな症候なし；1, 尾の筋緊張低下；2, 後肢脱力；3, 後肢の不全麻痺；4, 後肢の麻痺；5, 後肢および前肢の麻痺；6, 瀕死と死。

11. 免疫組織化学染色

マウスをイソフルランで麻酔し、20mL のリン酸緩衝生理食塩水で経心臓灌流を行った。L3-5 腰髄を取り出し、4% paraformaldehyde で固定し、30% ショ糖溶液で一晩静置した。標本を適切な切断温度の化合物に包埋し、クリオスタットを使用して脊髄の凍結切片（10 μ m 厚）とした。脊髄切片を以下の一次抗体を使用して染色した。goat anti-albumin antibody（1:200, A90-134A; Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX）, biotin-conjugated donkey anti-mouse IgG（1:200, 715-066-151; Jackson ImmuneResearch West Grove, PA）, rat anti-CD4 antibody（1:100, 550280; BD Pharmingen Inc., San Diego, CA）。脊髄切片を一次抗

体で 4°C, 一晚インキュベートした後, 二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (1:200, 705-546-147; Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin (2µg/mL, 016-540-084; Jackson ImmunoResearch) でインキュベートした. CD4 染色では, biotin-conjugated donkey anti-rat IgG (1:200, 712-066-153; Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin (2 µg/mL, 016-540-084; Jackson ImmunoResearch) を使用した. スライドを Vectashield Antifade Mounting Medium (H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いてマウントした. 各マウスから無作為に選択した脊髓切片を BD-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) で観察した. 陽性染色領域を BZ-IIanalyzer (Keyence) で計算し, CD4 陽性 T 細胞は画像解析ソフトウェア (WinROOF Version 6.3.1; Mitani Corporation, Fukui, Japan) を用いて定量した.

12. *in vivo* フローサイトメトリー

対象マウスと EAE マウスから採取した脾臓をホモジナイズし, 100µm および 40µm のセルストレーナーに通し, 単核細胞を分離した. 赤血球は, 塩化アンモニウム-カリウム溶解緩衝液 (Gibco, Carlsbad, CA) で溶解した. 単核細胞を, Mouse BD Fc Block (BD Pharmingen Inc.) でインキュベートした後に, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 antibody (100510; BioLegend) で染色し, 次に PE-conjugated anti-IL-17A antibody (506904; BioLegend) および APC-conjugated anti-interferon- γ antibody (505810; BioLegend) を用いて細胞内を染色した. 染色は, Fixation/ Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug (BD Biosciences) を用いてメーカーのプロトコルに準拠して行った. Treg 細胞の分析では, Fc ブロッキングした細胞を fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 antibody および BV421- conjugated anti-CD25 antibody (102034; BioLegend) で染色した後に, APC-conjugated anti- Foxp3 antibody (17-5773-80B; Invitrogen, Carlsbad, CA) で染色した. 染色は Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) を用い, メーカー

ーのプロトコルに従って行った。BD FACSCanto II (BD Biosciences) を用いて得たデータを FlowJo 10.4.1 (Treestar) で分析した。

13. 統計解析

全てのデータは、平均と標準誤差 (standard error of the mean, SEM) として表した。統計学的有意差の検定には、対応のない *t* 検定、分散分析による Turkey 多重比較検定を使用し、経時的データの比較には 2 元配置分散分析を使用した。0.05 未満の *p* 値を有意とみなした。統計解析は IBM SPSS Statistics (International Business Machines Corporation, Armonk, NY) または JMP version 11.2.1 software (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

結果

1. 新規 *in vitro* BBB モデルの構築

ヒト BBB 構成細胞株として、ヒト脳微小血管 EC (hEC; TY10), AQP4 を発現した hAST, および hPCT を使用した。これらの細胞は温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 (ts-SV40LT) の遺伝子導入によって温度条件的に不死化されている (Fig.1A)。ts-SV40 LT の p53 および Rb の温度感受性阻害活性によって、これらの細胞株は 33°C で増殖する一方、37°C では ts-SV40 LT は不活性化され、増殖を停止し成熟細胞に分化する (Fig.1B) (Sano et al., 2010; Haruki et al., 2013; Shimizu et al., 2008)。我々の研究室では、これらの報告の中で、これらの細胞株に hEC, hAST, および hPCT の発現マーカー (hEC: occludin, claudin-5, claudin-12, ZO-1, ZO-2, JAM-A, GLUT-1, CAT-1, LAT-1, 4F2hc, MCT-1, calreticulin, MDR1, ABCG2, MRP1, MRP2, MRP4, MRP5; hAST: glial fibrillary acidic protein, EAAT2, AQP4; hPCT: platelet-derived growth factor receptor beta, Desmin, Kir 6.1, osteopontin, alpha smooth muscle actin, and NG2) が発現していることを確認している。これらのヒト BBB 細胞株の 3 層培養系を構築するために、温度感受性ポリマーが表面に固定された UpCell™ ディッシュを使用し

た. UpCell™ 表面に固定化された温度応答性ポリマーは 32°C を境に疎水性の細胞接着表面から親水性の細胞遊離表面となることから, 環境温度を 20°C にすることにより, コンフルエントに培養された細胞をシート状のまま回収することができる (Fig.2 A). UpCell™ ディッシュでの細胞培養を含む, 以下の複数の工程を確立し 3 層培養系を構築した. hAST を 3µm の小孔を有するメンブレンの反管腔側で培養し, 24 時間インキュベートし, AQP4 を含むアストロサイトの足突起がメンブレンの小孔から突出するようにした. 次に, メンブレンの管腔側で hPCT を培養した後, hAST と hPCT を 24 時間共培養した. 一方で, hEC を温度感受性ポリマーが表面に固定された UpCell™ ディッシュ上に培養した. 環境温度を 20°C にすることで hEC と細胞外マトリクスをシート状のまま剥離し, hPCT 上に移した. 3 種の細胞を 33°C で 24 時間共培養した後, 37°C 条件下で成熟細胞へと分化させた (Fig.2 B). 共焦点蛍光顕微鏡で撮影後に 3D 構築を行ったところ (Fig.2 H), hEC, hPCT, アストロサイト足突起, メンブレン, hAST からなる多培養インサートが 5 層構造を形成していた. アストロサイトの足突起の一部はメンブレンの小孔から突き出ており, hAST の足突起と hPCT は hEC 層に近接していることを確認した.

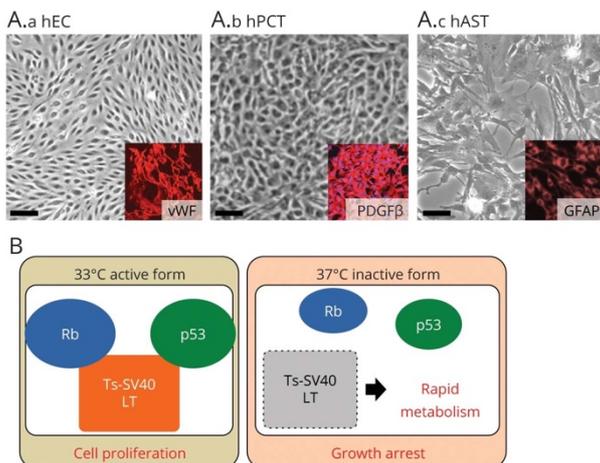


Fig.1. 新規 *in vitro* BBB モデルの構築に用いた温度条件不活化ヒト BBB 構成細胞株 hEC の形態は紡錘形を呈し, 血管内皮細胞マーカーであるフォンウィルブランド因子 (vWF) を発現している (Aa). hPCT の形態は敷石上で, hPCT には周皮細胞マーカー

である PDGF β の発現がみられる (Ab) . hAST の形態は星型であり, hAST のマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) を発現している (Ac) . 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原 (Ts-SV40 LT) をトランスフェクトした温度条件不死化ヒト細胞株の概念図を示す (2) . 33° C では, 活性化された Ts-SV40 LT は, 強力な腫瘍抑制因子である p53 と Rb に結合してこれらの機能を阻害し, 継続的な細胞増殖を引き起こす (2) . 37° C では, Ts-SV40 LT は不活化し, 細胞は増殖を停止し, 成熟細胞へと分化する (2) . BBB, blood-brain barrier; hEC, human brain microvascular endothelial cell; hPCT, human pericyte, hAST, human astrocyte.

