

192. 多発性硬化症患者血液脳関門破綻の遺伝的素因の解明

西原 秀昭

山口大学 医学部 神経・筋難病治療学講座

Key words : 多発性硬化症, 血液脳関門, iPS 細胞, RNAseq

緒言

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) には世界中で 200 万人以上が罹患している。若年成人に好発であるため、その治療費と労働力などの社会的損失から、社会経済に与える影響の大きな疾患である。詳細な病因が分かっておらず、未だに完治する方法はない。免疫細胞の無秩序な中枢神経への浸潤と血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) の破綻が MS 病変の初期変化として広く受け入れられている。BBB 構成内皮細胞は、隣接する細胞間で密着結合 (tight junction : TJ) を形成し脳内のホメオスタシスを維持している。MS 剖検例や動物モデル (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を用いた病理学的な検討では、MS 病変では TJ が低下し、免疫細胞浸潤に必要な接着因子が高発現している。これまで EAE が MS 病態の理解、新薬の開発に貢献してきたが、EAE の多くは初期病態のみを反映し、EAE に有効な多くの候補薬が MS 患者に無効であることから、MS 病態がより複雑であることは明確であり、従来の EAE を用いた研究では、MS 特異的な BBB 破綻メカニズムの解明は困難である。更には、MS 患者由来免疫細胞を用いた研究が盛んに行われ、MS の病態解明に貢献し、免疫細胞をターゲットとした治療法を開発してきた。ただし、免疫を標的とした治療法は進行期には効果がないこと、生理的な免疫監視システムまでも抑制することで、感染症が副作用として発症することが重大な問題であり、特に進行期患者に対する新たな治療戦略開発が緊急の課題である。BBB 破綻が病態進行に大きく関わり、GWAS データ解析で MS では疾患感受性遺伝子が主に内皮細胞に存在することから [1]、MS 患者では遺伝的に BBB 破綻をきたしやすい素因が存在する可能性がある。従って本研究では、「MS 患者の BBB 破綻機序に着目して、これまでにない発想の BBB を標的とした革新的治療方法の開発につながる候補分子の同定」を目指した。

これまでの BBB 研究は実験動物、もしくはヒト血液/脳脊髄液と健常人 BBB モデルを使用し、免疫細胞や血清に存在する因子が BBB を破綻させるメカニズムの理解を深めてきた。これらは MS 患者由来 BBB サンプルが存在しないことに起因する。ヒトとモデル動物では BBB 構成タンパクに質的・量的な違いがあり [2]、研究にはヒト由来生体材料を用いることが望ましい。ただし、ヒト由来 BBB サンプルは制限されており、特に脳生検が一般的ではない病気では研究サンプル確保が困難である。その結果、ヒト剖検例などから作製された不死化細胞株が広く使用されてきた。残念ながらこれらのモデルの多くは、タイトなバリアやトランスポーター、免疫細胞の遊走に必要な接着因子発現など、多くの *vivo* の性質を失っている。近年の幹細胞技術の発達により、BBB 構成細胞が ES 細胞もしくは iPS 細胞から分化できるようになった。特に、疾患由来 BBB モデルは BBB 破綻病態を解明する新たなツールとして有用である。BBB の分化には、①血清を用いて血管内皮細胞と神経前駆細胞を共分化させ、内皮細胞に特異的な細胞外基質を用いて内皮細胞を選択する方法 [3]、②化学的な分化方法により直接 BBB 構成内皮細胞を分化させる方法 [4] の 2 種類のプロトコールが広く使用されている。ただし、これらの BBB モデルは上皮と内皮の両者の性質を有し [5]、免疫細胞遊走に関わる重要な接着因子を発現しておらず、神経免疫分野の研究には適さない。以上の経緯から、筆者は iPS 細胞由来新規 BBB モデルの開発に取り組み、③iPS 細胞から内皮前駆細胞を経由し、複数回の選択的継代を行い内皮細胞の純度を増すことで、ヒト脳微小血管内皮細胞の初代培養と同様の形態、バリア機能、接着因子の発現を有する BBB モデルの開発に成功した [6]。さらには、MS 患者では健常者に比べ、BBB のバリア機能が低下していることを明らかにし、MS 病変の BBB 異常が iPS 細胞を使って *in vitro* に再現できること、同モデルが MS の病態解明・新規治療法開

