

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題「脳関門排出輸送に基づくアルツハイマー型痴呆症の解明と創薬」

研究期間：平成15年12月 1日～
平成21年 3月31日

寺崎 哲也
(東北大学、教授)

1. 研究課題名

“脳関門排出輸送に基づくアルツハイマー型痴呆症の解明と創薬”

2. 研究実施の概要

我が国の高齢者（65 歳以上）人口は 2400 万人、老人医療費は年間約 12 兆円であり、15 年後には、各々 3300 万人、36 兆円と予測されている。老人性痴呆症の一種アルツハイマー型痴呆症の患者は現在、60 万人と推定され、患者数は年々増加している。その発症を 5 年間遅らせるだけで数兆円の医療費抑制効果が期待できると試算されている。アルツハイマー型痴呆症に対する根本的治療薬は、まだ、開発されていない。アルツハイマー型痴呆症の原因と考えられているアミロイド蛋白 ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$) は脳内で作られているが、健常人の脳内濃度は低い。アミロイド蛋白の脳内蓄積機構を明らかにし、蓄積抑制方法を見出すことはアルツハイマー型痴呆症の根本的治療薬の開発へ結びつく重要な研究課題である。

CREST 研究課題「脳関門排出輸送に基づく中枢解毒」において、脳関門には脳機能の障害となる不要な物質を脳から循環血液方向へ排出する多様な輸送系が機能していることを明らかにしてきた。本 SORST 研究課題は、着眼点においてこの CREST 研究課題と同じであるが、より分子量の大きい脳内物質を含む脳関門排出輸送研究を発展させた課題である。 $A\beta$ の血液脳関門輸送系の実体を分子レベルで解明し、この輸送系の障害と $A\beta$ の脳内蓄積や神経毒性との関係を明かにする。本研究成果は、将来的には、「 $A\beta$ 及び神経毒性物質の血液脳関門排出輸送による中枢解毒機構を利用したアルツハイマー型痴呆症の新規治療薬開発」の突破口を開くことに繋がるものと考ええる。アルツハイマー型痴呆症の原因を解明し、その根本的治療薬を開発する研究は、神経科学領域における最も重要な課題として全世界で取り組まれている。脳内 $A\beta$ の除去機構の阻害物質は $A\beta$ の脳内蓄積を促進し、痴呆症の進行を加速するリスクファクターとなる可能性がある。これらの輸送阻害物質の脳内レベルを低下させる治療薬のシーズへ発展する可能性がある。また、神経毒性の原因の一つであるキノリン酸の解毒機構の解明は、アルツハイマー病だけでなくエイズ脳症などの神経障害を抑制する治療薬の開発へ結びつく重要な課題と考える。

これまで、西道（理化学研究所）らは、ネプリライシンなどのアミロイド蛋白分解酵素が脳内で働く為に、アミロイドが脳内に蓄積しないと報告している。また、Zlokovic（米国）や Lam（カナダ）らのグループは各々 low-density lipoprotein related protein (LRP-1) や P-糖タンパクが血液脳関門においてアミロイド蛋白を脳から血液方向へ排出輸送していると報告している。我々のグループでは、これらのいずれの機構とも異なる血液脳関門排出輸送系によって脳から消失していることを CREST 研究によって予備的に見出してきた。そこで、本プロジェクトにおいては、1) $A\beta$ 脳関門排出機構の詳細を解明し、排出輸送に関わる新規分子を同定する。2) $A\beta$ の中枢消失機構において脳関門排出機構が重要な機構であることを明らかにする。3) $A\beta$ の脳関門輸送系の実体を分子レベルで解明し、この輸送系の障害と $A\beta$ の脳内蓄積の関係を明かにする。4) $A\beta$ の脳関門排出輸送を活性化する物質を探索し、 $A\beta$ の血液脳関門排出輸送の活性化を利用した $A\beta$ の脳内蓄積抑制薬のリード化合物を見出すことを目指した。

この目標達成のため脳関門研究の専門家である東北大学・寺崎グループとアルツハイマー病研究の専門家である東京大学・岩坪グループがそれぞれの専門性を生かし、多角的に解析を行った結果、 $A\beta$ の中枢消失機構に関して多くの新規の重要な知見が得られた。

$A\beta$ 脳関門排出機構に関与が報告されている分子に関しては、LRP-1 は血液脳関門における排出輸送にはほとんど関与していないことが明らかとなった。一方で、脳脊髄液からの脈絡叢上皮細胞（脳脊髄液関門）を介した $A\beta$ の排出輸送が存在することを示し、この排出輸送には LRP-1 が関与していることを明らかにした。また、LRP-1 は $A\beta$ と直接結合するのではなく、co-receptor を介して $A\beta$ 輸送に関わっていることを明らかにした。また、排出輸送への関与の可能性が報告されていた P-糖タンパク及び ABCA1 に関しても $A\beta$ 脳関門排出輸送に関与していないことを示し、 $A\beta$ 脳関門排出輸送には新規分子の関与がきわめて大きいことを明らかにした。

そこで、新規分子の同定をクロスリンク、プルダウン及びプロテオミクス解析によって

行った。4つの候補分子を同定し、2分子についてはA β 脳関門排出輸送への寄与が小さいこと、1分子については間接的にA β 脳関門排出輸送に寄与していることを明らかにした。もう1分子については解析を継続している。

A β 脳関門排出輸送を促進する物質の探索には、in vitro assay系が必須である。CRESTプロジェクトで樹立したin vitro脳関門モデル細胞である条件的不死化脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB及びTR-BBB)は、A β を細胞内に取り込み、さらに取り込んだA β を細胞外に排出する活性を有していることを示し、優れたin vitro系であることを明らかにした。本培養細胞系を用いて約60化合物をスクリーニングした結果、複数の促進候補化合物を同定し、さらに、2化合物についてはin vivoでA β 脳関門排出輸送を促進することを示した。

アルツハイマー病の発症やA β の生成、蓄積に中枢cholesterolの恒常性の変化が関わっていることが報告されている。そこで、中枢cholesterol恒常性における脳関門機能についても解析した結果、血液脳関門及び血液脳脊髄液関門にLXRによる脂質輸送トランスポーターの制御機構が存在することを明らかにした。さらに、血液脳脊髄液関門でのcholesterol放出はApo-Eのsubtype依存性があることを初めて示した。また、中枢cholesterolの主な代謝物でありLXRのligandである24S-OH cholesterolの脳関門排出輸送に関してもその分子機構を明らかにした。

従来、アルツハイマー病の研究は脳内に限定されていたが、脳からの排出には、その後の体循環からの消失も大きく影響する。そこで、新たな課題として体循環からのA β 消失経路である肝臓におけるA β の取り込み機構の解析を行った。その結果、肝臓におけるA β の取り込みにはLRP-1が関わっており、その取り込み活性はinsulinによって制御されることを明らかにした。

