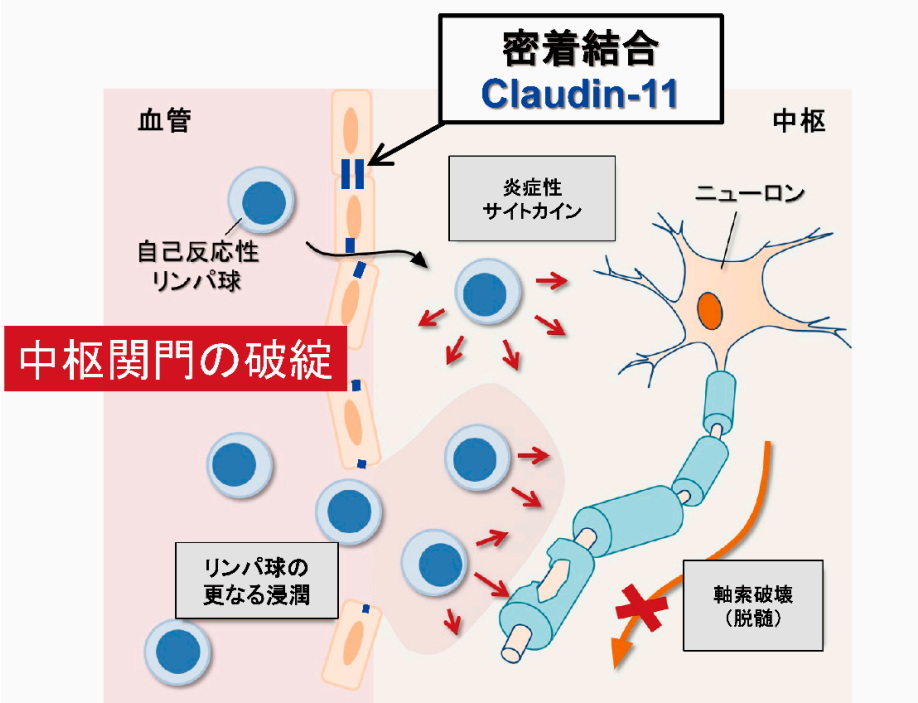
108　多発性硬化症における中枢関門崩壊の分子機構の解明	内田　康雄

【目的】本研究では、「中枢関門における役割がわかっていない Claudin-11 分子が、中枢関門の密着結合形成に重要な役者であり、多発性硬化症における中枢関門のバリアー機能破綻の原因分子である」という仮説を証明することを目的とした。

【方法】改良型 SWATH（sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra）法によって中枢関門に発現する密着結合分子 claudin サブタイプを探索し、QTAP（Quantitative Targeted Absolute Proteomics）法によって claudin サブタイプの絶対発現量を計測した。市販されている目的分子の特異抗体を用いて、定法に従い、免疫組織学的染色解析およびウェスタンブロット解析を行った。中枢の内皮系バリアーのモデルとしてヒト脳毛細血管内皮細胞株（hCMEC/D3 細胞）を、中枢の上皮系バリアーのモデルとして脈絡叢上皮細胞株（TR-CSFB 細胞）を用いて、claudin サブタイプの密着結合形成への寄与を計測した。

【結果】ラットから単離した脳毛細血管において、全 claudin family の中で claudin-5 と claudin-11 のみのタンパク質発現が検出された。Claudin-11 のタンパク質絶対発現量は、ラット及びヒト脳毛細血管において、claudin-5（従来から知られている血液脳関門の主要密着結合分子）と比較してそれぞれ 1.0 倍及び 2.8 倍多く、定量的な観点から（特にヒトで）claudin-11 の重要性が示唆された。免疫組織学的解析によって、脳毛細血管内皮細胞だけでなく他の中枢関門を構成する脊髄毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞およびクモ膜にも発現することが示された。Claudin-11 発現の特異的ノックダウンによって、細胞膜非透過性物質である FITC-dextran の細胞間透過性が上昇し、claudin-11 が中枢の内皮系バリアー及び上皮系バリアーの両方の密着結合形成に寄与していることが示された。*In vivo* のヒトの血液脳関門における claudin-11 の寄与率は claudin-5 とほぼ同程度であると推定された。多発性硬化症の患者では脳毛細血管および脊髄毛細血管、多発性硬化症モデルマウスではそれらに加えてクモ膜において、claudin-11 の発現低下が示された。結論として、claudin-11 は複数の中枢関門の密着結合形成に重要な分子であり、その発現低下が多発性硬化症におけるそれら中枢関門の破綻の原因の一つであることが本研究によってはじめて明らかとなった。