発に使用できることを示した [7]。本研究では、同方法を用いて分化誘導した MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞のトランスクリプトーム発現を健常人と比較することで、MS での BBB 破綻に関与する候補遺伝子を同定することを目的とした。MS では 400 を超える発現変動遺伝子が見出され、それらを基にした reactome pathway 解析の結果とそれぞれの候補遺伝子の分子機能、生物学的プロセス、細胞内局在を検討し、BBB の発達や維持に関与する候補を複数同定した。そのうち候補 X については、複数の小分子を用いて健常人由来 BBB 構成内皮細胞の機能を阻害することで、BBB 構成蛋白質である claudin-5 の発現が低下し、小分子の透過性が亢進すること、つまりは MS 同様の BBB 破綻が健常人に再現できることを示した。同結果は、BBB 構成内皮細胞のバリア機能を小分子の投与によって破綻させることができる、すなわち人為的に BBB を操作することができることを示している。今後は、より詳細な BBB 破綻メカニズムを解明することで BBB を標的とした創薬を目指す。

方法

1. BBB 構成内皮細胞の分化誘導

再発寛解型 MS 患者 4 例と健常人 3 例の末梢血単核球から作製した iPS 細胞 (MS 患者 7 株、健常人 6 株) を使用した。我々が独自に開発した方法 [6, 8] で内皮細胞の形態とトランスクリプトーム発現を有するか、接着因子の発現に優位性のある BBB 構成内皮細胞に分化誘導した。具体的には、iPS 細胞を matrigel™、mTeSR1™ を使用して維持培養を行い、未分化細胞が維持できていることを確認した後に分化誘導を開始した (day -3)。まずは、維持培養同様の培地、細胞外基質を用いて iPS 細胞の拡大培養を行い、day 0 と day 1 に 8 μM の CHIR99201 を添加した LaSR 培地 (advanced DMEM/F-12™ + Glutamax™ + L-ascorbic acid) を使用することで Wnt/β-catenin シグナルを活性化し、内皮前駆細胞の分化を行い、培養 5 日目に CD31 陽性細胞をポジティブセレクションにより Magnetic activated cell sorting (MACS) で採取した。CD31 陽性細胞を type IV collagen でコーティングしたプレートにまき、コンフルエントまで hECSR 培地 (human endothelial SFM™ + B-27™ + FGF-2) で培養した。内皮前駆細胞は内皮細胞と平滑筋様細胞に共分化するため、プレートへの接着能の差異 (内皮細胞と比べて平滑筋様細胞の接着が強い) を使用して内皮細胞を選択的に継代した。2~3 回の継代でほぼ純粋な内皮細胞が採取でき、以下の実験に使用した。

2. RNA 採取と RNAseq 解析

BBB 構成内皮細胞から High Pure RNA Isolation Kit (Roche) を用いて RNA を採取した。TruSeq stranded mRNA library prep (illumina) を用いて cDNA ライブラリを作製し、60~100 M reads/library のシーケンシングを行った。Quality control 後に HiSat2 を用いて Reference genome へのマッピングを行い、FeatureCounts を使用して read をカウントした。DESeq2 を使用して発現変動遺伝子を解析し、reactome pathway 解析、GO 解析を行った。

3. 小分子を用いた候補 X のノックダウンと機能解析

健常人由来 BBB 構成内皮細胞 (extended endothelial cell culture method-derived brain microvascular endothelial cell : EECM-BMEC-like cell) に、本研究で同定した候補遺伝子 X の機能を阻害する小分子 (Compound A~D) もしくは DMSO (control) を作用させた。BBB 構成内皮細胞は chamber slide に Compound もしくは DMSO の存在下に培養し、既報 [6, 8] 同様に固定、免疫染色を行い、tight junction である claudin-5 と adherence junction である VE-cadherin の発現を検討した。小分子の透過性の検討は、両者を既報 [6, 8] 同様に cell culture insert に培養し、6 日後に sodium fluorescein (NaFl、分子量 376 Da) の透過性を検討した。