CREST研究では、輸送担体の発現を蛋白質レベルで証明する時、一般的手法である抗体を用いたWestern blotting法や染色法を採用してきた。しかし、優れた抗体を作成することはしばしば研究の律速となることから、抗体を用いないで細胞膜を蛋白質レベルで解析する手法を開発することはA β の輸送の実体を解明する上で非常に重要である。また、A β の検出方法として、¹²⁵I標識体を用いる方法とELISA法があるが、後者は脳ホモジネートなどサンプル解析には適していない。両者に共通の課題として、未変化体のみを検出するという保証がないことである。A β の脳からの消失過程に代謝分解過程が同時に存在することが報告されていることから、非標識未変化A β のみを直接測定する方法を開発することは非常に重要である。これらの理由から、研究開始時には設定していなかった「細胞膜蛋白質の高感度同時絶対定量分析法の開発」と「非標識未変化A β の高感度絶対定量法の開発」を目標として設定した。その結果、高速液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いて37種類の異なる細胞膜蛋白質を同時に1fmol/assayの検出感度で定量する方法を開発することに成功した。この手法の原理は、細胞膜蛋白質を可溶化しトリプシン消化し、内部標準物質を添加し、LC-MS/MSで定量するものである。この手法で最も重要な点は、定量対象の細胞膜蛋白質のトリプシン消化物の中で質量分析計で高いシグナルを出すペプチドを選択することである。私達は、データ解析の結果、アミノ酸の配列情報のみに基づいて定量に適したペプチドを選択する設計方法を確立した(国際特許出願中)。その結果、あらゆる蛋白質に対する定量法をin silicoで開発することが可能になった。比較的ホモロジーの高い蛋白質は抗体の作成が特に、困難であったが、この手法はサブタイプの異なる蛋白質を1回の分析で同時に絶対定量可能である。その検出感度はほぼ抗体に匹敵するものである。生命科学のあらゆる分野で応用される可能性の高い基盤技術を開発することができた。LC-MS/MSを用いた非標識未変化A β の絶対定量法の開発についても、細胞膜蛋白質の絶対定量法開発と同様に困難を極めたが、後述のように13fmol/assayという高感度定量法を開発することができた。この方法は代謝分解物の定量にも応用可能であり、比較的少量の血液や脳脊髄液を用いてA β 及びその代謝物の同時解析へ道を開くことができた。本手法を用いて引き続きA β の代謝過程の寄与の評価を含めた脳内動態解析を行う。

以上の研究成果によって、SORST開始時にはほとんどその機構が不明であった脳からのA β 排出機構について多くの分子基盤が明らかとなった。当初の目的の一つであったA β 脳

関門排出輸送に関わる分子の同定に関しては、間接的に関与する分子を同定することはできたが、残念ながら、 $A\beta$ と直接結合し輸送を行う分子の同定には至らなかった。本プロジェクトの結果から、 $A\beta$ 脳関門排出輸送は単一の受容体ではなく、複数の分子が関わることを示唆されているため、今後、プロジェクトで開発した技術を駆使して同定を進める必要がある。一方、治療薬開発の面では、 $A\beta$ 脳関門排出輸送を促進する化合物の同定に成功し、本化合物をシーズとしてさらに化合物を探索することによって大きな展開が期待できる。また、新展開から生まれた大きな成果は、質量分析を用いた膜タンパク質の超高感度同時絶対定量技術である。本技術は従来のプロテオミクス技術の限界を克服するだけでなく、遺伝子情報からタンパク質定量を可能とするため、これまでのタンパク質検出技術における革新的技術として、他の多くの分野への応用が可能である。開発した技術を核として、「オン・ディマンド型の蛋白質絶対定量キットの開発」研究課題が平成 20 年 8 月大学発ベンチャー創出推進事業に採択され、産業応用を目的とした開発研究へ展開を開始した。

東北大学・寺崎グループ

寺崎グループでは、*in vivo* と *in vitro* の両面からそれぞれ独自技術（Brain Efflux Index 法と条件的不活化脳毛細血管内皮細胞）を用いて $A\beta$ 脳関門排出輸送の解析を行った。その結果、 $A\beta$ はモノマーのみが脳から血液方向へ排出されることが明らかになった。 $A\beta$ 脳関門排出機構に関与が報告されている分子に関しては、LRP-1、P-糖タンパク質ともに血液脳関門における排出輸送にはほとんど関与していないことが明らかとなった。従って $A\beta$ 脳関門排出輸送には新規分子の関与が大きい。そこで、新規分子の同定をプロテオミクス解析によって行った。4 つの候補分子を同定し、2 分子については $A\beta$ 脳関門排出輸送への寄与が小さいこと、1 分子については間接的に $A\beta$ 脳関門排出輸送に寄与していることを明らかにした。

また、CREST プロジェクトで樹立した *in vitro* 脳関門モデル細胞である条件的不活化脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB)は、 $A\beta$ を細胞内に取り込み、さらに取り込んだ $A\beta$ を細胞外に排出する活性を有していることを示し、優れた *in vitro* 系であることを明らかにした。本培養細胞系を用いて約 60 化合物をスクリーニングした結果、複数の促進候補化合物を同定し、2 化合物については *in vivo* で $A\beta$ 脳関門排出輸送を促進することを示した。

脳関門を介した $A\beta$ 排出輸送に加えて、脳脊髄液からの脈絡叢上皮細胞を介した $A\beta$ の排出輸送が存在することを示し、この排出輸送には LRP-1 が関与していることを明らかにした。さらに、新たな課題として体循環からの $A\beta$ 消失経路である肝臓における $A\beta$ の取り込み機構の解析を行った。その結果、肝臓における $A\beta$ の取り込みには LRP-1 が関わっており、insulin によって LRP-1 の細胞膜ソーティングが促進され、肝細胞内への見かけの $A\beta$ の取り込みが活性化されることを明らかにした。

$A\beta$ 脳関門排出機構の解明と平行し、研究を促進するための新技術の開発に取り組んだ。特に関連領域への影響が大きい技術として質量分析計を活用し「細胞膜蛋白質の超高感度同時絶対定量分析法の開発」と「非標識未変化 $A\beta$ の超高感度絶対定量法の開発」の開発に成功した。

$A\beta$ 脳関門排出輸送に関わる分子の同定に関しては、間接的に関与する分子を同定することはできた。また、 $A\beta$ 脳関門排出輸送は単一の受容体ではなく、複数の分子が関わることを示唆された。治療薬開発の面では、 $A\beta$ 脳関門排出輸送を促進する化合物を見出すことができたことから、本化合物をシーズとしてさらに活性の強い化合物を探索することによって展開が期待できる。質量分析を用いた膜タンパク質の超高感度同時絶対定量技術の開発は当初想定しなかった大きな成果である。本技術は、これまでのタンパク質検出技術における革新的技術として、他の多くの分野への応用が可能であり、大学発ベンチャー創出推進事業の課題として採択され、成果の社会還元を目指した実用化研究へ発展させつつある。