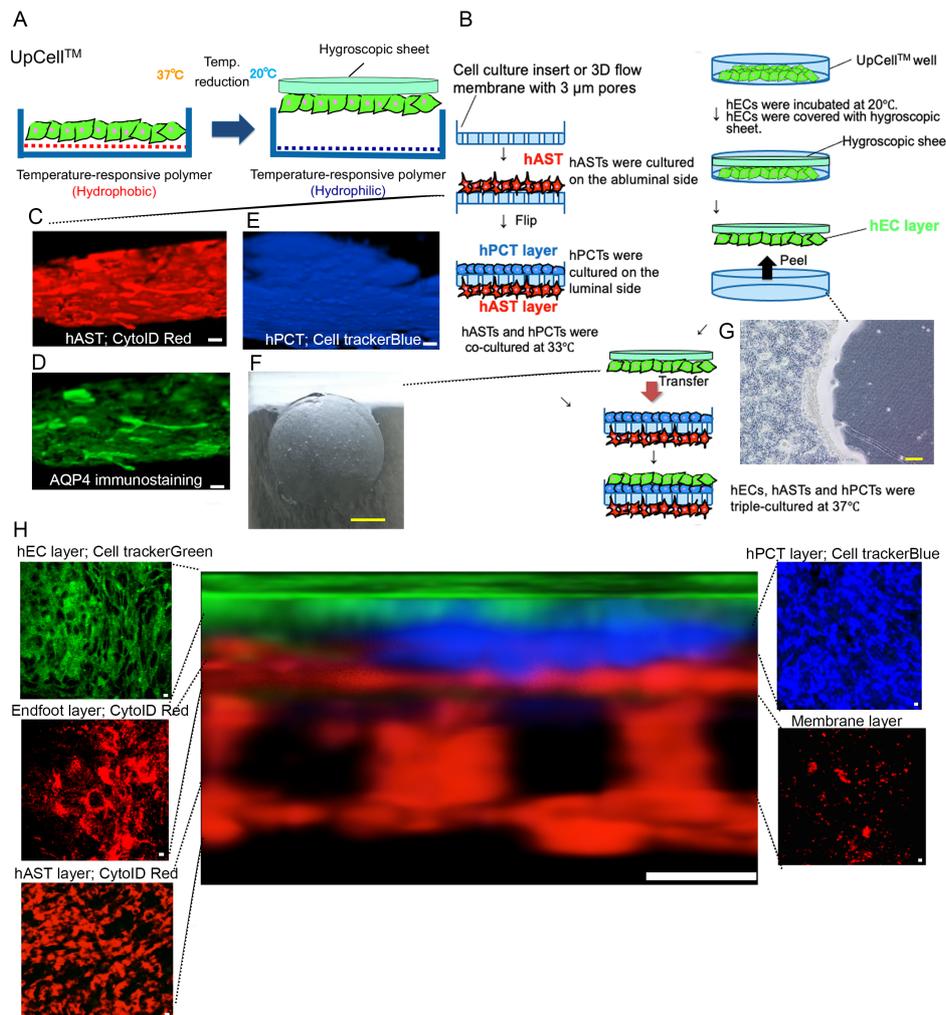


Fig.2. UpCell™ を用いた BBB 細胞株の 3 層培養系の構築

温度応答性ポリマーが表面に固定化された UpCell™ の概略図を示す (A) . 環境温度を 37°C から 20°C にすることで疎水性の細胞接着表面から親水性の細胞遊離表面となり, コンフルエントに培養された細胞を, 吸湿性シートを用いてシート状に回収することができる (A) . 我々が構築した 3 層培養系の作製工程を示す (2) . hAST を 3µm の小孔を有する細胞培養インサートメンブレンまたは 3D フローメンブレンの反管腔側で培養した (2) . メンブレンを反転し管腔側に hPCT を培養した後, hAST と hPCT を 33°C で共培養した (2) . 一方で, hEC を培養した UpCell™ ディッシュを 20°C でインキュベートし, 吸湿性シートを被せて hEC をシート状のまま剥離し, hPCT 上に移した (2) . 3 種の細胞を 37°C 条件下で成熟細胞へと分化させた (2) . CytoID Red で染色された hAST を示す (D) . hAST 上の AQ4 発現を確認した (D) . Cell trackerBlue で染色された hPCT を示す (E) . 吸湿性シートによって UpCell™ ディッシュから剥離された hEC は確認用のゲル膜に移されていた (scale bar = 10 mm) (F) . コンフルエントに培養された hEC は吸湿性シートによって, UpCell™ ディッシュの表面から除去されていた (G) . 共焦点蛍光顕微鏡による 3D 構築像を示す (H) . hEC, hPCT, アストロサイト足突起, メンブレン, hAST からなる多培養インサートが多層構造を形成していた (H) . アストロサイトの足突起の一部はメンブレンの小孔から突き出ており, hAST の足突起と hPCT は hEC 層に近接していた (H) . hEC, human brain microvascular endothelial cell; hPCT, human pericyte, hAST, human astrocyte.

2. 流速負荷型 *ex vivo* BBB モデルの構築と NMO-IgG が誘導する白血球の migration に対するサトラリズマブの効果

NMO-IgG が誘導する白血球の migration に対するサトラリズマブの効果を評価するために, 我々は hEC/hPCT/hAST 3 層培養系を導入した流速負荷型 BBB モデルを構築した (Fig.3 A-C) . これによって, 流速負荷条件下での白血球の migration の検討が可能となった. EC 側 (血管側) とアストロサイト側 (脳実質側) にサトラリズマブと NMO-IgG ま

たは NMO-IgG のみを加えた後 (**Fig.3 D**) , migration した細胞総数およびフェノタイプ
ングした細胞数をカウントし, 対照 IgG と比較した. NMO-IgG は, 総 PBMC, CD4 陽性,
CD8 細胞の migration を増加させた. サトラリズマブと NMO-IgG の投与によって, NMO-
IgG による総 PBMC, CD4 陽性, CD8 陽性細胞の migration の増加が有意に抑制された
(**Fig.3 E a-d**) .