多発性硬化症の中枢関門崩壊における Claudin-11 の関与



108. 多発性硬化症における中枢関門崩壊の分子機構の解明

内田　康雄

東北大学 大学院薬学研究科 薬物送達学分野

Key words：多発性硬化症，中枢関門，密着結合，Claudin-11，定量プロテオミクス

緒　言

多発性硬化症（MS）は、若年成人において最も患者数の多い神経障害性疾患である。中枢の関門組織の崩壊がきっかけで自己反応性リンパ球が中枢組織に浸潤し神経や脊髄の破壊（脱髄）を引き起こす。関門崩壊の分子機構は未だ十分に解明されていない。最近、免疫反応を抑制する薬など少しずつ治療法が出つつあるが、対症療法に留まっている。疾病の根本原因である関門の破綻機構を解明し、破綻を防止できる根本的治療の確立が求められている。

我々は、独自開発したタンパク質絶対定量法を用いて、ヒト脳毛細血管と脈絡叢においてClaudin-11蛋白質が発現することを初めて発見し、その絶対発現量は全密着結合分子の中で最大であり、Claudin-5 や 3 よりも大きいことを示した［1］。我々は、「Claudin-11が、中枢関門において重要な密着結合分子であり、多発性硬化症の関門破綻の原因であるのではないか」との仮説を着想するに至った。

本研究では、「中枢関門における役割がわかっていないClaudin-11分子が、中枢関門の密着結合形成に重要な役者であり、多発性硬化症における中枢関門のバリアー機能破綻の原因分子である」という仮説を証明することを目的とした。本研究成果は、論文公表している［2］。

方法、結果、考察

1.　中枢関門における密着結合分子 Claudin の発現解析

血液脳関門の密着結合においてどの claudin サブタイプが重要な役割を果たしているかを調査するために、独自の網羅的定量プロテオミクス（改良型SWATH（sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra）法）によってラット脳毛細血管画分を用いた発現探索を行った。その結果、claudin-5（中枢の内皮系関門の密着結合形成に寄与することがすでに知られている分子）に加えてclaudin-11のタンパク質発現が検出された。その他のclaudinサブタイプは検出されなかった。従来の mRNA 発現解析では、claudin-11 の発現量は他の claudin サブタイプに比べて低く着目されてこなかった。独自の Quantitative Targeted Absolute Proteomics（QTAP）解析の結果、血液脳関門において、ラットでは claudin-5 と同程度、ヒトでは claudin-5 よりも有意に大きい発現量であることが明らかとなり（図 1）、本実験によってはじめてclaudin-11が中枢関門の密着結合形成において重要な役割を果たしている可能性が出てきた。Claudin-11 はオリゴデンドロサイトに発現することから、血管内皮細胞における発現を検証した結果、ヒト脳毛細血管内皮細胞株における高発現が観察され、また、ヒト脳切片において血管内皮マーカーのclaudin-5と血管においてシグナルがマージしたことから、血管内皮細胞に発現することが示された（図 1）。

血液脊髄関門においても同様にclaudin-11の発現が示された。興味深いことに、claudin-11のタンパク質発現量は、血液脳関門に比べて有意に小さいことが示された。これは、血液脊髄関門の密着結合の強度が血液脳関門に比べて弱いという過去のデータと一致した結果であった。