東京大学・岩坪グループ

岩坪グループでは、寺崎グループが確立した条件的不活化ラット脳毛細血管内皮細胞株 TR-BBB 細胞を用い、TR-BBB 細胞が ^{125}I 標識した $hA\beta(1-40)$ を迅速に取り込み、速やかに

排出すること、また、TR-BBB 細胞による hA β (1-40)取り込みは受容体を介していることを示した。TR-BBB 細胞による hA β (1-40)取り込みは LDL 受容体 family の阻害剤で阻害されることを見いだした。さらに LRP-1 を発現する MEF1 細胞で A β 1-40 取り込みが見られなく、精製した LRP-1 と hA β (1-40)の直接結合が認められないことから TR-BBB 細胞には LRP-1 及び未知の co-receptor を介した hA β (1-40)取り込み機構が存在する可能性が考えられた。さらに、LRP-1 を発現する他の培養細胞では hA β (1-40)の取り込みが検出できなかったことから、TR-BBB 細胞は、LRP-1 を介した hA β (1-40)の輸送の解析に非常に有用な評価系であることが明らかになった。

Zlokovic らの報告以降、血液脳関門を介した A β 排出輸送には LRP-1 が直接関与していると考えられている。しかし、この解析によって、LRP-1 が直接 A β と結合しているのではなく、co-receptor を介して A β の輸送に関わっているという全く新しいモデルを提唱した。さらに、TR-BBB 細胞が脳関門における A β 輸送の in vitro 系として非常に有効であることを示したことは、本系が今後の輸送解析、さらには化合物スクリーニングにも有効であることを示しており、関連領域に対して評価系としての有用性を提示することができた。本成果は新薬の新しいターゲットを提示しただけではなく、アルツハイマー病の発症機構の解明に知見を与えるものである。

3. 研究構想

CREST プロジェクトにおいて、「脳関門は脳機能の障害となる不要な脳内物質を脳から循環血液方向へ排出する多様な輸送系が機能することによって『脳を守る』解毒機構としての役割を果たしていることを明らかにすること」を目的として研究に取り組んできた。

発展継続課題では、CREST プロジェクトで取り組んできた低分子量物質輸送研究の展開課題として、脳内においてアミロイド β 蛋白 (A β) の生成・分泌・蓄積と密接に関わりがあると報告されている脂質の血液脳関門における輸送機構を解明する。さらに、高分子量物質輸送研究への発展課題として、以下の項目を開始時の目標とした。

- 1) A β の脳関門排出機構を解明する。
- 2) 生体が本来持っている A β の主要な中枢からの除去機構は、脳内の A β を血液脳関門が循環血液中に排出する輸送経路であることを明らかにする。
- 3) A β の脳関門輸送系の実体を分子レベルで解明し、この輸送系の障害と A β の脳内蓄積の関係を明らかにする。
- 4) この排出輸送を活性化する物質を探索し、A β の血液脳関門排出輸送の活性化を利用した A β の脳内蓄積抑制薬のリード化合物を見出すこと

これらの成果を基に最終的に、「A β 及び神経毒性物質の血液脳関門排出輸送による中枢解毒機構を利用したアルツハイマー型痴呆症の新規治療薬開発」の突破口を開くことを目指した。

本目標達成のために東北大学の寺崎グループは、独自開発の脳関門の排出輸送を in vivo で計測する Brain Efflux Index 法をはじめとした動物を用いた輸送解析法と、CREST プロジェクトにおいて開発に成功した in vitro 脳関門モデル細胞である条件的不死化脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB, TR-BBB)を用いて、分子生物学的手法及び薬物速度論的手法に加えて最新のプロテオミクス技術を動員し、上記のすべての課題に取り組んだ。さらに、脳からの A β 排出輸送を解析する過程において、寺崎グループの専門領域である薬物速度論視点から脳からだけではなく体内から A β の消失について解析する重要性を認識し、新たに、下記の目標を設定した。

- 5) 肝臓における A β 取り込み分子機構と制御機構を解明する。

また、A β の脳関門排出機構の解明の過程において新規輸送分子をプロテオミクスで解析する際に、従来のプロテオミクス技術では膜タンパク質の同定、定量はきわめて困難であることを認識するに至った。また、脳内での A β の分布状態を解明するには ^{125}I -標識されていない非標識未変化体 A β の高感度絶対定量法を開発することの重要性を認識するに至った。そこで、次世代プロテオミクス技術開発ともいえる下記の目標を新たに設定し、基盤技術

の開発を行った。

6) 高速液体クロマトグラフィーと質量分析計(LC-MS/MS)を用いた細胞膜タンパク質の高感度同時絶対定量に関する新技術開発

7) 細胞膜タンパク質量のための定量用ペプチドの *in silico* 設計法の開発

8) LC-MS/MS を用いた脳組織中非標識未変化体 A β の絶対定量法の開発

また、東京大学の岩坪グループは、アルツハイマー病に対する豊富な知識と解析技術を活用し、寺崎グループから条件の不活化ラット脳毛細血管内皮細胞(TR-BBB)の供与を受け、A β の脳関門排出機構を解明における LRP-1 を介した排出輸送の分子機構の解明を行った。

4. 研究実施内容

4. 1 “アミロイド β ペプチドの脳関門排出輸送と促進物質の探索、及び各種の新規実験方法の開発を担当（東北大学グループ）”

(1)実施の内容

1. 血液脳関門を介した A β 排出輸送の特性と既報分子の関与の解析

アミロイド β 蛋白質(A β)の血液脳関門を介した排出輸送には、low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1)と P-糖蛋白(P-gp/MDR1)が関わっていることが報告されている。また、コレステロール輸送に関わる ABCA1 が A β 輸送に関わっている可能性が報告されている。そこで、ラット、マウスにおける血液脳関門を介した A β 排出輸送の特性を解析し、LRP-1, P-gp, ABCA1 の A β 排出輸送への関与について解析を行った。結論として、既報の分子の血液脳関門を介した A β 排出輸送への関与は小さいことが明らかとなった。