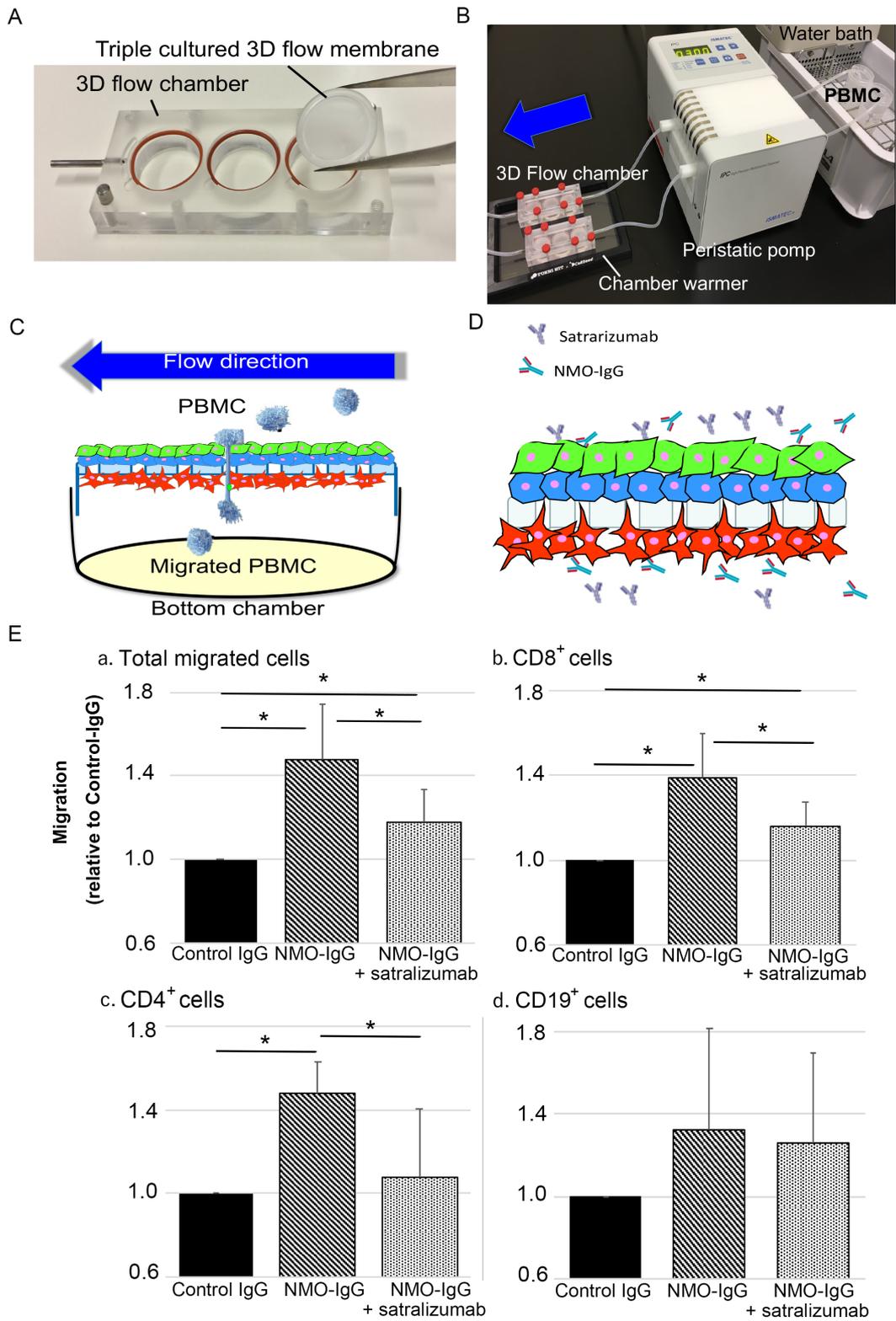


Fig. 3 *ex vivo* BBB モデルの構築と NMO-IgG が誘導する白血球の migration に対するサトラリズマブの効果

3層培養された3Dフローメンブレンおよび3Dフローチャンバーを示す(A)．3層培養された3Dフローメンブレンを3Dフローチャンバーに装着した(A)．流速負荷型 *ex vivo* BBBモデルの全体像を示す(B)．蓋をして密閉した3Dフローチャンバーを37°Cに設定したチャンバーウォーマーに置き、水槽で保温した正常ヒトPBMCを、蠕動運動ポンプが作り出す生理的流速とともにチャンバー内の管腔側に流入させた(B)．migration測定中の3Dフローチャンバーの概略図を示す(C)．底側チャンバーにmigrationした細胞を回収し、フローサイトメトリーで解析した(C)．NMO-IgGとサトラリズマブまたはNMO-IgGのみを用いた白血球migration測定の概略図を示す(D)．NMO-IgGは、対照IgGと比較して、総PBMC(E a)、CD8陽性(E b)、CD4陽性(E c)のmigrationを増加させ、NMO-IgGとサトラリズマブの併用によってその増加が抑制された(E a-c)．* $p < 0.05$ by unpaired t test ($n = 6$ per group)．PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

3. EAEマウスにおけるIL-6受容体阻害の効果

MR16(マウスIL-6受容体抗体)をEAE誘導のday7に投与した結果、EAEマウスの臨床症候の出現を有意かつ著明に抑制した(Fig.4 A)．さらに、EAE動物における白血球のmigrationを確認した．Day15に、EAEマウス脊髄のCD4陽性T細胞は著明に増加したが、対照マウスではCD4陽性T細胞はほぼ検出されなかった(対照, 33.7 ± 21.5

[mean \pm SEM] 個/脊髄切片; EAE, 628.3 ± 196.5 [mean \pm SEM] 個/脊髄切片) (Fig.4 B)．

Day7でのMR16投与によって、CD4陽性T細胞の脊髄へのmigrationは有意に抑制された

(EAE + MR16-1, [mean \pm SEM] 個/脊髄切片; EAE, 628.3 ± 196.5 [mean \pm SEM] 個/脊髄切片) (Fig.4 B)．臨床症候と脊髄での白血球migrationに与えるMR16-1の影響は免疫反応の変化によって二次的に生じた現象に過ぎないという可能性を排除するために、EAEマウスにおけるT細胞分化に対するMR16-1の効果を評価した．脾細胞で、Th1陽性細胞とFoxP3陽性制御性T細胞がday16に有意に増加した(Fig.4 C, E)．Th17細胞は、EAEマ

ウスで増加する傾向がみられたが、有意ではなかった (Fig.4 D) . Day7でのMR16投与はこれらの細胞の誘導に影響を与えなかった (Fig.4 C-E) .

