

報道機関各位

【2024年12月13日】

山口大学
慶應義塾大学

ALS 患者における血液脳関門破綻の解明につながる新たなモデルを開発！ ～これまでとは全く異なる標的に対する新しい治療法開発への期待～

【発表のポイント】

- ・ iPS 細胞技術を活用して、家族性 ALS 患者（*TARDBP* 変異¹）由来の脳微小血管内皮様細胞を作製し、バリア機能を詳細に検討しました。
- ・ 家族性 ALS 患者が有する遺伝的背景が血液脳関門（Blood-brain barrier : BBB²）の異常につながることをヒトのモデルで初めて示し、ALS の進行に BBB 破綻が関与する可能性を提示しました。
- ・ ALS の病態に関する新しい知見として、この脳血管内皮細胞のバリア機能異常が炎症や神経細胞の損傷とは独立して起こっていることを証明しました。
- ・ バリア機能異常の背景に BBB の発達・維持に重要な Wnt/ β -カテニンシグナルの低下があることを突き止め、同シグナル経路³の活性化でバリアが修復されることを確認しました。

【概要】

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は、運動機能を司る神経細胞が次第に壊れていく難治性の病気ですが、未だ有効な治療法がありません。近年の動物モデルを用いた研究によってその進行には脳を守るバリアである「血液脳関門（Blood-brain barrier : BBB）」の異常が関与していることが分かってきました。今回、山口大学大学院医学系研究科の西原秀昭助教らの研究チームは、慶應義塾大学、東北大学大学院医学系研究科の研究グループとの共同研究で家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞を使った新しいヒト BBB 実験モデルを確立し、このバリア機能が家族性 ALS 患者のもつ遺伝的背景から影響を受ける可能性を明らかにしました。

この研究では、家族性 ALS 患者から BBB を構成する「脳微小血管内皮細胞（Brain microvascular endothelial cell : BMEC⁴）」をつくり、バリア機能を詳しく調べた結果、患者由来の細胞ではバリア機能に異常があり、外部からの有害物質が脳に侵入するリスクが高まることが確認されました。さらに、この脳血管内皮細胞のバリア機能異常は炎症や神経細胞の損傷とは独立して起こっており、ALS の病態に関する新しい知見を示すものです。

また、研究チームは、患者由来 BMEC 様細胞の異常を修復する方法として、「Wnt/ β -カテニンシグナル」を活性化することで、バリア機能が改善されることを

示しました。これにより、本モデルが ALS 患者におけるバリア機能異常に対する治療薬の探索にも有用であることが示され、新たな治療法の開発が進むことが予測されます。

本研究は、ALS における BMEC の役割を解明し、治療に向けた新しいアプローチを示した点で重要な成果です。この研究結果は、*Frontiers in Cell and Developmental Biology* 誌に 2024 年 8 月 15 日付で掲載されました。

【研究の背景】

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、運動神経が徐々に死滅していく進行性の神経変性疾患です。その中でも特定の遺伝子変異が ALS 発症に関与していることが知られており、ALS の病態を解き明かす手がかりと考えられています。これまでの研究は遺伝子変異と神経細胞の関連性に偏重してきましたが、未だ謎の多い ALS の病態を解き明かすためには、神経以外の細胞における変異の影響についても研究が必要です。血液脳関門 (Blood-brain barrier : BBB) は脳と血液の間に存在するバリアで、脳を保護し恒常性を維持する役割を担っています。この BBB は、脳微小血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cell : BMEC) を中心に構成されています。BMEC はタイトジャンクション (細胞間の緊密な結合) を形成して、脳内への物質の通過を厳密に制御したり接着因子の発現を調整して免疫細胞が脳内に侵入することを制御しています。