1-1) 血液脳関門 hA β (1-40)排出輸送特性：

Human A β (1-40) ([125 I]hA β (1-40)) はラット大脳皮質から 1.6×10^{-2} (min^{-1})の速度定数で消失した (図 1)。脳スライスに対する定常状態取り込み量から [125 I]hA β (1-40)の脳分布容積として 0.69 mL/g brain が得られ、脳消失クリアランスは 11 $\mu\text{L}/(\text{min g brain})$ となり、既報の血液から脳方向血液脳関門 influx クリアランスの 4.5-17 倍大きかった。 [125 I]hA β (1-40) の脳消失速度は hA β (1-42)で阻害されたが、hA β (1-43)や hA β (40-1)で阻害されなかった。この脳消失速度に雌雄 (8 週齢) 間の差は見られなかった。(J. Neurosci. 24:9632-9637 (2004), Neurosci. Res. 56:246-252 (2006))

マウスについても同様の検討を行った。マウス脳内に投与された [125 I]hA β (1-40) はマウス大脳皮質から 1.5×10^{-2} (min^{-1})の速度定数で消失した。マウス脳スライスに対する定常状態取り込み量から hA β (1-40)の脳分布容積として 0.77 mL/g brain が得られ、脳消失クリアランスは 12 $\mu\text{L}/(\text{min g brain})$ となり、既報の血液から脳方向血液脳関門 influx クリアランスの 2-10 倍大きかった。従って、BBB における hA β (1-40)輸送は脳から血液側の方向が優位な輸送であることが示された。

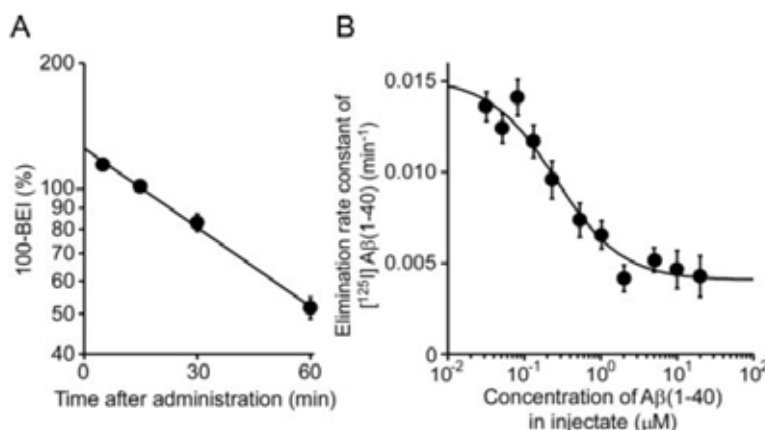


図 1 ラット脳内投与後の [125 I]hA β (1-40)の脳内残存率の時間推移(A)と [125 I]hA β (1-40)の脳からの排出速度定数の濃度依存性(B)

1-2) 血液脳関門 hAβ(1-40)排出輸送における dimerization 及び複合体形成効果 :

hAβ(1-40)の dimer は、脳から排出されず、monomer のみが排出されることが示された(図2)。 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ を ApoE2, ApoE3, ApoE4 と 4°C、3 時間 incubation 後、脳消失速度は、各々15, 17, 20%低下した。同様に、lactoferrin, midkine, activated $\alpha 2$ macroglobulin で、各々、25, 16, 12 %低下した。一方、ApoE2, ApoE3, ApoE4, lactoferrin, midkine, activated $\alpha 2$ macroglobulin を各々大脳皮質に pre 投与することによって、 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の脳消失速度は低下しなかった(図3)。これまで Aβ は、LRP-1 ligand と複合体を形成することによって LRP-1 ligand をキャリアーとして LRP-1 を介して排出されると考えられてきた。しかし、今回得られた結果から、LRP-1 ligand との複合体形成によって hAβ(1-40)の脳からの消失は促進されず、逆に脳内蓄積方向に働くことが示唆された。(J. Neurochem., 103:2482-2490 (2007))

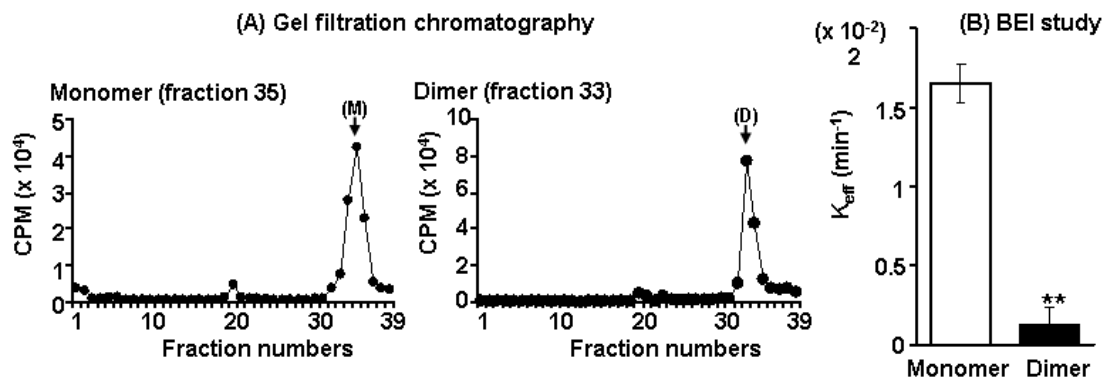


図2 hAβ(1-40)の血液脳関門排出に及ぼす dimer 効果:(A) Monomer 及び dimer hAβ(1-40)のゲルろ過による精製、(B) Monomer 及び dimer hAβ(1-40)の脳からの排出の速度定数

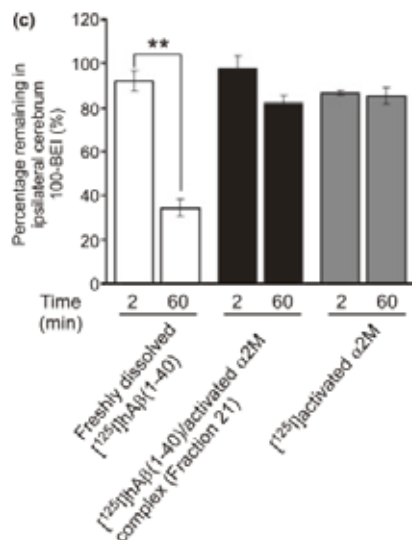


図3 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ と activated $\alpha 2$ macroglobulin (black bar)の複合体及び activated $\alpha 2$ macroglobulin 単体 (gray bar)は、脳内に投与しても脳から排出されなかった。

1-3) 血液脳関門 hAβ(1-40)排出輸送における LRP-1

の寄与:

これまで Zlokovic らのグループは LRP-1 が血液脳関門において hAβ(1-40)の排出輸送の主な役割を担っていると報告してきた。 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の脳消失速度を human RAP (RAP (receptor-associated protein)LRP-1 のアンタゴニスト) が 20%阻害したことから LRP-1 を介した排出輸送は最大で 20%の寄与であることが示唆された(Neurosci. Res.. 56:246-252 (2006)) (図4)。

