

「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未来バイオ創製分野 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解毒さ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いと考えられる。申請代表者らは、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する。

温度感受性SV40 T抗原遺伝子導入動物から、脳関門関連細胞である脳毛細血管内皮細胞、星状膠細胞、周皮細胞、脈絡叢上皮細胞などの条件的不死化細胞株を樹立した。これらの培養細胞の特性は、*in vivo*の特性を比較的良好に保持していた。引き続き、脳毛細血管内皮細胞の輸送担体と密着結合蛋白に対する星状膠細胞や周皮細胞の効果を解析中であり、最終年度までに成果をまとめる目処がたった。

血液脳関門には神経伝達物質の輸送系として、GAT2/BGT-1、NET、SERT、ATA2が発現し、各々GABA, norepinephrine, serotonin, L-prolineなどを輸送することを明らかにした。神経伝達物質の代謝物であるhomovanillic acidが尿毒症物質のindoxyl sulfateと共に血液脳関門に発現するorganic anion transporter 3 (OAT3)によって輸送されることを明らかにした。OAT3は有機アニオン性の薬物の脳排出において重要な働きを果たしていることが示唆された。さらに、血液脳関門にはcreatine transporter (CRT)が発現し、循環血液中のクレアチンを脳内へ供給していることを明らかにした。

最終年度は、ABC transporter superfamilyの血液脳関門における発現と機能を中心に解明すると共に、 β -amyloid蛋白などの脳内内因性ペプチドの血液脳関門排出輸送機構の解析を進める。

2. 研究実施内容

【目的】

本研究は、血液脳関門で機能している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「脳を守る」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。今年度は、主として1) 神経伝達として、norepinephrine、serotonin、L-proline、尿毒症物質の一種indoxyl sulfateなどについて、血液脳関門排出輸送系の実体を明らかにすることを目的とした。2) エネルギー蓄積物質としてクレアチンは非常に重要な内因性物質であり、脳内濃度は非常に高い。血液脳関門を介したクレアチン輸送機構を解明することを目的とした。3) さらに、estron-3-sulfateをモデル基質として血液脳脊髄液関門の有機アニオン輸送機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

In vivo血液脳関門排出輸送機能は、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microinjection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血液脳関門輸送機能は、樹立したマウス及びラットの条件的不死化脳毛細血管内皮細胞(各々TM-BBB及びTR-BBB)を用い、標識化合物を用いて基質の輸送速度を測定し、輸送の駆動力を解析し、各種阻害剤共存下における輸送速度の影響を解析し、輸送特性を明らかにした。血液脳脊髄液関門については、同様に、樹立したラット条件的不死化脈絡叢上皮細胞株(TR-CSFB)を同様に用いた。

輸送担体の局在性については、抗輸送担体抗体を作成し、マウス脳組織を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて局在性を解析した。

【結果・考察・結論】

脳内神経伝達物質としてnorepinephrine serotonin, dopamineは重要である。脳毛細血管内皮細胞におけるこれら神経伝達物質輸送担体の発現解析は、血液脳関門の生理的役割を明らかにする上で非常に重要である。TM-BBBを用いてRT-PCR解析を行ったところ、norepinephrine transporter (NET)、serotonin transporter (SERT)の発現が示唆されたが、dopamine transporter (DAT)は検出されなかった。さらに抗NET抗体、抗SERT抗体を用いて脳毛細血管内皮細胞膜における局在性を免疫組織化学的に解析したところ、NETは脳側細胞膜に、SERTは脳側だけでなく血液側細胞膜にも発現が示された。NETはdopamineも輸送することから、脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜には、norepinephrine, dopamine, serotoninを輸送する担体輸送系が発現していることが示唆された。脳毛細血管内皮細胞膜におけるこれらの輸送担体は、取り込みによる不活性化というよりも脳毛細血管の微小循環制御機構に関連している可能性がある。

脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜にはsystem Aと呼ばれるL-prolineなどの小型中性アミノ酸を運ぶNa⁺依存的な担体輸送系が働いていることが知られていた。TM-BBB, TR-BBB

を用いた定量的PCR解析の結果、ATA2がこのsystem Aの実体であることを明らかにした。高張条件下でTR-BBB, TM-BBBを培養したところ、system Aの活性は誘導され、ATA2のmRNAも顕著に誘導された。BEI法を用いてL-prolineを脳内に投与したところ、血液脳関門を介して循環血液中へ排出された。System Aの選択的な基質であるN-methyl aminoisobutylic acid (MeAIB)によって、この排出は阻害されたことから、ATA2は血液脳関門においてL-prolineの脳からの排出に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