本研究では、山口大学大学院医学系研究科の西原秀昭助教らの研究チームは、慶應義塾大学、東北大学大学院医学系研究科の研究グループと共同で、家族性 ALS 患者 (TAR DNA Binding Protein: *TARDBP* 変異保有) から得られた iPS 細胞を用いて BMEC 様細胞を作製し、BMEC の異常がどのように ALS の進行に関わっているかを調べました。

【研究の成果】

家族性 ALS 患者 (*TARDBP* 変異保有) 由来の iPS 細胞を BMEC 様細胞に分化させた結果、健常者の細胞と比べ、タイトジャンクションの破綻が目立ち、バリア機能が有意に低下している (血液成分が脳内に漏れやすい) ことが確認されました。また、免疫細胞が脳に入り込む際に働く接着分子 ICAM-1 や VCAM-1 の発現が増加し、より多くの免疫細胞を接着させる能力を有していることがわかりました。さらには、家族性 ALS 患者由来の BMEC 様細胞では ALS 患者で観察される病理所見に類似した TDP-43 蛋白の異所性局在が観察されたことから、本モデルが ALS 患者の BMEC を模していることが示されました。加えて、家族性 ALS 患者由来の BMEC 様細胞において、BBB の発達・維持に重要であることが知られている Wnt/ β -カテニン経路の下流分子の発現が低下していることを見出しました。これらは先行する動物モデルを使用した報告や ALS 患者脳 of 遺伝子発現解析の結果とも一致していますが、実験室に患者由来モデルを再現し、ヒトでこの現象を確認した初めての報告です。本研究ではさらに Wnt/ β -カテニン経路を化合物によって活性化することで、ALS 患者由来 BMEC のタイトジャンクションの破綻や VCAM-1 の発現亢進が回復し、バリア機能が改善されることが確認されました。ヒトと動物では BBB 構成タンパクの発現が異なっており、今回、患者由来モデルを作製し、治療の可能性を示せたことは、より詳細な ALS 患者のバリア機能破綻の病態を解明する上で重要な報告といえます。

【意義と展望】

この研究は、家族性 ALS 患者 (*TARDBP* 変異保有) が生来的に血液脳関門 (BBB) の脆弱性を有していることをヒトモデルで初めて示しました。実際の患者サンプルの採取が難しい BMEC を、独自の iPS 細胞技術を用いてモデル化し、病理所見と類似した表現型を再現することを示しました。ALS 患者の BMEC 機能研究と BBB を標

的とした治療薬の探索に有用なモデルであり、BBBの修復による病状の進行抑制という新たな治療戦略がALSにもたらされることが期待されます。

【用語解説】

用語1 TARDBP (TAR DNA binding protein)

TARDBPは、RNA結合タンパク質であるTDP-43 (TAR DNA binding protein 43)をコードする遺伝子で、ALSや前頭側頭型認知症などの神経変性疾患に関連する変異が知られています。TDP-43は細胞の核内に主に存在し、RNAのスプライシングや輸送などに関与し、その異常が神経細胞の機能不全を引き起こすと考えられています。ALS患者では細胞室内にTDP-43蛋白が異常に蓄積して凝集体を形成していることが知られています。

用語2 血液脳関門 (Blood-brain barrier : BBB)

血液脳関門は、脳の微小血管が有する恒常性維持を司る重要な機能です。外部の有害物質や病原体から脳内の神経細胞を守り、無秩序な免疫細胞の侵入を防ぐと同時に、中枢神経内の細胞に必要な栄養素を積極的に取り込む役割を果たしています。ALSのような神経変性疾患では、このバリアが破壊されることで病気の進行に影響を与えることが明らかになってきています。

用語3 Wnt/ β -カテニン経路

Wnt/ β -カテニン経路は、細胞の発達や増殖、分化に関わるシグナル伝達経路で、BBBの発達・維持にも重要であることが知られています。

用語4 脳微小血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cell : BMEC)