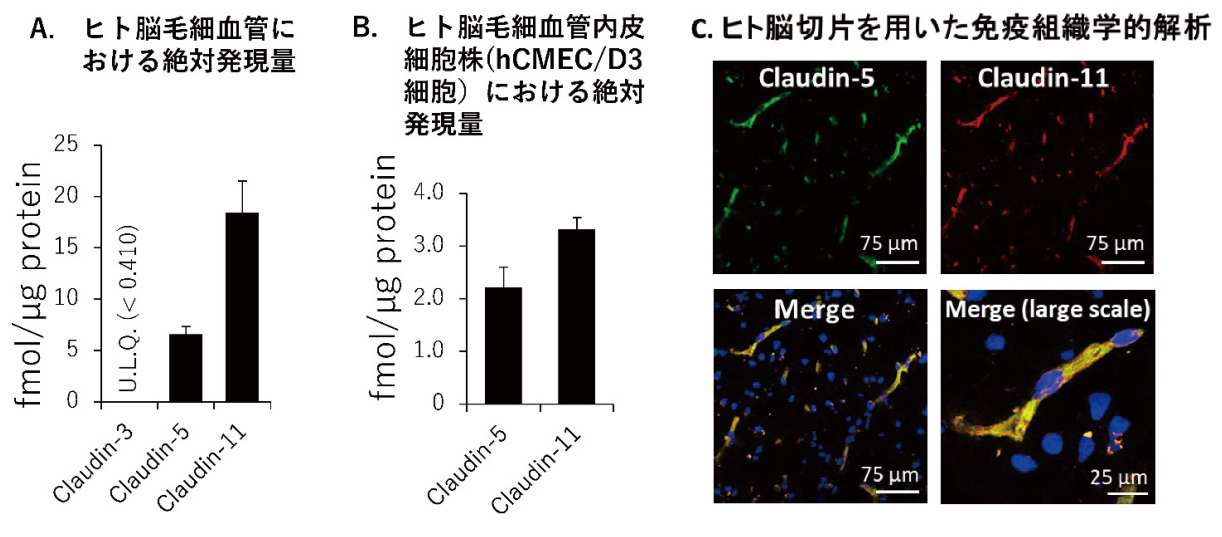


図 1. 血液脳関門における claudin-11 の発現

A） ヒト大脳から単離した血管資料を用いて QTAP 法によって絶対発現量を測定した。

B） ヒト脳毛細血管内皮細胞株（hCMEC/D3 細胞）における絶対発現量を QTAP 法によって測定した。

C） ヒト脳切片における claudin-5 と claudin-11 の共染色。

2. 多発性硬化症における血液脳関門及び血液脊髄関門の claudin-11 の発現

多発性硬化症患者（図 2）および多発性硬化症モデルマウス（EAE マウス）の脳および脊髄の血管（血管マーカーの Glut1 との共染色）において claudin-11 の発現が顕著に低下することが示された。複数の血管を用いて発現量の低下率を定量したところ、脊髄血管における低下率は脳血管に比べて大きかった。脊髄血管では、正常時における claudin-11 の絶対発現量も脳血管に比べて小さいため、多発性硬化症の病態では、脊髄関門における claudin-11 の発現量は極めて低いことが示唆された。これは多発性硬化症の神経傷害が脳よりも脊髄で顕著であることと相関しているため、多発性硬化症における関門崩壊に claudin-11 の発現低下が寄与している可能性を示唆している。