動物種差でこの違いが説明できる可能性があったので、Zlokovic らと同様にマウスで行った。マウスの脳から $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の排出を RAP は全く阻害しなかった(図4)。さらに、LRP-1 の典型的基質である $[^{125}\text{I}]\text{activated } \alpha 2\text{-macroglobulin } (\alpha 2\text{M}^*)$ を脳内に投与し、残

存率の経時変化を測定したところ、血液脳関門を介して排出輸送されないことが示された(図5)。一方、この $[^{125}\text{I}]\alpha 2\text{M}^*$ は LRP-1 が機能している肝臓へ取り込まれ、RAP によって阻害された。したがって、マウス血液脳関門には脳から血液方向の LRP-1 の輸送活性はなく、 $\text{hA}\beta(1-40)$ の脳から血液方向への排出輸送を担うことはできないことが示された。

一方で、マウス脳毛細血管に LRP-1 のタンパク質発現を検出した(*Neurosci. Res.* 56:246-252 (2006))。また、後述するように in vitro BBB モデル細胞である条件的不死化マウス及びラット脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB、TR-BBB)における $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の取り込みは RAP で阻害される。以上の結果は、血液脳関門には LRP-1 が関与する輸送系が存在する可能性を示している。我々は共同研究によって、RAP が血液から脳に血液脳関門の輸送系を介して移行すること、その輸送系に LRP が関与していることを明らかにした(*J. Cell Sci.*, 117:5071-5078 (2004))。従って、血液脳関門の LRP-1 は、in vivo において脳から血液方向ではなく、血液から脳方向に機能していると考えられる。

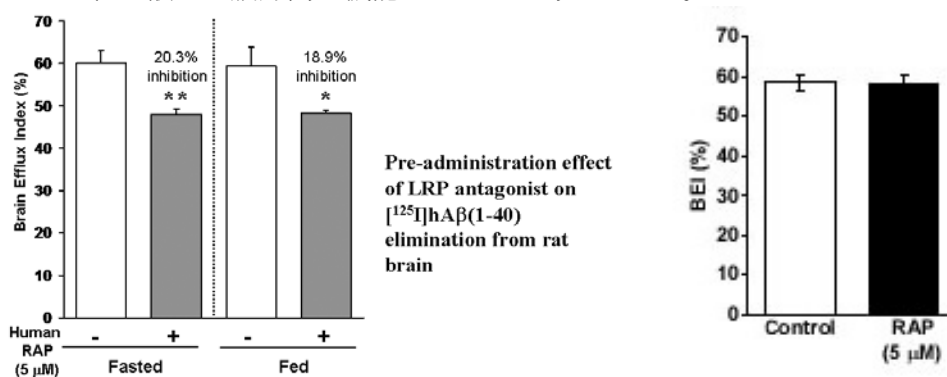


図4 血液脳関門 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ 排出に対する RAP 効果：左図、ラットにおいて RAP 存在下において $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の脳からの排出は約 20%しか阻害されなかった。右図、マウスにおいては RAP による阻害効果は認められなかった。

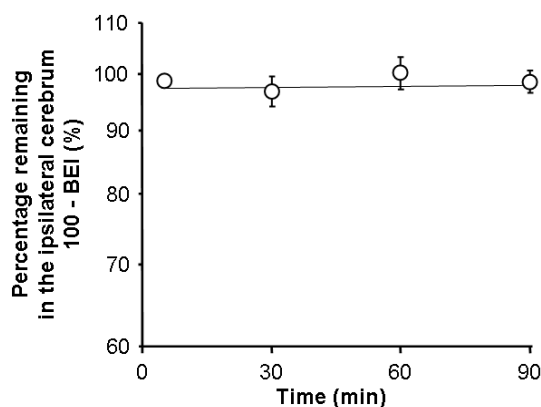


図5 $[^{125}\text{I}]\alpha 2\text{M}^*$ をマウス脳内投与後における脳内残存率の経時変化

1-4) 血液脳関門 $\text{hA}\beta(1-40)$ 排出輸送における P-糖タンパク質(P-gp/MDR1)の寄与：

これまで血液脳関門における MDR1 が $\text{A}\beta$ の排出輸送の少なくとも一部を担っていることを示唆する報告がある (*J. Neurochem.*, 76: 1121, 2001)。 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の脳排出輸送に対して、MDR1 の強力な阻害剤 Quinidine や Verapamil は全く阻害しなかったことから、MDR1 の寄与がほとんどないことが示唆された。(*Neurosci. Res.* 56:246-252 (2006)) (表 1)

The inhibitory effect of several compounds on the elimination of [125 I]hA β (1–40) from rat brain

Inhibitors	Concentration in injectate	No. of studied	BEI (%)	% of control
Control		5	60.0 $\pm$ 3.8	100
Quinidine	5 mM	4	62.3 $\pm$ 2.4	104
Verapamil	4 mM	5	65.0 $\pm$ 1.2	108
Human RAP	5 μ M	5	47.8 $\pm$ 1.4**	79.7

Inhibitor solutions (50 μ L) were pre-administered 5 min before administration of [125 I]hA((1–40) (0.02 μ Ci) and [3 H]dextran (0.20 μ Ci) into the same brain region. [125 I]hA β (1–40) was used at a concentration of 18.2 nM (i.e. 0.6 nM as the cerebral concentration). The value was determined 60 min after intracerebral administration. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ** $p < 0.01$, significantly different from control.

表1 ラット血液脳関門[125 I]hA β (1-40)排出に対する RAP, quinidine, verapamil 効果

1–5) 血液脳関門 A β 排出輸送における脂質輸送系の寄与:

脳内においてアミロイド β 蛋白質 (A β) の生成・分泌・蓄積と密接に関わりのあると報告されているコレステロールの脳関門における輸送機構と[125 I]A β (1-40)の脳関門排出輸送との関係を解析した。ラット条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株(TR-BBB)と脳毛細血管画分に ABCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8/9 の mRNA が発現していることが明らかになった(*Biol. Pharm. Bull.*, 27:1437-1440 (2004), *J. Neurochem.*, 95:294-304 (2005))。これまでに神経細胞における ABCA1 の発現量が低下すると培養溶液中への A β の分泌が抑制される報告がある。さらに、近年、核内受容体 Liver X Receptor (LXR) のリガンド処理によってマウスにおいて脳内の A β 蓄積が劇的に低下することが報告された。LXR は肝臓において ABCA1 の発現を制御し、さらに ABCA1 と A β 脳内蓄積との関係を示唆する論文が報告されたため、A β 脳関門排出における ABCA1 の機能解析を行った。LXR $_{\alpha}$ 及び LXR $_{\beta}$ の発現は単離ラット脳毛細血管及び条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞(TR-BBB 細胞)で検出された。TR-BBB 細胞に対して LXR 処理を行うことによって、ABCA1 の発現が誘導された(*Neurochem. Int.*, 52: 669-674 (2008))。一方で、ABCA1 のノックアウトマウスにおける A β (1-40)脳関門排出は、野生型と有意な差はなかった(*Neurochem. Int.*, 52:955-961 (2008)) (図6)。従って、LXR リガンド処理は血液脳関門の ABCA1 発現を誘導するが、脳関門排出には影響を与えないことが示唆された。従って、LXR リガンドは、A β 産生系や分解系に作用していると考えられる。