腎障害時に血中濃度が増加することが知られる尿毒症物質のindoxyl sulfateについて、血液脳関門輸送機構を解析したところ、organic anion transporter 3 (OAT3)が脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜において働き、脳から循環血液方向排出輸送の重要な役割を果たしていることが明らかになった。神経伝達物質の代謝物であるhomovanillic acidは、このindoxyl sulfateと共通のOAT3を介して脳から排出されること明らかにした。さらに、種々の有機アニオン性薬物がこの輸送系を共有することが示唆された。

脳内クレアチンは循環血液中に比べてヒトでは200倍、マウスで30倍蓄積されている。これまでin situ hybridization法を用いた解析によって脳毛細血管内皮細胞にはクレアチン輸送担体(CRT)が検出されないと報告されていた。エネルギー蓄積物質としてクレアチンは非常に重要であり、脳内クレアチンの由来を明らかにすることは脳内エネルギー代謝において非常に重要である。TM-BBB及び単離脳毛細血管内皮細胞画分に対するRT-PCR, western blotting, northern blottingの解析によって、脳毛細血管内皮細胞にCRTが発現していることが示唆された。さらに、¹⁴C-creatineをマウスに静脈投与して24時間後の循環血液と組織中濃度を測定したところ、血漿中濃度に対する脳内濃度は約30倍高く、この値は内因性のクレアチンの濃度比の報告値と一致した。したがって、循環血液中のクレアチンは脳内へ移行し、脳と血液の間の平衡に達することが示された。TM-BBBを用いた¹⁴C-creatine輸送の阻害様式からCRTがその殆どのcreatine輸送活性をしめることが示唆された。さらに、抗CRT抗体を用いた免疫組織化学的解析によって脳毛細血管内皮細胞にクレアチン輸送担体が発現していることが示された。

脈絡叢上皮細胞は、血液脳脊髄液関門の実体であり、主として脳脊髄液と循環血液との物質交換の場として重要である。有機アニオン輸送系として、これまでOAT3, organic anion transporting polypeptide (oatp) 1, oatp2の発現が報告されていた。TR-CSFB及び単離脈絡叢に対するRT-PCR解析によって、oatp1は発現していなくて、oatp3が発現していることが明らかになった。さらに、抗oatp3抗体を用いて免疫組織化学的に解析したところ、ラット脈絡叢上皮細胞の脊髄液側細胞膜により濃いシグナルが検出された。TR-CSFBを用いてestrone-3-sulfateの輸送活性を解析したところoatp3が血液脳脊髄液関門において重要な働きを担っていることが明らかになった。

3. 研究実施体制

東北大学グループ

① 研究分担グループ長名

寺崎 哲也（東北大学未来科学技術共同研究センター、教授）

② 研究項目

血液脳関門排出輸送担体の分子機構の解明と組織局在性の解析

富山医科薬科大学グループ

① 研究分担グループ長名

細谷 健一（富山医科薬科大学薬学部、教授）

② 研究項目

脳関門排出輸送担体の機能解析

東京理科大学グループ

① 研究分担グループ長名

玉井 郁己（東京理科大学薬学部、教授）

② 研究項目

薬物の血液脳関門輸送の解析

共立薬科大学グループ

① 研究分担グループ長名

中島 恵美（共立薬科大学薬学部、教授）

② 研究項目

培養細胞を用いた血液脳関門輸送実験系の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

（東北大グループ）

- T. Deguchi, S. Ohtsuki, M. Otagiri, H. Takanaga, H. Asaba, S. Mori, T. Terasaki: Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int.* **61**:1760-1768 (2002)
- H. Takanaga, N. Tokuda, S. Ohtsuki, K. Hosoya, T. Terasaki: ATA2 is predominantly expressed as system A at the blood-brain barrier and acts as brain-to-blood efflux transport for L-proline. *Mol. Pharmacol.* **61**:1289-1296 (2002)
- K. Hosoya, M. Tomi, S. Ohtsuki, H. Takanaga, S. Saeki, Y. Kanai, H. Endou, M. Naito, T. Tsuruo, T. Terasaki: Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**:225-231 (2002)
- K. Wakayama, S. Ohtsuki, H. Takanaga, K. Hosoya, T. Terasaki: Localization

of norepinephrine and serotonin transporter in mouse brain capillary endothelial cells. *Neurosci. Res.* **44**:173-180 (2002)

