

「脳を守る」

平成10年度採択研究代表者

寺崎 哲也

(東北大学未来科学技術共同研究センター 教授)

「脳関門排出輸送に基づく中枢解毒」

1. 研究実施の概要

末梢組織の老廃物は循環血液を介して速やかに肝臓や腎臓へ運ばれることで正常機能が維持されている。一方、脳は血液脳関門(BBB)によって異物の侵入から厳密に守られており、逆に、親水性の老廃物などを脳外に除去する効率のよいシステムがない限り、脳の高次機能は維持できなくなると考えられる。そこで研究代表者は、脳内から循環血液方向へ能動的に排出する輸送系がBBBに備っており、これが中枢機能を防御する解毒機構として機能しているという「BBB中枢解毒機構」仮説を提唱してきた。本研究は、この仮説を実証し、これまで未知のBBBの機能を明らかにすることで、従来のBBBの概念である『静的障壁』から、『解毒機構としての脳機能防御・支援システム』へと塗り替えることをねらいとしている。

血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞は、脳細胞の0.1%しか存在しない。その機能解析において、優れたin vitro実験系を開発することは重要である。温度感受性SV40 T抗原遺伝子導入動物から樹立した脳毛細血管内皮細胞などの条件的不活化細胞株の分化機能特性を解析し、in vivoの機能特性を十分に保持していることを明らかにした。これらの成果をほぼ論文発表し、in vitro BBBモデルの開発ステップは一段落した。現在、共培養条件の最適化に向けて検討中である。

脳からの排出過程をIn vivo系で解析する方法として開発したBrain Efflux Index (BEI)法を用いて、肝臓移行型及び腎臓移行型モデル基質について、血液脳関門排出輸送機能解析を行った。各々、OATP(organic anion transporting peptide)、OAT(organic anion transporter)が、血液脳関門でこれらのモデル基質を排出していることが示唆された。肝移行型基質であり、脳内ステロイドホルモンの代謝体であるデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体(DHEAS)とエストロン硫酸抱合体(E1S)については、論文発表した。腎移行型については、さらに、詳細に解析中である。

これらのモデル基質に加え、末梢組織移行性が高いにもかかわらず中枢移行性が低い薬物について解析した。その結果、血液脳関門に備わる多剤薬物排出トランスポーターP-糖タンパクが極めて多彩な薬物の脳内侵入を抑制していることが明ら

かになった。さらに、同じく多剤排出に働くMRPファミリーや、実体は明確ではないがアニオン交換輸送系と思われるトランスポーターの存在が示唆された。このような複数のトランスポーターの存在によって血液脳関門機能が維持されるものと考えられた。

今後は、新規輸送系を含めて、これらの血液脳関門輸送担体の実体を分子レベルで解明する予定である。

2. 研究実施内容

【研究目的】

本研究は、血液脳関門で機能している排出輸送系の分子機構を明らかにし、脳内の神経伝達物質やその代謝物や異物を脳内に蓄積しないように血液脳関門が解毒システムとして重要な生理的役割を果たしていることを明らかにすることを目的とする。この研究目的を達成する為に、今年度は、主として1) 新規in vitro BBB輸送実験系の確立、2) In vivo脳関門排出輸送機能の解析、3) 血液脳関門排出輸送担体の遺伝子レベルの解析について実施した。

【方法】

温度感受性SV40 large T抗原遺伝子導入動物から、脳毛細血管内皮細胞、脳星状膠細胞、脳周皮細胞、脳脈絡叢上皮細胞、網膜毛細血管内皮細胞、骨髄由来血管内皮細胞について各々33度の培養下で増殖性を示す条件的不死化細胞株を樹立し、その機能特性を解析した。各細胞株について、増殖速度の温度依存性、large T抗原の発現量に対する温度依存性を解析した。各細胞におけるマーカー分子について活性、蛋白、mRNAレベルにおいて、細胞株と単離細胞の間で比較した。さらに、輸送担体遺伝子としてGLUT1, MCT1, LAT1, mdrlaなどについてRT-PCR解析した。また、輸送機能についても3-o-methyl-D-glucoseを基質としてGLUT1の活性を評価した。

In vivo脳関門排出輸送機能については、Brain Efflux Index法を用いて解析した。この方法は、血液脳関門難透過性基質であるイヌリンを内部標準物質として用い、被験基質との二重標識混液をラット大脳Par2領域にmicro-injectionするものである。一定時間経過後の脳内残存率を時間に対してプロットして、傾きから脳関門排出速度定数を求めた。

In vitro血液脳関門モデル系として、樹立したTM-BBBを用い、基質の取り込み速度を測定し、各種阻害剤共存下の影響を解析し、血液脳関門輸送特性を明らかにした。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、輸送担体遺伝子のcRNAをmicroinjectionし20度で3-5日間培養した。基質を一定時間incubationし、取り込み量を測定し、輸送機構を解析した。