BMECはBBBの主要構成細胞であり、細胞間にタイトジャンクションを形成し、物質の脳内侵入を制限します。また、BMECは脳に必要な栄養素や物質を選択的に輸送する特異的トランスポーターを備えています。さらにICAM-1やVCAM-1といった細胞接着因子を発現し、免疫細胞の脳内侵入を制御しており、BBBの機能維持の中心的な役割を持つ細胞です。

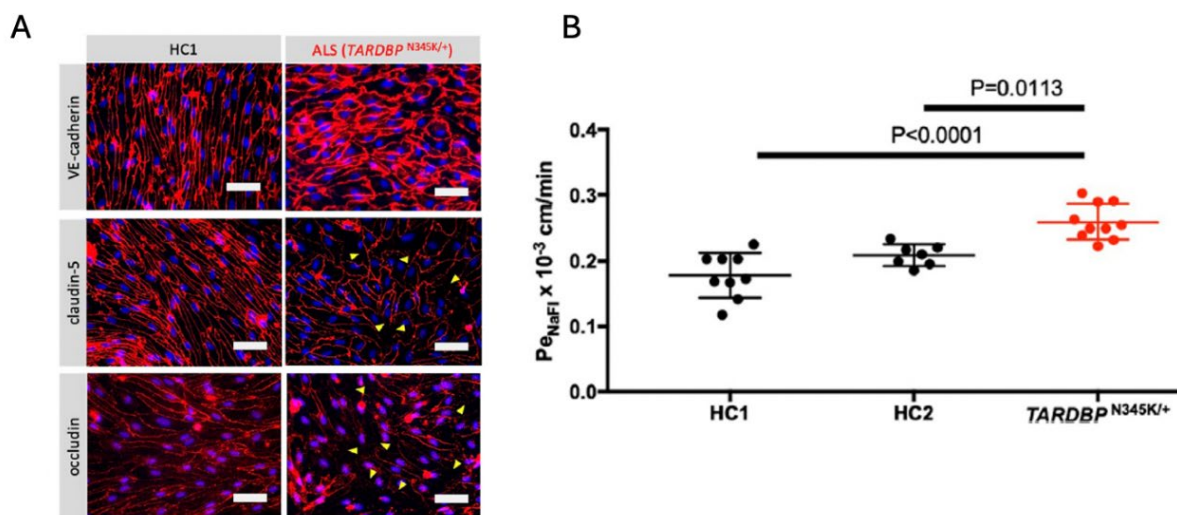


図 1A : ALS 患者 (TARDBP^{N345K/+}) 由来の BMEC 様細胞と健常者 (HC1) 由来 BMEC 様細胞を比較。ALS 患者由来の細胞は、VE-cadherin (接着結合構成蛋白) の破綻はないが、claudin-5 および occludin (タイトジャンクション構成蛋白) の破綻 (黄色矢印) が観察された。

図 1B : ALS 患者由来 BMEC 様細胞は高い小分子透過性を示す。蛍光小分子を用いて BMEC 様細胞のバリア機能 (透過性) を測定。ALS 患者 (TARDBP^{N345K/+}) 由来の細胞は、健常者由来の細胞に比べて蛍光小分子の透過性が有意に高く、タイトジャンクションの破綻が機能的に現れている。