結果および考察

1. MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞には健常人に比べて 400 以上の発現変動遺伝子が存在する。

MS 患者での BBB 破綻に関与する候補遺伝子を同定するために、患者由来 iPS 細胞から BBB 構成内皮細胞を分化

誘導し、トランスクリプトーム解析を行った。健康人に比べ MS では恒常下で 400 以上、炎症性サイトカインの刺激下で約 280 の発現変動遺伝子が存在した。恒常下での発現変動遺伝子を基にした reactome pathway analysis を用いて MS で障害されている pathway を複数同定した (非提示)。そのうち、2 つの pathway に関しては MS との関連や BBB の機能維持について過去に報告されていた (文献省略)。また、発現変動遺伝子の解析結果から、遺伝子多型が MS 感受性遺伝子と報告されている候補 X が MS で優位に低下していることを同定した (文献省略)。

2. 候補 X を阻害する小分子の投与により健康人由来 BBB 構成内皮細胞にも MS 同様の BBB 破綻が再現できる。

候補 X の BBB 構成内皮細胞における機能を解析するために、健康人由来 BBB 構成内皮細胞 (EECM-BMEC-like) に候補 X の機能を阻害することが知られている複数の小分子 (Compound A~D) を作用させた。いずれの小分子も adherence junction である VE-cadherin の発現は変化させずに細胞間結合は保たれていた (図 1)。興味深いことに、Compound A と B が BBB 構成内皮細胞の tight junction である claudin-5 を破綻させたのに対し、同様に候補 X を阻害することが知られている Compound C と D では claudin-5 の破綻がみられなかった (図 1)。候補 X には複数の機能が知られており、小分子毎に阻害様式が異なることにより、下位のシグナル伝達が変わり、claudin-5 破綻の程度に差が出るのが推察された。

次に、tight junction を破綻させることが半明した Compound A が BBB の重要な機能である小分子の透過性を変化させるかを検証した。0.4 μ m pore の cell culture insert に EECM-BMEC-like cell を Compound A もしくはコントロールとして使用した DMSO の存在下に培養し、十分にコンフルエントになった培養 6 日後に、小分子である sodium fluorescein (NaFl : 分子量 376 Da) の透過性を検討した。Compound A を作用させた健康人由来 BBB 構成内皮細胞では、小分子の透過性が優位に高かった (図 2)。この結果は、BBB 構成内皮細胞を人工的に操作することで健康人由来 BBB 構成内皮細胞にも MS 患者でみられる BBB 破綻が再現できることを示している。今後は Compound 毎の違いを検討することで、候補 X が BBB 機能に与えるより詳細な分子メカニズムとその下位シグナルを同定する。以上により、1) BBB を強固にするという治療戦略の確立や、2) 一過性に BBB を破綻させる (BBB を開く) ことで中枢神経内に薬物を届ける drug delivery への応用が期待される。