【結果及び考察】

樹立した細胞株は、いずれもin vivoの分化機能を比較的良好に保持していることが明らかになった。特に、血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞の条件的不死化細胞株について、各々マウスからTM-BBB, ラットからTR-BBBを樹立した。最も典型的な血液脳関門の輸送機能であるグルコース輸送系 (GLUT 1) については、この細胞はin vivoの約7分の1の活性を有していることが明らかになった。さらに、脳関門排出輸送担体として重要なmdr1aが発現していることが明らかになった。これらの特性は、樹立細胞株がin vivo機能を十分に保持していることを示唆しており、脳関門輸送機能解析実験系としての有用性が示された。また、脳脊髄液関門として知られる脈絡叢上皮細胞について条件的不死化細胞株TR-CSFBを樹立した。この細胞株においてマーカー酵素の局在性、及びプロリンなどを脳脊髄液から細胞内に能動的に取り込むsystem Aが頂側細胞膜においてより大きく働いていることを明らかにした。この輸送機能の極性は、in vivoの極性を反映しており、TR-CSFBも輸送機能解析研究に適していることが示された。網膜毛細血管内皮細胞、骨髄由来内皮細胞については、各々ラットからTR-iBRB, TR-BMEを樹立した。特に、骨髄由来血管内皮細胞は、脳血管障害後の血管再生機構を解析するin vitro実験系として有用である。星状膠細胞、脳周皮細胞については、各々ラットからTR-AST, TR-PCTを樹立し、いずれもin vivoの機能を保持していることを明らかにした。現在、TR-BBB, TR-AST, TR-PCTについて共培養実験条件の最適化を検討中である。

肝臓移行型の有機アニオンで脳内ステロイドホルモンの硫酸抱合体であるデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 (DHEAS) とエストロン硫酸抱合体 (E1S) について、血液脳関門を介した排出機構を解析した。両物質とも脳からの排出速度が脳内への取り込み速度より有意に大きかった。DHEASの排出過程は飽和性を示し、Km値32.6 μ Mが得られ、脳排出率 (BEI) をプロモスルフォフタレイン、タウロコール酸、コール酸、トリヨードチロシンなどが顕著に阻害した。TM-BBBに対するDHEASの取り込み実験を行ったところ、取り込みは飽和性を示し、Km値34.4 μ Mが得られ、in vivoと非常に近い値となった。TM-BBBに対するDHEASの取り込み速度をジゴキシンが顕著に阻害したことから少なくともOATP2がDHEASの血液脳関門排出過程に寄与していることが明らかになった。腎臓移行型の有機アニオンとしてインドール硫酸 (IS) をモデル基質として脳関門排出過程を解析した。さらに、血液側から腎臓上皮細胞基底膜側への取り込み過程を解析し、脳と腎臓で比較したところいずれも飽和性を示し、ベンジルペニシリンで顕著に阻害された。有機アニオン輸送担体OATを発現したアフリカツメガエル卵母細胞に対してISは顕著な取り込みを示した。ISは、腎不全時に体内

に蓄積する尿毒症物質として知られるが、このISを血液脳関門において脳から排出する輸送系としてOATが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

キノロン系抗菌薬は一般に中枢性副作用が問題となる。しかし、グレパフロキサシン (GPFX) は、末梢組織移行性が良好であるが、中枢性副作用はほとんどない。同様にH1受容体拮抗薬は眠気などの中枢性副作用が生じるが、エバスチン ebastineは他のH1受容体拮抗薬に比べ中枢性副作用がほとんどない。これら両化合物が中枢性副作用が低い原因として、脳関門において排出輸送される可能性が考えられる。そこで、両化合物をモデル基質として血液脳関門排出輸送機構を解析した。GPFXについて、*in vitro* ウシ脳毛細血管内皮の初代培養細胞ならびに血液脳関門様活性を持つラット脳毛細血管内皮不死化細胞RBEC1細胞や*in vivo* 脳灌流法、さらにP-糖タンパクをコードする*mdr1a* 遺伝子欠損マウスなどを用いた解析を行った。その結果、血液脳関門には、P-糖タンパクおよびアニオン感受性を有する排出型トランスポーターがGPFXを脳内から血液中に汲み出していることが示された。また、MRP1がGPFXを輸送することが明らかになった。既にMRP2もGPFXの膜透過に関与することが示されていることから、アニオン輸送系としては、MRPファミリーの関与が考えられた。H₁-受容体拮抗薬エバスチンは生体内で酸化代謝により両性イオン型のカレバスチン carebastine に変換され、抗アレルギー作用を発揮する。エバスチンに比べカレバスチンは非常に低い脳移行性を示した。また、両化合物ともP-糖タンパクによって脳外排出を受けていたが、カレバスチンの脳外排出にはP-糖タンパク以外のトランスポーターの関与が示唆された。さらに、血液脳関門培養細胞を用いた結果、エバスチンは特異的メカニズムによって脳内に移行することも見いだされた。従って、エバスチンに比べカレバスチンの脳移行性が低いのは、エバスチン特異的な脳内取り込み機構とカレバスチン特異的な脳外排出機構の存在により説明されるものと考えられた。