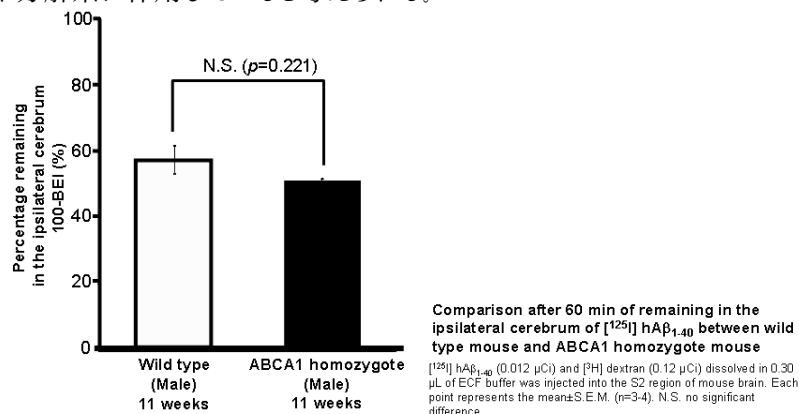


図6 マウス血液脳関門における hA β (1-40)排出輸送に及ぼす ABCA1 の影響; ABCA1 KO における投与後60分の hA β (1-40)の脳内残存率は、Wild type の脳内残存率と有意な差はなかった。

2. 血液脳関門における新規 A β 排出輸送機構の解明

前項で解析結果を示したように、hA β (1-40)の血液脳関門を介した排出輸送機構は、これ

まで報告されている LRP-1、P-糖蛋白、ABCA1 の寄与は小さく、新規の輸送機構が主な役割を果たしている可能性が高い。そこで、細胞膜蛋白質を質量分析計で高感度同時絶対定量解析する独自のプロテオミクス技術を開発し、多角的に新規排出輸送分子の同定に取り組んだ。

2-1) Affinity cross linking 法を用いた脳毛細血管内皮細胞 hAβ(1-40)結合タンパクの同定：
hAβ(1-40)をビオチン標識し、マウス脳毛細血管内皮細胞膜と cross link もしくは biotin transfer したタンパクを streptavidine beads で分離し、質量分析法で分析したところ現在までに4つの候補分子（分子 S、分子 F、分子 N、分子 A）が同定された。

2-2) 分子 S の Aβ 排出輸送への関与

単離マウス脳毛細血管及び in vitro 血液脳関門モデル細胞である条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB)において分子 S の mRNA 発現が検出された。しかし、分子 S を発現した Oocyte 及び培養細胞において^[125I] hAβ(1-40)の結合もしくは取り込みは検出できなかった。このことから、分子 S の Aβ 排出輸送への関与は小さいことが示唆された。

2-3) 分子 F の Aβ 排出輸送への関与

単離マウス脳毛細血管及び TM-BBB 細胞において分子 F の一部 subtype の mRNA 発現が検出された。さらに、TM-BBB 細胞を用いた hAβ(1-40)の内在化に対して分子 F の複数の agonist は、顕著な阻害効果を示した。同様の阻害実験を in vivo でも行った。hAβ(1-40)のラット大脳からの排出は、分子 F の ligand の前投与によって顕著に阻害された。さらに、分子 F の ligand (^[125I]体)が血液脳関門を介して半減期約 90 分で脳から排出されることが示された。興味深いことに、この分子 F の ligand の血液脳関門排出輸送を hAβ(1-40)が顕著に阻害した。これらの結果は、血液脳関門には分子 F の ligand を認識する脳から血液方向の輸送系が存在し、この輸送系を介して hAβ(1-40)は脳から排出されることを示唆している。

分子 F に対する抗体の調製を試みたが、よい抗体を調製することができなかった。そこで、寺崎グループが独自に開発した細胞膜蛋白質の高感度同時定量分析法を用いて解析を行ったところ、マウス脳毛細血管内皮細胞における分子 F の絶対発現量は、いずれの subtype においても 1 fmol/ug protein 以下であることが明らかになった。hAβ(1-40)の輸送速度と比較して 1 fmol/ug protein 以下の発現量の分子の寄与は小さいと見込まれるため、分子 F の Aβ 排出輸送への関与は小さいことが示唆され、分子 F の ligand は血液脳関門上の分子 F 以外の分子に作用していたと考えられる。

2-4) 分子 N の Aβ 排出輸送への関与

単離マウス脳毛細血管及び TM-BBB 細胞において分子 N の一部 subtype の mRNA 発現、及びタンパク質が検出された。特に、LC-MS/MS を用いた細胞膜蛋白質の絶対定量分析の結果、subtype C は TM-BBB 細胞で 3.8 fmol/ug protein と比較的強く発現していることが明らかとなった。TM-BBB 細胞を用いた^[125I]hAβ(1-40)の内在化に対して分子 N の複数の agonist は、顕著な阻害効果を示した。同様の阻害実験を in vivo において^[125I]hAβ(1-40)のラット大脳からの排出は、分子 N の ligand の前投与によって顕著に阻害された。さらに、分子 N の ligand が血液脳関門を介して半減期約 19 分で脳から排出されることが示された。この消失は分子 N の他のリガンド、hAβ(1-40)および分子 F のリガンドによって阻害された。分子 N の subtype C の安定発現培養細胞では、ligand の内在化は検出されたが、^[125I] hAβ(1-40)の内在化は検出できなかった。一方で、siRNA 処理によって TM-BBB 細胞の subtype C の mRNA 発現を 53%抑制したところ^[125I] hAβ(1-40)の内在化は 29%阻害された。従って、分子 N は hAβ(1-40)の結合受容体の役割を持たないが、hAβ(1-40)輸送を担う複合体の一部を構成する可能性が示唆された。