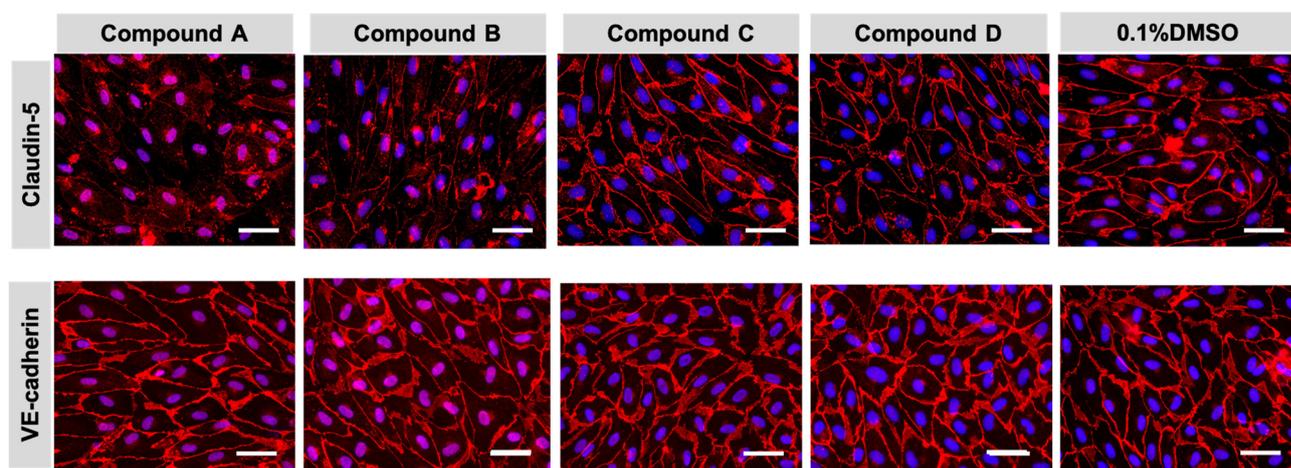


図 1. MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞から同定した候補 X による BBB 破綻 chamber slide に候補 X を阻害する複数の小分子 (Compound A~D) とコントロール (DMSO) を作用させた健康人由来 BBB 構成内皮細胞を培養した。tight junction である claudin-5 と adherence junction である VE-cadherin の免疫染色 (赤色) を示す。核は DAPI で染色した (青色)。スケールバー : 50 μ m。

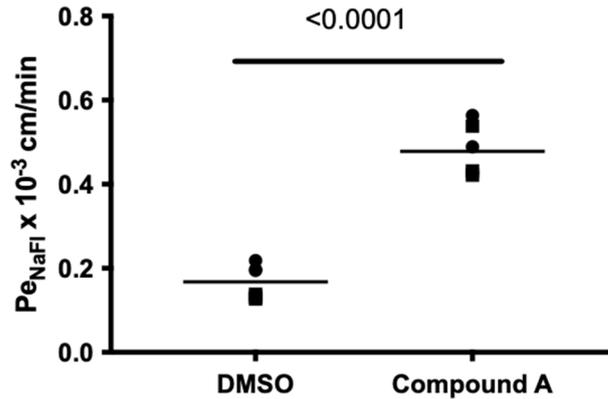


図2. Compound A による健康人由来 BBB 構成内皮細胞の小分子透過性の変化
 0.4 μ m poreのcell culture insertに候補Xを阻害する小分子 (Compound A) とコントロール (DMSO) を作用させた健康人由来BBB構成内皮細胞を6日間培養し、sodium fluorescein (NaFl) に対する透過性を測定した。P<0.0001 (t検定)。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、山口大学大学院医学系研究科臨床神経学講座の松尾欣哉医師である。

文 献

- 1) Lake, B.B., et al., Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nat Biotechnol*, 2018. 36(1): p. 70-80. PMID: 29227469 DOI: 10.1038/nbt.4038
- 2) Song, H.W., et al., Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 12358. PMID: 32704093 DOI: 10.1038/s41598-020-69096-7
- 3) Lippmann, E.S., et al., Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2012. 30(8): p. 783-91. PMID: 22729031 DOI: 10.1038/nbt.224
- 4) Qian, T., et al., Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Sci Adv*, 2017. 3(11): p. e1701679. PMID: 29134197 DOI: 10.1126/sciadv.1701679
- 5) Lu, T.M., et al., Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. 118(8). PMID: 33542154 DOI: 10.1073/pnas.2016950118
- 6) Nishihara, H., et al., Advancing human induced pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier models for studying immune cell interactions. *Faseb j*, 2020. 34(12): p. 16693-16715. PMID: 33124083 DOI: 10.1096/fj.202001507RR
- 7) Nishihara, H., et al., Intrinsic blood-brain barrier dysfunction contributes to multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*, 2022. 145(12): p. 4334-4348. PMID: 35085379 DOI: 10.1093/brain/awac019
- 8) Nishihara, H., et al., Differentiation of human pluripotent stem cells to brain microvascular endothelial cell-like cells suitable to study immune cell interactions. *STAR Protocols*, 2021. 2(2). PMID: 34151293 DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100563