以上の実験結果から、P-糖タンパク以外に種々の輸送系が血液脳関門において脳から循環血液方向に機能していることが明らかになった。また、確立した新規*in vitro* BBBモデルは新規トランスポーターの機能解析だけでなく、新薬スクリーニング系としての応用の可能性が高いと考えられる。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

H. Asaba, K. Hosoya, H. Takanaga, S. Ohtsuki, E. Tamura, T. Takizawa, T. Terasaki : Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2, *J. Neurochem.*, 70 : 1501-1506 (2000)

K. Hosoya, K. Tetsuka, K. Nagase, M. Tomi, S. Saeki, S. Ohtsuki, H. Takanaga, N.

Yanai, M. Obinata, A. Kikuchi, T. Okano, T. Terasaki : Conditionally immortalized brain capillary endothelial cell lines established from transgenic mouse harboring temperature-sensitive SV 40 large T-Antigen gene, *AAPS, Pharmsci.*, 2, article 27(<http://www.pharmsci.org/>)

H. Asaba, K. Hosoya, T. Terasaki, Brain-to-blood efflux transport of estrone- 3-sulfate at the blood-brain barrier in rats, *Life Sci.*, 67 : 2699-2711 (2000)

T. Kitazawa, K. Hosoya, M. Watanabe, T. Takashima, S. Ohtsuki, H. Takanaga, M. Ueda, N. Yanai, M. Obinata and T. Terasaki : Characterization of the amino acid transport of new immortalized choroids plexus epithelial cell lines : A novel in vitro system for investigating transport functions at the blood-cerebrospinal fluid barrier., *Pharm. Res.*, 18 : 16-22 (2001)

K. Hosoya, M. Tomi, S. Ohtsuki, H. Takanaga, N. Ueda, N. Yanai, M. Obinata and T. Terasaki : Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat, *Exp. Eye Res.*, 72 : 163-172 (2001)

K. Hosoya, T. Takashima, K. Tetsuka, T. Nagura, S. Ohtsuki, H. Takanaga, M. Ueda, N. Yanai, M. Obinata, T. Terasaki : mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines : A new in vitro BBB model for drug targeting, *J. Drug Targeting*, 8 : 357-370 (2001)

K. Hattori, M. Muta, M. Toi, H. Iizasa, M. Shinsei, T. Terasaki, M. Obinata, M. Ueda, E. Nakashima, Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV40 T-antigen gene transgenic rats, *Pharm. Res.*, 18: 9-15 (2001)

Kido, Y., Tamai, I., Okamoto, M., Suzuki, F. and Tsuji, A., Functional clarification of MCT 1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier of rats using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharm. Res.*, 17, 55-62 (2000)

Tamai, I., Yamashita, J., Kido, Y., Ohnari, A., Sai, Y., Shima, Y., Naruhashi, K., Koizumi, S., Tsuji, A., Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain owing to multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295 : 146-152 (2000)

Tamai, I., Kido, Y., Yamashita, J., Sai, Y., Tsuji, A., Blood-brain barrier transport of H₁-antagonist ebastine and its metabolite carebastine. *J. Drug Targeting*, 8, 383-393 (2001)

寺崎哲也、脳の病気を治す薬を創るために：脳の監視網・血液脳関門の働き、ま

なびの杜、東北大学、14, 4- 5 (2000)

([http : //www.bureau.tohoku.ac.jp/manabi/manabi14/mm14-45.html](http://www.bureau.tohoku.ac.jp/manabi/manabi14/mm14-45.html))

T. Terasaki, W.M. Pardridge, Targeted drug delivery to the brain;(blood-brain barrier, efflux, endothelium, biological transport) *J. Drug Target.* 8 : 353-355 (2001)

細谷健一、寺崎哲也、血液網膜関門および血液脳関門の再構築とドラッグデリバリー研究への応用、*Drug Deliv. System*, 16 : 29-38 (2001)

T. Terasaki, K. Hosoya, Conditionally immortalized cell lines as a new in vitro model for the study of barrier functions, *Biol. Pharm. Bull.*, 24 : 111-118 (2001)

Tamai, I. and Tsuji, A., Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, 89, 1371-1388 (2000)

T. Terasaki, S. Ohtsuki, H. Takanaga, K. Tetsuka, K. Nagase, K. Wakayama, I. Osawa, N. Ynai, M. Obinata, A. Kikuchi, T. Okano and K. Hosoya : Brain Barrier Function : Its Analysis and reconstitution, IN *Tissue Engineering for Therapeutic Use* 4, (Eds)Y. Ikada, Y. Shimizu, Elsevier Science B.V., pp. 95-104 (2000)