- S. Ohtsuki, H. Asaba, H. Takanaga, T. Deguchi, K. Hosoya, Y. Otagiri, T. Terasaki: Role of Blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J. Neurochem.* **83**:57-66 (2002)
- Y. Deguchi, H. Okutsu, T. Okura, S. Yamada, R. Kimura, T. Yuge, A. Furukawa, K. Morimoto, M. Tachikawa, S. Ohtsuki, K. Hosoya, T. Terasaki: Internalization of basic fibroblast growth factor at the mouse blood-brain barrier is involved in the perlecan, a heparan sulfate proteoglycan. *J. Neurochem.* **83**:381-389 (2002)
- S. Ohtsuki, M. Tachikawa, H. Takanaga, H. Shimizu, M. Watanabe, K. Hosoya, T. Terasaki: The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**:1327-1335 (2002)
- N. Umeki, Y. Fukasawa, S. Ohtsuki, S. Hori, Y. Watanabe, Y. Kohno, T. Terasaki: mRNA expression and amino acid transport characteristics of cultured human brain microvascular endothelial cells (hBME). *Drug Metab. Pharmacokin.* **17**:367-373 (2002)
- CH. Chau, KY. Chen, HT. Deng, KJ. Kim, K. Hosoya, T. Terasaki, HM. Shih, DK. Ann: Coordinating Etk/Bmx activation and VEGF upregulation to promote cell survival and proliferation. *Oncogene.* **21**:8817-8829 (2002)
- Y. Kang, S. Ohtsuki, H. Takanaga, M. Tomi, K. Hosoya, T. Terasaki: Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by TNF- α , taurine and hypertonicity. *J. Neurochem.* **83**:1188-1195 (2002)
- Y. Deguchi, Y. Miyakawa, S. Sakurada, Y. Naito, K. Morimoto, S. Ohtsuki, K. Hosoya, T. Terasaki: Blood-brain barrier transport of a novel μ_1 -specific opioid peptide, H-Tyr-D-Arg-Phe- β -Ala-OH (TAPA). *J. Neurochem.* **84**, 1154-1161 (2003)
- S. Ohtsuki, T. Takizawa, H. Takanaga, N. Terasaki, T. Kitazawa, M. Sasaki, T. Abe, K. Hosoya, T. Terasaki: In vitro study of the functional expression of organic anion transporting polypeptide 3 at rat choroid plexus epithelial cells and its involvement in the cerebrospinal fluid-to-blood transport of estrone-3-sulfate. *Mol. Pharmacol.* **63**: 532-537 (2003)

(東京理科大)

- Y. Kido, I. Tamai, T. Nakanishi, T. Kagami, I. Hirosawa, Y. Sai, A. Tsuji:

Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab. Pharmacoki.*, **17**: 34-41 (2002)

- H. Toyobuku, Y. Sai, I. Tamai, A. Tsuji: Enhanced delivery of drugs to the liver by adenovirus-mediated heterologous expression of the human oligopeptide transporter PEPT1. *J Pharmacol Exp Ther.* **301**:812-819 (2002)
- T. Nozawa, M. Nakajima, I. Tamai, K. Noda, J. Nezu, Y. Sai, A. Tsuj, T. Yokoi: Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther.* **302**:804-13 (2002)
- R. Ohashi, I. Tamai, A. Inano, M. Katsur, Y. Sai, J. Nezu, A. Tsuji: Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein. *J Pharmacol Exp Ther.* **302**:1286-1294 (2002)
- K. Naruhashi, Y. Sai, I. Tamai, N. Suzuki, A. Tsuji: PepT1 mRNA expression is induced by starvation and its level correlates with absorptive transport of cefadroxil longitudinally in the rat intestine. *Pharm. Res.*, **19**, 1417-1423 (2002).

(共立薬科大グループ)

- T. Kitano, H. Iizasa, T. Terasaki, T. Asashima, N. Matsunaga, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M. Obinata, M. Ueda, E. Nakashima: Polarized glucose transporters and mRNA expression properties in newly developed rat syncytiotrophoblast cell lines, TR-TBTs. *J Cell Physiol.* **93**:208-218 (2002)
- H. Iizasa, SH. Bae, T. Asashima, T. Kitano, N. Matsunaga, T. Terasaki, YS. Kang, E. Nakashima: Augmented expression of the tight junction protein occludin in brain endothelial cell line TR-BBB by rat angiotensin-1 expressed in baculovirus-infected Sf plus insect cells. *Pharm Res.* **19**:1757-1760 (2002)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：国内5件、海外2件（PCT出願2件））