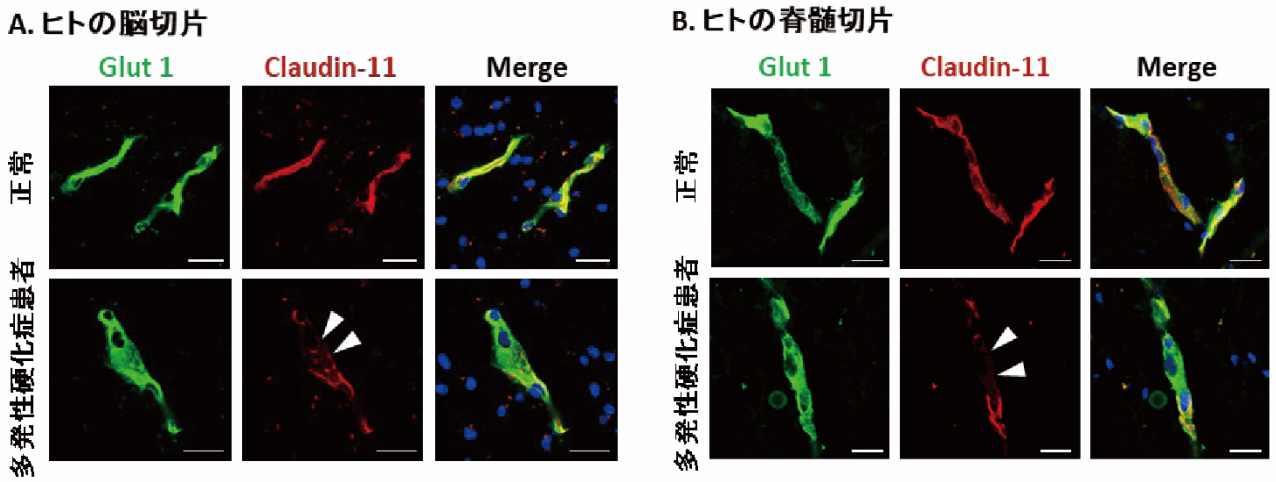


図 2. 多発性硬化症患者の血液脳関門及び血液脊髄関門の claudin-11 の発現低下

A） ヒトの正常の前頭葉の切片（男性、49 歳、Caucasian）、多発性硬化症患者の前頭葉の切片（男性、64 歳、Caucasian）。

B） ヒトの正常の脊髄の切片（男性、59 歳、Caucasian）、多発性硬化症患者の脊髄の切片（男性、64 歳、Caucasian）。スケールバー：25μm。矢じり、血管部における Claudin11 のシグナルの低下箇所。

3. 多発性硬化症における血液クモ膜関門及び血液脳脊髄液関門の claudin-11 の発現

中枢の上皮系バリアーである脳脊髄液関門（脈絡叢上皮細胞）と血液クモ膜関門について、多発性硬化症モデル（EAE）マウスで claudin-11 の発現量が低下しているか否かを解析した結果、脳脊髄液関門では発現の変動は観察されなかった。対照的に、血液クモ膜関門については、脳・脊髄を問わず、正常時に観察されていた軟髄膜上の claudin-11 のシグナルが、EAE マウスでは消失したことから（図 3）、多発性硬化症の病態において claudin-11 の発現が低下することが示唆された。発現が消失していた部位において細胞の浸潤が観察された（図 3、矢印部位）。CD3e 抗体を用いて染色した結果、その浸潤はリンパ球の浸潤であることが示された。