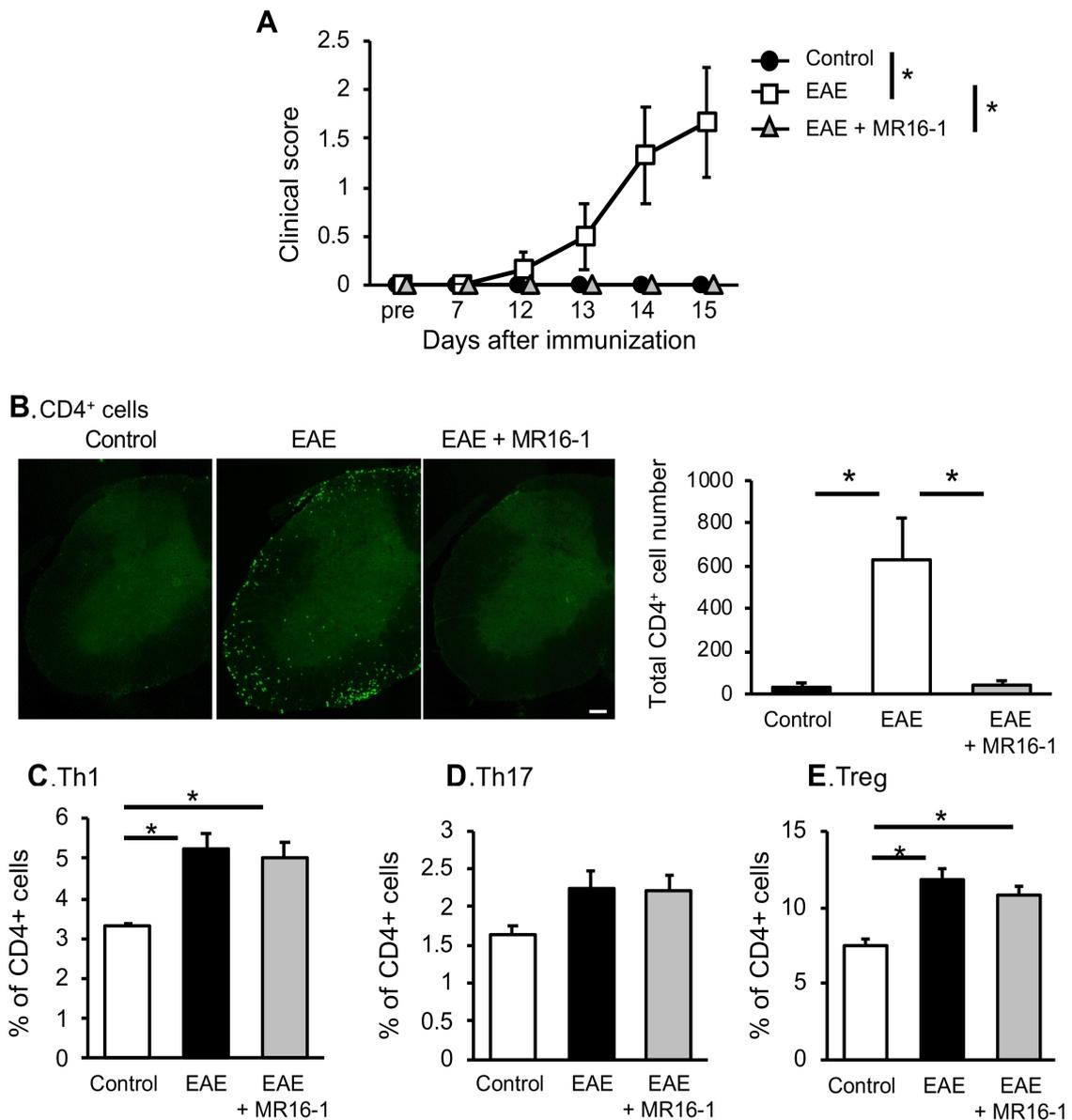


Fig. 4 *in vivo*での脊髄への白血球 migration に対する IL-6 受容体阻害の効果
 免疫7日目に投与したIL-6受容体抗体は(MR16-1)は、EAEマウスの臨床症候の出現を有意に阻害した(A) . *p < 0.05 by 2-way analysis of variance (n = 3-6 per group) . 免疫15日目の脊髄のCD4陽性細胞の免疫組織化学染色を示す(B) . CD4陽性T細胞は、EAE

マウス脊髄で著明に増加し、免疫 15 日目の IL-6 受容体抗体はこの増加を有意に予防した

(B) . * $p < 0.05$ by Tukey multiple comparison test (n = 3–6 per group) . Scale bar = 100

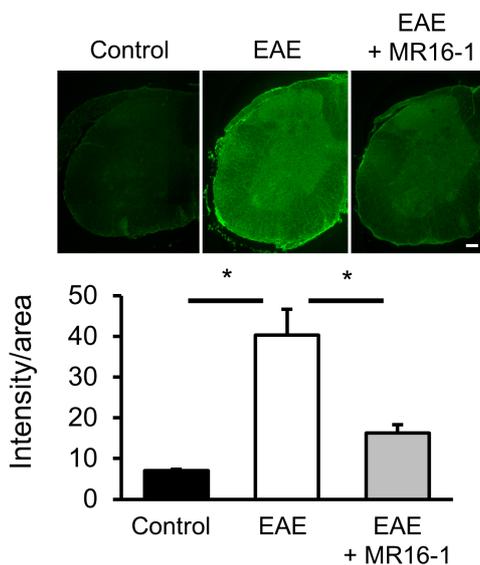
μm . EAE マウスにおいて、(C) Th1 陽性細胞の誘導と (E) FoxP3 陽性制御性 T 細胞の誘導は免疫 16 日目に有意に亢進した. Th17 陽性細胞については増加傾向があったが有意ではなかった (D) . 免疫 7 日目に IL-6 受容体抗体を投与してもこれらの細胞の誘導に変化はなかった (C-E) . * $p < 0.05$ by Tukey multiple comparison test (n = 4–8 per group). EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; IL-6, interleukin-6.

4. EAE マウスのバリア機能に対する IL-6 受容体阻害の効果

Day15 に行った免疫組織化学染色では、EAE マウスでは脊髄へのアルブミンおよび IgG の漏出が対照マウスに比較して高く (Fig. 5 A, B) , BBB の透過性亢進が示唆された.

MR-16-1 で処置した EAE マウスではこれらの脊髄への漏出が有意に抑制された (Fig. 5 A, B) .

A. Albumin



B. Mouse IgG

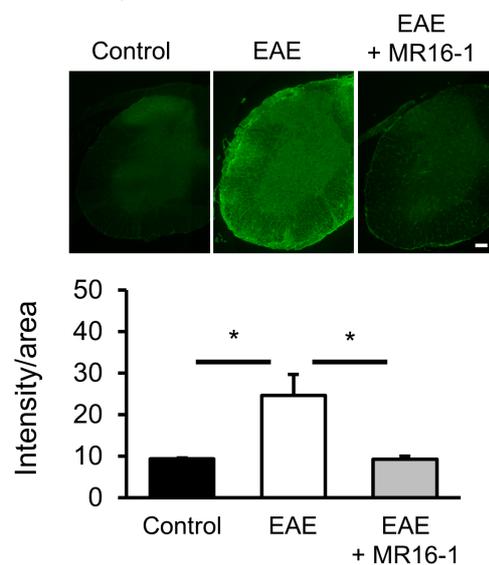


Fig. 5 *in vivo* での BBB 透過性に対する IL-6 受容体阻害の効果

免疫後 15 日目の脊髄におけるアルブミン (A) および IgG (B) の免疫組織化学的染色を示す (A, B) . EAE マウスでは、脊髄へのアルブミンと IgG の漏出は対照マウスよりも高

く、この漏出は IL-6 受容体抗体 (MR16-1) によって有意に減少した。* $p < 0.05$ by Tukey multiple comparison test ($n = 3-6$ per group). Scale bars = 100 μm . EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; IL-6, interleukin-6.

5. *In vitro* でのサトラリズマブの BBB バリア機能に対する効果

NMO-IgG が血管側または脳実質側の BBB のバリア機能に与える影響を評価するために、リアルタイム TEER の長期測定が可能な静的 *in vitro* BBB モデルを構築した。NMO-IgG または対照 IgG を血管側、脳実質側のいずれかまたは両方に添加した後、TEER 値を毎分ごとに 96 時間連続して測定した。NMO-IgG の添加から 24 時間以内に、全ての群で TEER 値が対照 IgG 群と比較して減少し始め、72 時間で有意な減少となった (Fig. 6 A, B)。血管側と脳実質側の両方に NMO-IgG を添加した群で最も低い TEER がみられた。NMO-IgG を脳実質側に添加した場合の TEER 値は、NMO-IgG を血管側に加えた場合の TEER よりも有意に低かった。NMO-IgG による BBB 機能破綻に対してサトラリズマブが影響を与えるかどうかを明らかにするために、hEC/hPC/hAST の 3 層培養系を組み込んだ静的 BBB モデルを使用した。サトラリズマブと NMO-IgG または対照 IgG を血管側と脳実質側のいずれかまたは両方に添加した後、上述のように TEER 値を測定した。これらの実験に先立ち、サトラリズマブがバリア機能に影響を与えないことを確認した (data not shown)。血管側と脳実質側、またはその両方、いずれにおいてもサトラリズマブと NMO-IgG を添加した条件では、NMO-IgG 単独条件と比較して、72 時間での TEER 値は有意に高い値を示した (Fig. 6 C-E)。このサトラリズマブによるバリア機能破綻抑制効果は、血管側に添加した場合と脳実質側に添加した場合で同程度であった (Fig. 6 D, E)。サトラリズマブを血管側と脳実質側の両側に添加した場合にバリア機能破綻抑制効果が最も高かった (Fig. 6 C)。