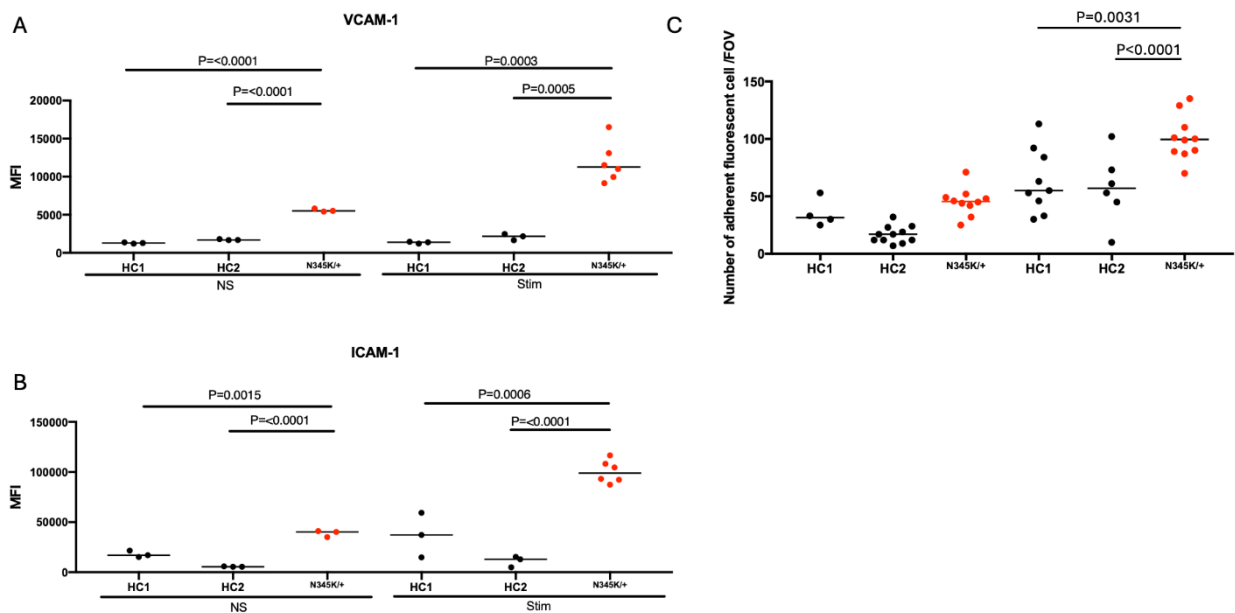


図 2A,B : ALS 患者 ($TARDBP^{N345K/+}$) 由来の BEC 様細胞は、免疫細胞の中枢神経内への浸潤を制御している ICAM-1 および VCAM-1 の発現が健常者由来の細胞に比べて増加している。炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ) の刺激 (Stim) により、VCAM-1 の発現がさらに増加することが確認された。