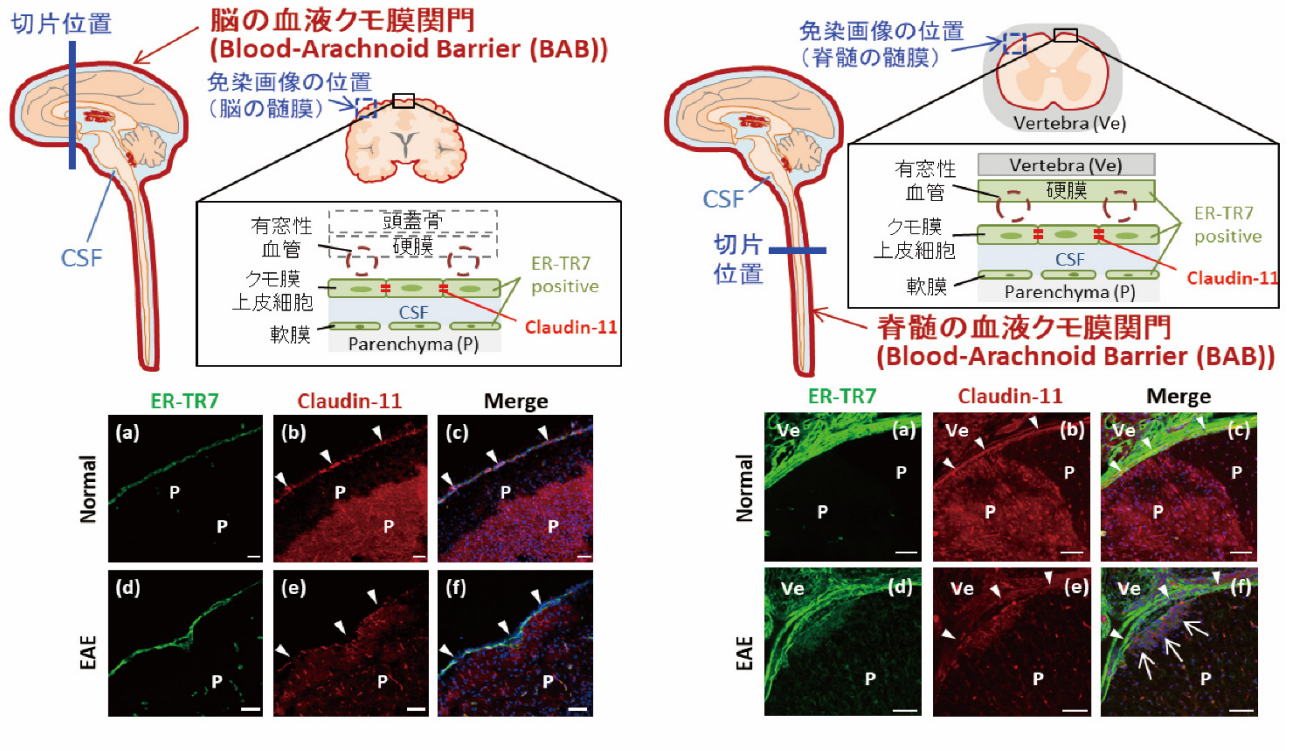


図 3. **多発性硬化症モデルマウスの血液-クモ膜関門における claudin-11 の発現低下**

左図）多発性高箇所モデル（EAE）マウスと正常マウスの脳切片を用いた Claudin11 と軟髄膜マーカーER-TR7 の共染色。

右図）多発性高箇所モデル（EAE）マウスと正常マウスの脊髄切片を用いた Claudin11 と軟髄膜マーカーER-TR7 の共染色。

スケールバー：75 μ m。矢じり、クモ膜の位置。矢印、細胞の浸潤が観察される場所。

4. 中枢関門の密着結合形成における claudin-11 の寄与

これらの内皮系および上皮系の中枢関門における claudin-11 の発現低下によって関門の強度が低下しているか否かを明らかにするために、siRNA による発現低下処理によって細胞膜非透過性物質 FITC-dextran のパラセルラー透過性が亢進するか否かを検証した。その結果、内皮系バリアーである脳毛細血管内皮細胞（hCMEC/D3 細胞）および上皮系バリアーである脈絡叢上皮細胞（TR-CSFB 細胞）の単層膜において、ともに FITC-dextran の透過性が有意に上昇した（図 4）。従って、claudin-11 は、中枢関門の密着結合形成に寄与する分子であり、その発現低下は関門のバリアー強度を低下させることが明らかとなった。*In vitro* 系と *in vivo* のヒト脳毛細血管の claudin-11 のタンパク質絶対発現量の違いに基づいて *in vivo* 血液脳関門での密着結合形成に対する claudin-11 の寄与を算出した結果、claudin-5 とほぼ同等のレベルで高いことが示された。