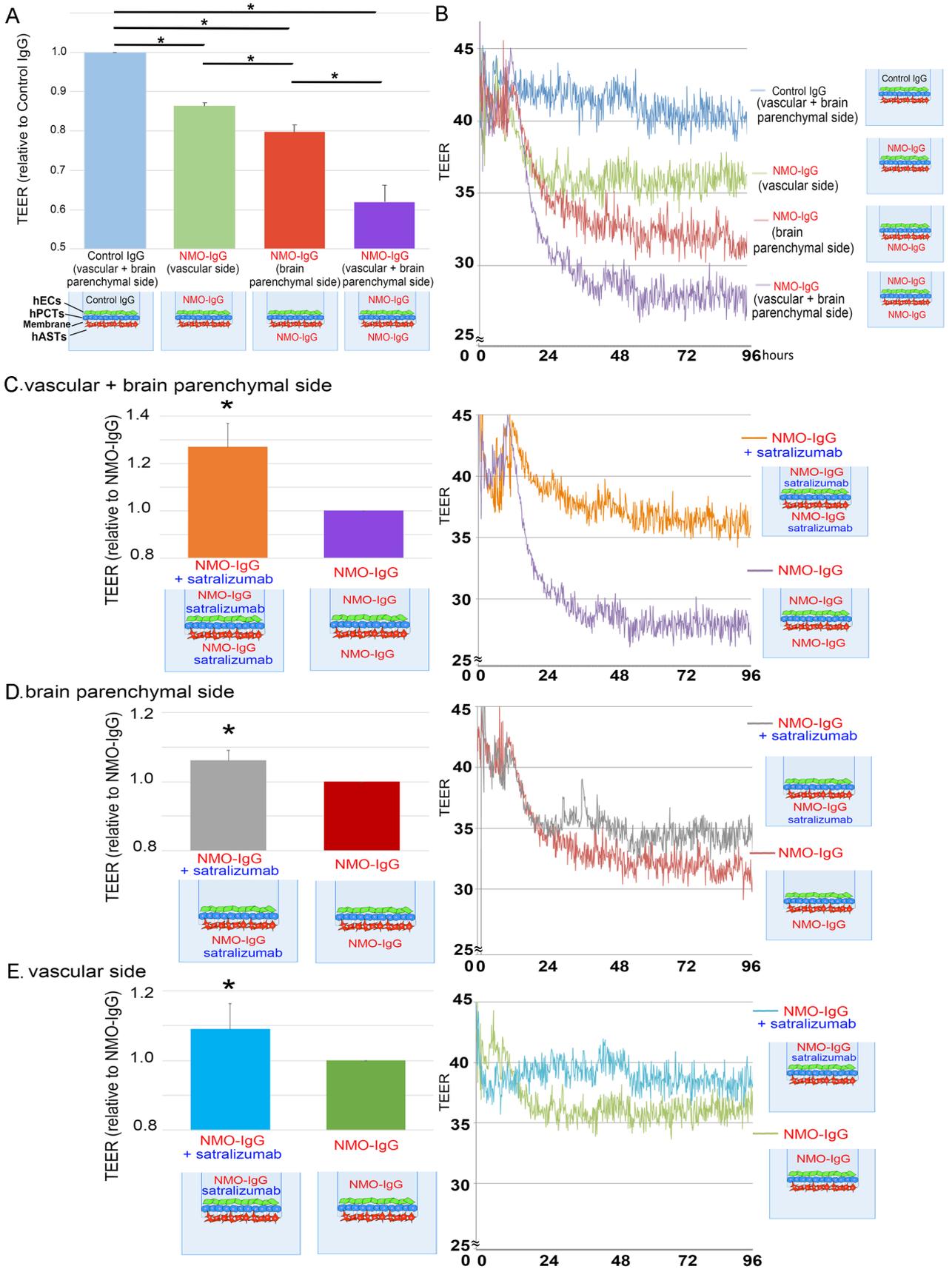


Fig. 6 *in vitro* での BBB のバリア機能に対するサトラリズマブの効果

静的 BBB モデルの血管側か脳実質側，あるいは両側への NMO-IgG を投与すると，対照 IgG と比較して，投与 72 時間後の TEER 値が有意に減少した (A) . * $p < 0.05$ by unpaired t test (n = 3 per group). cellZscope によるリアルタイム TEER 測定では，TEER 値がすべての群で NMO-IgG の投与から 24 時間以内に減少し始め，減少傾向は 48 時間続いた (B) . 血管側，脳実質側あるいは両側にサトラリズマブと NMO-IgG を添加した場合，NMO-IgG 単独条件と比較して，72 時間後の TEER 値は有意に高かった (C-E 左) . * $p < 0.05$ by unpaired t test (n = 3 per group). cellZscope によるリアルタイム TEER 測定では，TEER 値は経時的に低下していく傾向を示したが，サトラリズマブと NMO-IgG では NMO-IgG 単独と比較して，96 時間にわたっての低下の程度は少ないままであった (C-E 右) . TEER, transendothelial electrical resistance.

6. NMO-IgG 共存下でのサトラリズマブの脳実質への移行性

BBB を通過する微量のサトラリズマブおよび NMO-IgG を，オデッセイ赤外線イメージングシステムおよび ELISA で測定可能な *in vitro* BBB モデルを構築した．サトラリズマブと対照 IgG について，透過係数 (Papp; mm/秒) を評価した．標識されたサトラリズマブまたは IgG2 (対照 IgG) を hEC (血管) 側に加えた．脳実質側に移行した IgG を赤外線イメージングシステムで検出し，サトラリズマブと対照 IgG の透過係数を計算した．サトラリズマブの Papp は対照 IgG と比較してほぼ 3 倍であった (Fig.7 A) .

血管側に NMO-IgG または対照 IgG に作用させた後，移行した IgG をヒト IgG 検出 ELISA キットで検出した．NMO-IgG および対照 IgG の総蓄積 IgG の増量を計算し，対照 IgG に対して正規化し，IgG 蓄積量とした．NMO-IgG の脳内蓄積量は対照 IgG の約 1.5 倍であった (Fig.7 B) .

EAE マウスでの MR16-1 が BBB を透過する速度は正常マウスのほぼ 30 倍であることが明らかになっている (Serizawa et al., 2018) . そこで，MR16-1 同様にサトラリズマブも

NMO-IgG 存在下で脳内移行が亢進するのかどうか検討した。3層培養 BBB モデルの血管側にサトラリズマブと NMO-IgG, またはサトラリズマブと対照 IgG を同時に加えた後, サトラリズマブ抗体を用いた ELISA でサトラリズマブの総蓄積量を定量した。サトラリズマブと NMO-IgG を加えた場合のサトラリズマブの総蓄積量を, サトラリズマブと対照 IgG を加えた場合に対して正規化した。サトラリズマブと NMO-IgG を加えた場合のサトラリズマブの総蓄積量はサトラリズマブと対照 IgG を加えた場合のほぼ 3 倍であった

(Fig.7 C) .