図 2C : 炎症性サイトカインの刺激 (Stim) により、ALS 患者由来の BEC 様細胞には、健常者由来の細胞よりも多くの免疫細胞が接着した。

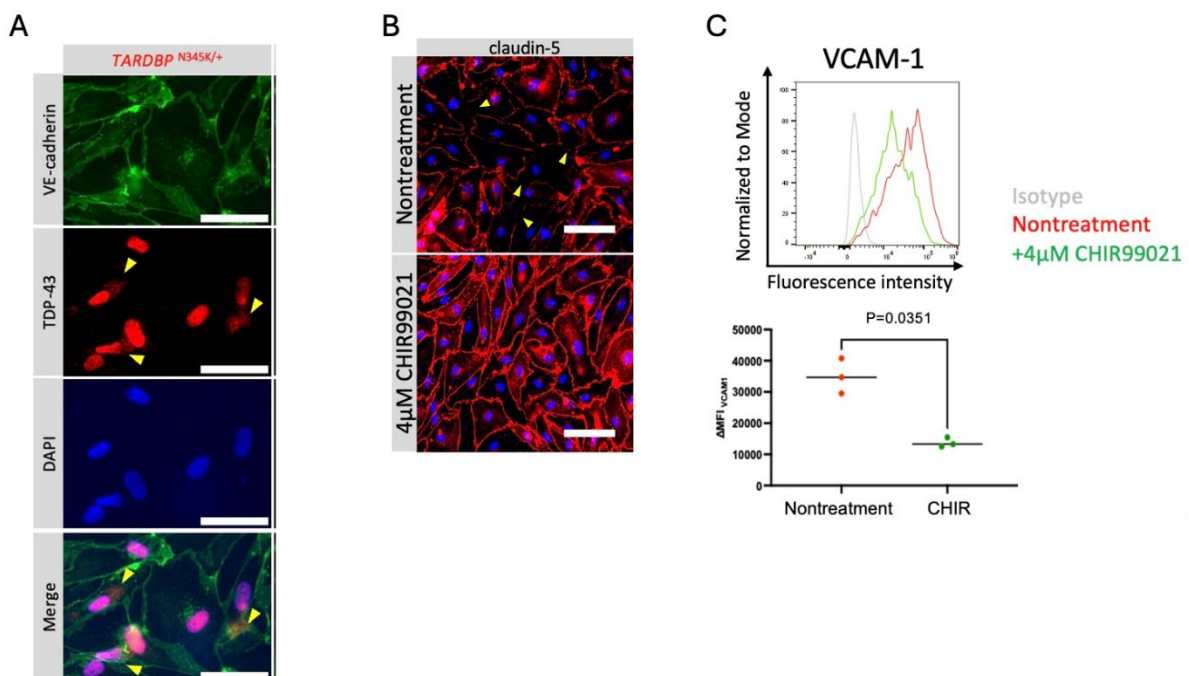


図 3A : ALS 患者 ($TARDBP^{N345K/+}$) 由来の BEC 様細胞では、TDP-43 が細胞質内に異常に局在している様子 (黄色矢印) が確認された。

図 3B : Wnt/ β -カテニンシグナルの活性化剤 CHIR99021 の投与により、ALS 患者由来の BEC 様細胞で破綻していた (黄色矢印) タイトジャンクション

(claudin-5) が修復した。

図 3C : CHIR99021 の投与により、ALS 患者由来の細胞表面で増加していた VCAM-1 の発現が抑制された。

【論文情報】

論文名 : Establishment of a novel amyotrophic lateral sclerosis patient (TARDBP N345K/+)-derived brain microvascular endothelial cell model reveals defective Wnt/ β -catenin signaling: investigating diffusion barrier dysfunction and immune cell interaction.

掲載誌 : Frontiers in Cell and Developmental Biology

著者 : Matsuo K et al.

掲載日 : 2024 年 8 月 15 日

DOI : 10.3389/fcell.2024.1357204

【謝辞】

本研究は、上原記念財団、JSPS スイスとの国際共同研究プログラム（グラント番号 JPJSJRP20221507）、卓越研究員制度、科研費（グラント番号 22K15711）、創発的研究支援事業（グラント番号 JPMJFR2269）、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム（グラント番号 JP23bm1423008）、AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム筋萎縮性側索硬化症における病態回避機構の解明と治療に資する層別化技術開発、再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム革新的 RNA 編集技術を用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療開発、脳とこころの研究推進プログラム孤発性筋萎縮性側索硬化症の双方向トランスレーショナル研究による病態介入標的の同定と核酸医薬の開発研究、「ゲノム創薬基盤推進研究事業 RNA 標的医薬創出に資する、疾患 RNA 分子完全長一次構造に関するデータ基盤の構築」、難治性疾患実用化研究事業患者レジストリを活用した沖縄型神経原性筋萎縮症のエビデンス創出研究、武田 COCKPI-TR ファンディング、2022 iPS アカデミアジャパングラント、ライフサイエンス振興財団、加藤記念バイオサイエンス財団、宮田幸比古記念 ALS 研究財団、武田科学振興財団、JSPS 科研費 JP20H00485, JP21H05278, JP22K07500, JP22K15736 の支援を受けました。

【お問合せ先】

<研究に関すること>

山口大学大学院医学系研究科 臨床神経学講座

松尾欣哉 西原秀昭

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1

Tel : 0836-22-2719

E-mail : matsuok@yamaguchi-u.ac.jp

<報道に関すること>

山口大学医学部総務課広報・国際係

Tel : 0836-22-2009

E-mail : me268@yamaguchi-u.ac.jp