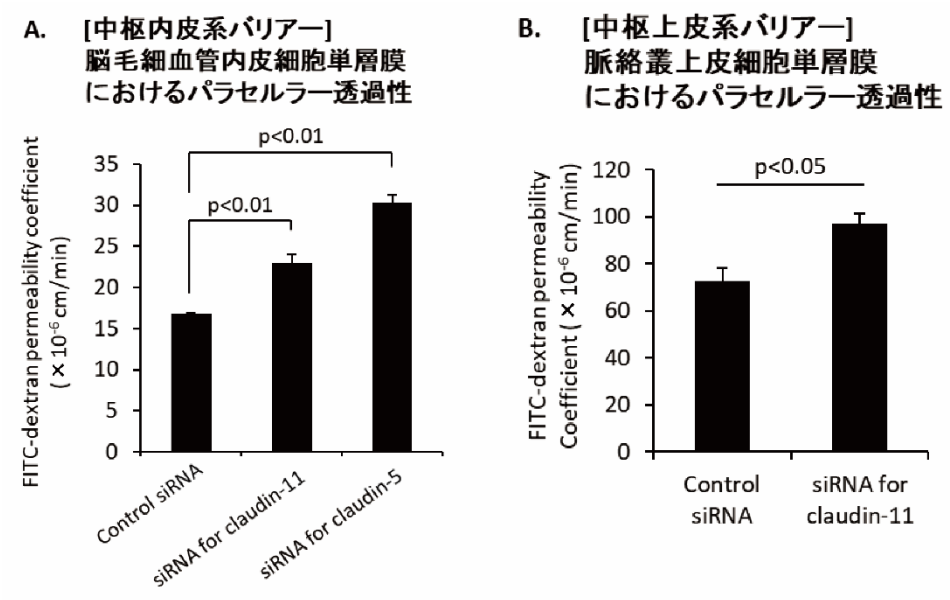


図 4. 中枢の内皮系と上皮系バリアーの密着結合形成への claudin-11 の寄与

A) Claudin11 あるいは Claudin5 に対する siRNA 処理を行った脳毛細血管内皮細胞単層膜における細胞膜非透過性分子 FITC デキストランの透過性の上昇。

B) Claudin11 に対する siRNA 処理を行った脈絡叢上皮細胞単層膜における細胞膜非透過性分子 FITC デキストランの透過性の上昇。

グラフ上の P 値は、Dunnett テストあるいは Student's t-test によるものを示している。

5. アンドロジェンによる関門崩壊抑制メカニズムにおける claudin-11 の関与

多発性硬化症の関門崩壊の程度は、生体内のアンドロジェンのレベルに反比例する。アンドロジェンによる関門崩壊抑制メカニズムに claudin-11 が関与しているか否かを明らかにするために、アンドロジェン処理によって claudin-11 の発現と細胞膜局在が回復するか否かを hCMEC/D3 細胞を用いて検証した結果、EAE マウス血清の処理で観察された claudin-11 の内在化・発現消失は、アンドロジェンの追加処理によって有意に阻害された。

謝 辞

本研究は、上原記念生命科学財団研究奨励金の支援の下、達成されたものであります。この場をお借りして心より御礼申し上げます。

文 献

1) Uchida Y, Zhang Z, Tachikawa M, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of rat blood-cerebrospinal fluid barrier transporters: comparison with a human specimen. J Neurochem. 2015 Sep;134(6):1104-15. doi: 10.1111/jnc.13147. PubMed PMID: 25951748.

2) Uchida Y, Sumiya T, Tachikawa M, Yamakawa T, Murata S, Yagi Y, Sato K, Stephan A, Ito K, Ohtsuki S, Couraud PO, Suzuki T, Terasaki T. Involvement of Claudin-11 in Disruption of Blood-Brain, -Spinal Cord, and -Arachnoid Barriers in Multiple Sclerosis. Mol Neurobiol. 2019 Mar;56(3):2039-2056. doi:10.1007/s12035-018-1207-5. PubMed PMID: 29984400.