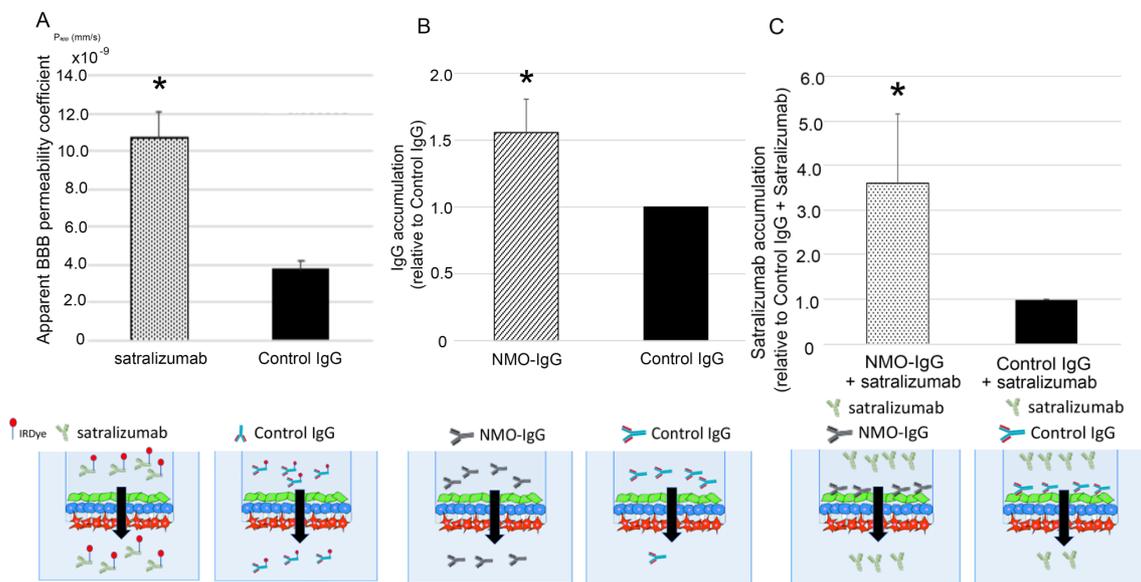


Fig.7 *in vitro* での NMO-IgG 共存下でのサトラリズマブの脳内移行性

サトラリズマブの透過係数は対照 IgG と比較してほぼ 3 倍であった (A) . * $p < 0.05$ by unpaired t test (n = 6 per group). IgG 検出 ELISA キットで定量した NMO-IgG の脳内総蓄積量は対照 IgG の約 1.5 倍であった (B) . * $p < 0.05$ by unpaired t test (n = 6 per group). サトラリズマブを NMO-IgG と共に加えた場合のサトラリズマブの総蓄積量は, サトラリズマブを対照 IgG と共に加えた場合のほぼ 3 倍であった (C) . * $p < 0.05$ by unpaired t test (n = 8 per group).

考察

ヒト BBB 構成細胞株の 3 層培養システムを用いて *in vitro*, *ex vivo* BBB モデルを作製することに成功した (Fig. 2) . *Ex vivo* BBB モデルを用いた検討では, サトラリズマブを血管側および脳実質側に投与することで, NMO-IgG が促進した総 PBMC, CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞の migration が抑制された (Fig. 3) . 次に, EAE マウスにおいて, IL-6 シグナル伝達の阻害によって, CD4 陽性 T 細胞の脊髄への migration, BBB 透過性の亢進, 脊髄炎の発症が抑制することが示された (Fig. 4, 5) . さらに, NMO-IgG はバリア機能破綻を生じさせ, このバリア機能の破綻は, NMO-IgG を BBB モデルの血管側と脳実質側の両方に加えた場合に最も強かった. NMO-IgG を脳実質側に加えた場合は, 血管側に加えた場合と比較してより強くバリア機能を減弱した. サトラリズマブは NMO-IgG によって引き起こされる BBB 機能破綻を抑制し, その効果はサトラリズマブを血管側と脳実質側の両方に加えた場合に最も高かった. 脳実質側に加えた場合の効果は血管側に加えた場合と同程度であった (Fig. 6) . また, サトラリズマブは NMO-IgG 共存下で脳内移行が亢進することを確認した (Fig. 7) .

これまで我々の研究室では, NMO-IgG のなかでも GRP78 に対する自己抗体が, 血管側の EC の核内因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF κ B) シグナルを活性化して BBB の透過性を高め, NMO-IgG による中枢神経側でのアストロサイトへの攻撃を誘引することを明らかにしている (Shimizu et al., 2017) . また, 中枢神経側の NMO-IgG がアストロサイトでの IL-6 発現を誘導し, IL-6 シグナル伝達が hEC に作用することで, CCL2, CXCL8 といったケモカインの誘導, claudin-5 の発現減少, 透過性亢進, PBMC の migration 増加といった BBB 特性の変化をもたらすことを示した (Takeshita et al., 2016) . 本研究では, 我々は NMO-IgG を血管側よりも脳実質側に与えることで, より強くバリア機能が減少することを示した. これは, 中枢神経側の IL-6 シグナル伝達によって生じるバリア機能低下作用は, NMO-IgG が血管側で引き起こすバリア機能低下作用よりも大きいことを示している.

以上から、NMOSD 発症の病態に関して、NMOSD の発症に関与するいくつかのステップが BBB の両側で生じると考えられる (Fig. 8A) . 第一に、NMO-IgG (GRP78 抗体または未知の抗体) が EC の NF- κ B シグナルを活性化する. 第二に、NMO-IgG は血管側のバリア機能を低下させる. 第三に、NMO-IgG は NMO-IgG 自身の脳内移行性を高める. 第四に、NMO-IgG はアストロサイトの AQP4 を攻撃し、アストロサイトでの IL-6 発現を誘導する. 第五に、IL-6 シグナル伝達は中枢神経側で EC に作用する. 第六に、IL-6 シグナル伝達は、血管側よりも中枢神経側においてのバリア機能をより強く低下させる. 第七に、IL-6 シグナル伝達は EC で CCL2 と CXCL8 といったケモカインの発現を誘導する. 第八に、誘導されたケモカインが炎症細胞浸潤を亢進させる. 最終的に、NMOSD が発症する.

NMOSD 患者の BBB におけるサトラリズマブの作用機序を検討するために、サトラリズマブの脳内移行性を評価したところ、サトラリズマブは対照 IgG の約 3 倍の脳内移行性をもつことが明らかになった (Fig. 7A) . NMO-IgG の脳内移行性は対照 IgG の約 1.5 倍であった (Fig. 7B) . NMO-IgG の共存下でのサトラリズマブの脳内移行性は、対照 IgG の共存下と比較してほぼ 3 倍に増加した (Fig. 7C) . この結果から、NMO-IgG によってサトラリズマブの脳内移行性が増強され、サトラリズマブが BBB を通過して中枢神経側に作用することが容易になると考えられる.

本研究では、サトラリズマブが NMO-IgG によって引き起こされるバリア機能の低下や炎症細胞浸潤を抑制することを示した (Fig. 3, 6) . さらに、EAE マウスにおいて、IL-6 シグナル伝達の阻害によって、CD4 陽性 T 細胞の脊髄への浸潤が抑制され、BBB 透過性の亢進と EAE マウスの脊髄炎発症が抑えられた (Fig. 4, 5) . 以上より、NMOSD 患者の BBB におけるサトラリズマブの作用機序について次のことが考えられる. サトラリズマブは NMOSD 患者の BBB を通過し、中枢神経側でアストロサイトからの IL-6 を阻害し、BBB 機能破綻と炎症細胞浸潤を抑制する結果、NMOSD の発症を予防する (Fig. 8B) . サトラリズマブは血管側と脳実質側の両方に加えた場合に特に顕著に TEER を改善させたこ

とから、 BBB の破綻が生じている NMOSD の急性炎症部位では、 NMO-IgG とサトラリズマブがより容易に中枢神経側に到達し、 サトラリズマブは特に効率的に効果を発現できる可能性がある。

サトラリズマブは、 BBB のバリア機能の破綻を防ぐことで NMOSD の再発予防効果を発現していると考えられるが、それだけではなく、 サトラリズマブは NMOSD 再発時の白血球浸潤を阻害することで急性炎症による神経障害に対する治療効果を有することが想定できる。このようなサトラリズマブの BBB 機能維持効果を考えると、 NMOSD と同様に BBB 破綻や脳脊髄液中の IL-6 濃度上昇がみられる、 自己免疫性視神経炎や、 神経ペーチェット病、 中枢神経ループス、 NMDA 受容体脳炎、 Vogt-小柳-原田病といった自己免疫性中枢神経疾患 (Lin, 2015; Yoshimura et al., 2009; Asano et al., 2017) の治療においてもサトラリズマブは新たな選択肢となる可能性がある。