2-5) 分子 A の Aβ 排出輸送への関与

TM-BBB 細胞において分子 A の一部 subtype のタンパク質が検出された。引き続き、

LC-MS/MS を用いて解析を進行中である。

3. 血液脳関門における A β 排出輸送を促進する化合物の探索

条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞(TM-BBB 細胞)の $[^{125}\text{I}]\text{A}\beta(1-40)$ の取込輸送活性を指標として、アルツハイマー病への効果が知られている化合物や新規輸送候補分子の制御化合物を中心に約 60 種類の化合物を対象に A β 脳関門輸送促進化合物の探索を行った。その結果、複数の化合物について TM-BBB 細胞の $[^{125}\text{I}]\text{A}\beta(1-40)$ の取込輸送活性を変化させる化合物を同定した。さらに、マウスに化合物を投与し、 $[^{125}\text{I}]\text{A}\beta(1-40)$ の脳関門排出速度に対する効果を検討した結果、少なくとも2つの化合物について有意な A β 脳関門輸送促進効果が認められた(図7)。

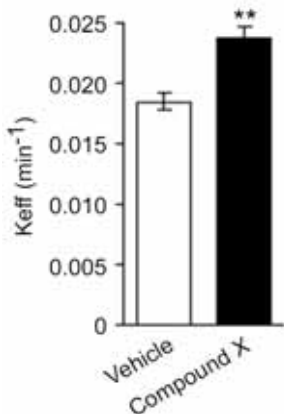


図7 化合物 X のマウスへの投与によって $[^{125}\text{I}]\text{A}\beta(1-40)$ の脳からの排出速度定数が上昇した。

4. 脳内 A β 消失過程における血液脳関門排出輸送と脳内代謝機構の寄与の評価

脳内 A β の消失は血液脳関門を介した排出輸送に加えて neprilysin 等のペプチド分解酵素が関わる代謝過程が関与していることは西動らが報告している。これまで、それぞれの機構は独立に解析され、その寄与について不明な点が多かった。

$[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の脳消失速度を neprilysin の阻害剤である thiorphan (1 mM), phosphoramidon (10 mM)が各々16%, 21%阻害した(*J. Neurosci.*, 24:9632-9637 (2004)) (図8)。この結果は、hA $\beta(1-40)$ の脳内消失過程の少なくとも 16%は neprilysin による代謝過程が寄与している可能性を示唆している。

従来の BEI 法は、 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ を用いて脳内に残存する放射活性によって脳からの hA $\beta(1-40)$ の消失を評価していたため、脳内での分解過程を評価することができなかった。方法論の詳細は後述するが、LC-MS/MS を用いて非標識未変化体 hA $\beta(1-40)$ を直接定量する手法を開発することで、この課題に取り組んだ。サンプル前処理方法の開発が非常に困難であったが、脳組織中の hA $\beta(1-40)$ の定量方法を開発することができた。非標識 hA $\beta(1-40)$ を脳内に投与し、一定時間後の hA $\beta(1-40)$ の脳内残存量を解析することで、脳内での代謝過程の寄与率を引き続き評価解析中である。

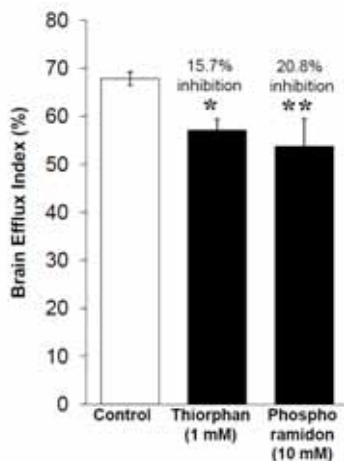


図8 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の血液脳関門を介した脳からの排出輸送は、neprilysin の阻害剤によって阻害された。

5. 血液脳脊髄液関門を介した A $\beta(1-40)$ の排出輸送機構

脳内物質の排出経路として血液脳脊髄液関門が考えられるが、これまで脳内 hAβ(1-40) の排出機構と寄与に関してほとんど不明であった。特に、脳脊髄液中の Aβ 濃度は、Aβ の脳細胞間液中濃度と脳脊髄液流速と血液脳脊髄液関門からの排出速度によって決定されると考えられ、脳内の Aβ 蓄積を解析する上で血液脳脊髄液関門輸送機構を解明することは重要である。ラット脳室内に投与した^[125]I]Aβ(1-40)は半減期 13 分で消失した。この排出速度は hAβ(1-40)と hAβ(1-42)で飽和し、LRP リガンドの RAP, α2M*で阻害された(図9)。さらに、LRP の発現が低下している RAP ノックアウトマウスにおいて脳脊髄液からの消失は低下した。これらのことから、血液脳脊髄液関門からの Aβ(1-40)排出には LRP のいずれかのサブタイプが関与することが示唆された。これまで脈絡叢においては LRP-1 と LRP-2 の発現が報告されていた。本プロジェクトで開発した細胞膜タンパク質の高感度定量法を用いて、LRP-1 の発現量を測定したところ、ラット脈絡叢で 1.2 fmol/ug protein であった。一方で、LRP-2 は検出以下であった。図 10 には、質量分析法で検出した LRP-1 のクロマトチャートを示した。血液脳脊髄液関門 in vitro model として、CREST 研究で条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞(TR-CSFB)を開発した。この TR-CSFB は LRP-1 が発現し、^[125]I]hAβ(1-40)の輸送活性を持つことが分かった。そこで、TR-CSFB を LRP-1 siRNA で処理したところ蛋白質レベルで LRP-1 の発現が低下し、^[125]I]hAβ(1-40)の輸送速度も低下した。これらの結果から、脈絡叢上皮細胞に発現する LRP-1 が脳脊髄液中の hAβ(1-40)を脳から血液方向へ排出輸送することが明らかとなった。

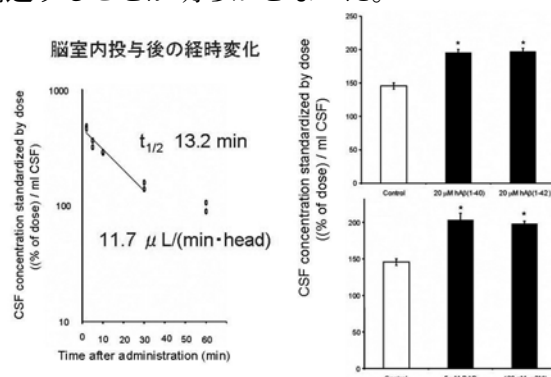


図9 ^[125]I]Aβ(1-40)の血液脳脊髄液関門排出輸送に及ぼす LRP-1 リガンドの阻害効果

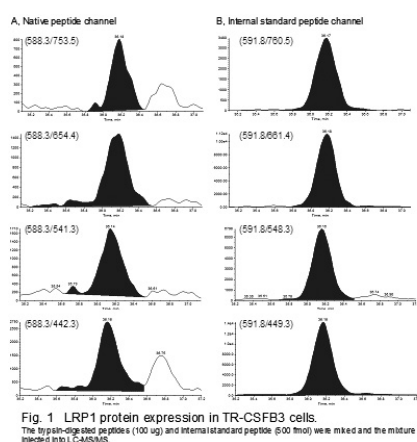


Fig. 1 LRP1 protein expression in TR-CSFB3 cells. The tryptic-digested peptides (100 μg) and internal standard peptide (500 fmol) were mixed and the mixture was injected into LC-MS/MS.