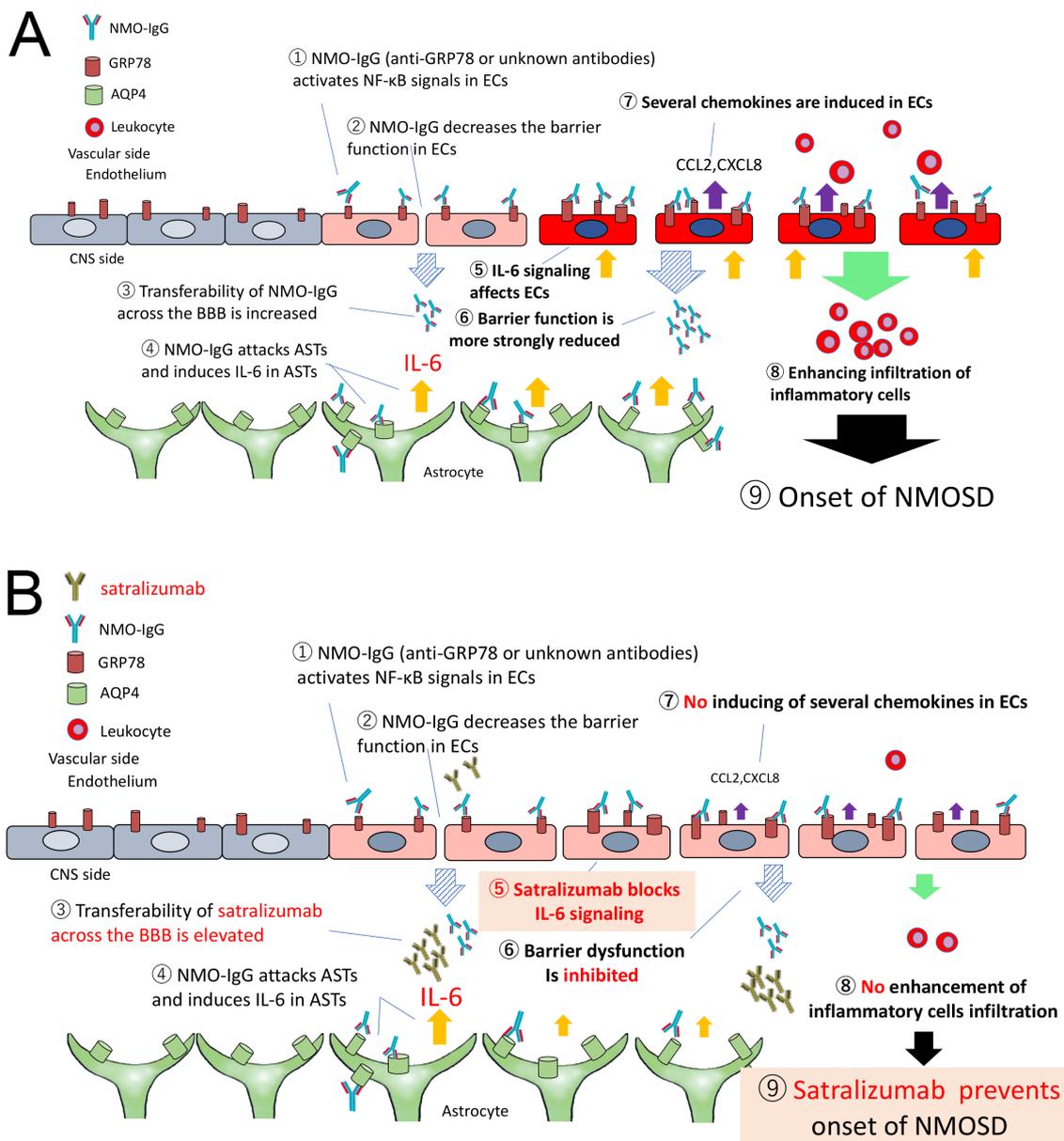


Fig.8 BBB における NMOSD の病態生理とサトラリズマブの作用機序

(A) : BBB における NMOSD の病態生理の模式図。第一に、NMO-IgG (GRP78 抗体または未知の抗体) が EC の NF- κ B シグナルを活性化する。第二に、NMO-IgG は血管側のバリア機能を低下させる。第三に、NMO-IgG は NMO-IgG 自身の脳内移行性を高める。第四に、NMO-IgG はアストロサイトの AQP4 を攻撃し、アストロサイトでの IL-6 発現を誘導する。第五に、IL-6 シグナル伝達は中枢神経側で EC に作用する。第六に、IL-6 シグナル伝達は、血管側よりも中枢神経側においてのバリア機能をより強く低下させる。第七

に、IL-6 シグナル伝達は EC で CCL2 と CXCL8 といったケモカインの発現を誘導する。第八に、誘導されたケモカインが炎症細胞浸潤を亢進させる。最終的に、NMOSD が発症する。(B) : BBB におけるサトラリズマブの作用機序の病態生理の模式図。サトラリズマブは NMOSD 患者の BBB を通過し、中枢神経側でアストロサイトからの IL-6 を阻害し、BBB 機能破綻と炎症細胞浸潤を抑制する結果、NMOSD の発症を予防する。AQP4, aquaporin-4; BBB, blood-brain barrier; EC, endothelial cell; IL-6, interleukin-6; NMOSD, neuromyelitis optica spectrum disorder.

結語

本研究において我々は、新たに開発した 3 層共培養系を用いて、静的 *in vitro* BBB モデルおよび流速負荷型 *ex vivo* BBB モデルを作製することに成功した。これらの BBB モデルを用いて、NMOSD で生じる BBB 破綻の観点から IL-6 受容体抗体サトラリズマブの作用機序を明らかにした。すなわち、サトラリズマブは、NMO-IgG の共存下で BBB を通過し、IL-6 による BBB 破綻を抑制することで NMOSD の再発を予防することを示した。IL-6 による BBB 破綻は、NMOSD 以外の自己免疫性中枢神経疾患の病態にも関与していることから、サトラリズマブはこれらの疾患に対しても有効な治療薬となる可能性がある。

謝辞

本研究に際し、実験の遂行・データ分析・論文作成をご指導頂いた山口大学医学系研究科臨床神経学講座、血液脳神経関門先進病態創薬研究講座 竹下 幸男先生、実験の遂行・データ分析にご協力頂いた中外製薬 芹沢 賢一先生、篠原 はるな先生、三宅 翔太先生、山口大学医学系研究科臨床神経学講座 藤澤 美和子先生、松尾 欣也先生、根本 壤先生、清水 文崇先生、さの脳神経内科クリニック 佐野 泰照先生、Third Rock Ventures Richard M. Ransohoff 先生、本研究にあたり統括・ご指導・ご教鞭を賜りました、山口大学医学系研究科臨床神経学講座 神田隆先生に深謝申し上げます。

参考文献

- Araki, M., Matsuoka, T., Miyamoto, K., Kusunoki, S., Okamoto, T., Murata, M., Miyake, S., Aranami, T., Yamamura, T. 2014. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology*. 82, 1302-1306.
- Ayzenberg, I., Kleiter, I., Schroöder, A., Hellwig, K., Chan, A., Yamaura, T., Gold, R. 2013. Interleukin 6 receptor blockade in patients with neuromyelitis optica nonresponsive to anti-CD20 therapy. *JAMA Neurol*. 70, 394-397.
- Bradl, M., Misu, T., Takahashi, T., Watanabe, M., Mader, S., Reindl, M., Adzemovic, M., Bauer, J., Fujihara, K., Itoyama, Y., Lassmann, H., 2009. Neuromyelitis Optica of patient immunoglobulin *in vivo*. *Ann Neurol*. 65, 630-642.
- Chihara, N., Aranami, T., Sato, W., Miyazaki, Y., Miyake, S., Okamoto, T., Ogawa, M., Toda, T., Yamamura, T. 2011. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 3701-3706.
- Choi, YK., Kim, KW. 2008. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB reports*. 41, 345-352.
- Devic, E. 1894. Myélite subaiguë compliquée de névrite optique, *Bull. Méd.* 8, 1033–1034.
- Haruki, H., Sano, Y., Shimizu, F., Omoto, M., Tasaki, A., Oishi, M., Koga, M., Saito, K., Takahashi, T., Nakada, T., Kanda, T. 2013. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of complement. *J Neurol Sci*. 331, 136-144.
- Hinson, SR., Romero, MF., Popescu, FG., Lucchinetti, CF, Fryer, JP., Wolburg, Hartwig., Fallier-Becker, P., Noell, S., Lennon, VA. 2012. Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24, 1245-1250.
- Igawa, T., Ishii, S, Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., Watanabe, T., Takubo, R., Doi, Y., Wakabayashi, T., Hayasaka, A., Kadono, S., Miyazaki, T., Haraya, K., Sekimori, Y., Kojima, T., Nabuchi, Y., Aso, Y., Kawabe, Y., Hattori, K. 2010a.

Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol.* 28, 1203-7.

Igawa, T., Tsunoda, H., Tachibana, T., Maeda, A., Mimoto, F., Moriyama, C., Nanami, M., Sekimori, Y., Nabuchi, Y., Aso, Y., Hattori, K. 2010b. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. *Protein Eng Des Sel.* 23, 385-92.

Kira, J. 2003. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol.* 2, 117-127.

Kira, J., Itoyama, Y., Kikuchi, H., Hao, Q., Kurosawa, T., Nagato, K., Tsumiyama, I., Rosenstiel, P., Zhang-Auberson, L., Saida, T. 2014. Fingolimod (FTY720) therapy in Japanese patients with relapsing multiple sclerosis over 12 months: results of a phase 2 observational extension. *BMC Neurol.* 14, 21. doi : 10.1186/1471-2377-14-21.

Lennon, VA., Kryzer, TJ., Pittock, SJ., Verkman, AS., Hinson, SR., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 473-477.

Lennon, VA., Wingerchuk, DM., Kryzer, YJ., Pittock, SJ., Lucchinetti, CF., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinshenker, BG. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet.* 364, 2106-2112.

Lin, P. 2015. Targeting interleukin-6 for noninfectious uveitis. *Clin Ophthalmol.* 9, 1697-1702.

Yoshimura, T., Sonoda, KH., Ohguro, N., Ohsugi, Y., Ishibashi, T., Cua, DJ., Kobayashi, H., Yoshida, H., Yoshimura, A. 2009. Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology.* 48, 347-354. Asano T, Ito H, Kariya Y, Hoshi K, Yoshihara A, Ugawa Y, Sekine H, Hirohata S, Yamaguchi Y, Sato S, Kobayashi H, Migita K, Ohira H, Hashimoto Y, Watanabe H. 2017. Evaluation of blood-brain barrier function by quotient alpha2 macroglobulin and its relationship with interleukin-6 and complement component 3 levels in neuropsychiatric systemic lupus. *Plos One.* 12, e0186414.

Man, S., Tucky, B., Coteleur, A., Drazba, J., Takeshita, Y., Ransohoff, RM. 2012. CXCL12-induced monocyte-endothelial interactions promote lymphocyte transmigration across an *in vitro* blood-brain barrier. *Sci Transl Med.* 4, 119ra14.

Matsushita, T., Tateishi, T., Isobe, N., Yonekawa, T., Yamasaki, R., Matsusue, D., Murai, H., Kira, J. 2013. Characteristics cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One.* 8, e61835.

Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T. Nakashima, I., Takahashi, H., Itoyama, Y. 2007. Loss of aquaporin 4 in lesion of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain.* 130, 1224-1234.

Misu, T., Takano, R., Fujihara, K., Takahashi, T., Sato, S., Itoyama, Y. 2009. Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillar acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 80, 575-577.

Reichert, JM. 2017. Antibodies to watch in 2017. *MAbs.* 9, 167-181.

Rochfort, KD., Collins, LE., Murphy, RP., Cummins, PM. 2014. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase- dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *Plos One.* 9, e101815.

Roemer, SF., Paris, JE., Lennon, VA., Benarroch, EE., Lassmann, H., Bruck, W., Mandler, RN., Weinchenker, BG., Pittock, SJ., Wingerchuk, DM., Lucchinetti, C., 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica. *Brain.* 130, 1194-11205.

Sano, Y., Shimizu, F., Abe, M., Maeda, T., Kashiwamura, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Obinata, M., Kajiwara, K., Fujii, M., Suzuki, M., Kanda, T. 2010. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *J Cell Physiol.* 225, 519-528.

Serizawa, K., Tomizawa-Shinohara, H., Magi, M., Yogo, K., Matsumoto, Y. 2018. Anti-IL-6 receptor antibody improves pain symptoms in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 319, 71-79.

Shimizu, F., Sano, Y., Maeda, T., Abe, MA., Nakayama, H., Takahashi, R., Ueda, M., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Obinata, M., Kanda, T. 2008. Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol.* 217, 388-399.

Shimizu, F., Sano, Y., Tominaga, O., Maeda, T., Abe, MA., Kanda, T. 2013. 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.* 34, 1902-1912.

Shimizu, J., Hatanaka, Y., Hasegawa, M., Iwata, A., Sugimoto, I., Date, H., Goto, J., Shimizu, T., Takatsu, M., Sakurai, Y., Nakase, H., Uesaka, Y., Hashida, H., Hashimoto, K., Komiya, T. Tsuji, S. 2010. IFN β -1b may severely exacerbate Japanese optic-spine MS in neuromyelitis optica spectrum. *Neurology.* 75, 1423-1427.

Shimizu, F., Schaller, KL., Owens, GP., Cotleur, AC., Kellner, D., Takeshita, Y., Obermeier, B., Kryzer, TJ., Sano, Y., Kanda, T., Lennon, VA., Ransohoff, RM., Bennett, JL. 2017. Glucose-regulated protein 78 autoantibody associates with blood-brain barrier disruption in neuromyelitis optica. *Sci Transl Med.* 9, eaai9111

Takeshita, Y., Obermeier, B., Cotleur, A., Sano, Y., Kanda, T., Ransohoff, RM. 2014. An *in vitro* blood-brain barrier model combining shear stress and endothelial cell/astrocyte co-culture. *J Neurosci Methods.* 232, 165-172.

Takeshita, Y., Obermeier, B., Cotleur, AC., Spampinato, SF., Shimizu, F., Yamamoto, E., Sano, Y., Kryzer, TJ., Lennon, VA., Kanda, T., Ransohoff, RM. 2017. Effects of neuromyelitis optica-IgG at the blood-brain barrier *in vitro*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 4, e311.

Takeshita, Y., Ransohoff, RM. 2012. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev.* 248, 228-239.

Tarbell, JM. 2020. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc Res.* 87, 320-30.

Uchida, T., Mori, M., Uzawa, A., Masuda, H., Muto, M., Ohtani, R., Kuwabara, S. 2017. Increased cerebrospinal fluid metalloproteinase-2 and interleukin-6 are associated with albumin quotient in neuromyelitis optica: their possible role on blood-brain barrier disruption. *Mult Scler.* 23, 1072-1084.

Uzawa, A., Mori, M., Arai, K., Sato, Y., Hayakawa, S., Masuda, S., Taniguchi, J., Kuwabara, S. 2010. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Multi Scler.* 16, 1443-1452.

Uzawa, A., Mori, M., Uchida, T., Hayakawa, S., Masuda, S., Kuwabara, S. 2009. Markedly increased CSF interleukin-6 levels in neuromyelitis optica, but not in multiple sclerosis. *J Neurol.* 256, 2082-2084.

Wingerchuk, DM., Lennon, VA., Lucchinetti, CF., Pittock, SJ., Weinshenker, BG. 2007. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet.* 6, 805-8015

Zhang, H., Bennett, J., Verkman, AS. 2011. *Ex vivo* spinal cord slice model of neuromyelitis optica reveals novel immunopathogenic mechanisms. *Ann Neurol.* 70, 948-954.