図10 TR-CSFB 細胞に発現する LRP-1 の質量分析クロマトグラム

6. 肝臓における Aβ 取り込み機構の解明

循環血液中の hAβ(1-40)の主な消失経路は、肝臓である。本プロジェクトの主題は血液脳関門を介した排出輸送機構を解明することであるが、肝輸送機構を解明し、血液脳関門排出輸送機構と比較解析することは非常に重要である。Liver Uptake Index(LUI)法を用いて hAβ(1-40)の肝臓への取り込み機構を解析した。

[¹²⁵I]hAβ(1-40)のラット肝臓への取り込みは飽和性を示した(Pharm Res., 23:1407-1416 (2006))。さらに、10μM hAβ(1-40)を門脈から前投与後の[¹²⁵I] hAβ(1-40)の取り込み活性は半減期 10.5 分で回復した。ラット肝初代培養細胞に対する FITC-hAβ(1-40)の取り込みを解析したところ、cytosol 画分に検出された。[¹²⁵I]hAβ(1-40)の肝取り込み輸送に対する各種 hAβ の断片による阻害効果を解析したところ、特に、hAβ(1-40)の中の 17-24 のアミノ酸配列が受容体認識に重要であることが示された。さらに、[¹²⁵I]Aβ1-40 の肝取り込みは 2μM RAP によって顕著に阻害されたことから LRP-1 が関与していることが示唆された(表 2)。LRP-1 siRNA をラット血液中に投与したところ肝臓の LRP-1 蛋白質発現量が顕著に低下し、この時、[¹²⁵I]hAβ(1-40)の肝臓への取込輸送活性は有意に低下した(図 1 1)。

[¹²⁵I]hAβ(1-40)の肝取り込み輸送活性に対する加齢の影響を解析したところ雌雄いずれにおいても 13 ヶ月齢ラットは 7 週齢に比べて肝臓 1 グラム当たりの輸送活性は低下していることが示された。このとき肝臓における LRP-1 の発現量を western blot 解析したところ 7 週齢に比べて 13 ヶ月齢ラットは有意に LRP-1 の発現が低下していた。したがって、肝取り込み輸送活性の低下の少なくとも一部は LRP-1 の発現量の低下によって説明できる。この結果は、加齢に伴うアミロイド蛋白質の蓄積と肝臓における LRP-1 の発現低下が関与していることを示唆するものである。

Table I. Effect of Various Substrates on Aβ(1-40) Uptake by Rat Liver

Substrates	Extravascular extraction (%)	Percentage of control (%)
Control	69.5 ± 2.3	100 ± 3
100 μg/mL insulin	66.5 ± 3.4	96 ± 5
100 μg/mL fucoidan	66.8 ± 2.3	96 ± 4
1 mg/mL AGEs	59.2 ± 1.4*	85 ± 2
1 mg/mL control BSA	69.0 ± 2.7	99 ± 4
2 μM RAP	36.3 ± 3.1**	52 ± 4

AGEs, advanced glycation end products; BSA, bovine serum albumin; RAP, receptor-associated protein.

Substrates dissolved in 200 μL Ringer's HEPES buffer (pH 7.4) at the indicated concentrations were injected 0.5 min prior to [¹²⁵I]Aβ(1-40). Each value represents the mean ± SEM (n = 4-6).

*p < 0.05, **p < 0.01, significantly different compared with controls.

表 2 hAβ(1-40)のラット肝取込に対する阻害効果

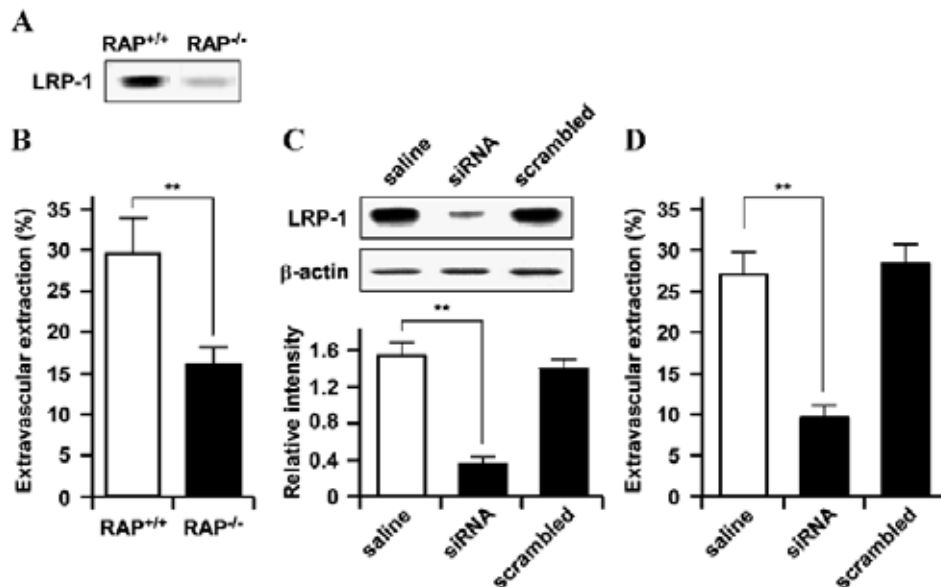


図 1 1 RAP ノックアウトマウスでは LRP-1 の Liver における LRP-1 の蛋白質発現量の低下が認められ(A)、hAβ(1-40)の肝臓への取り込みが低下した (B)。LRP-1 siRNA の投与によって肝臓における LRP-1 の発現が低下し(C)、[¹²⁵I]hAβ(1-40)の肝臓への取り込み輸送活性

が低下した(D)。

Insulin シグナルが慢性的に低下する II 型糖尿病と弧発性 AD の発症には疫学的に相関があることが報告されていることから、insulin と肝臓における A β 消失機構の関連について解析を行った(Mol. Pharmacol., 72:850-855 (2007))。絶食ラットに insulin を定速投与することで、肝臓の plasma membrane における LRP-1 の発現は時間依存的に上昇した。この時、whole cells lysate における発現は変動せず、細胞内から細胞膜への LRP-1 のソーティングが促進されたことが示された (図 1 2)。細胞膜における LRP-1 の局在量と相関して、[¹²⁵I]A β (1-40)の肝臓への取り込みは insulin によって時間依存的に上昇した。取り込みの上昇は 2 μ M RAP の前処理によってほぼ完全に抑制されたことから、insulin は見かけの LRP-1 機能を活性化することが示された (図 1 2)。以上の結果から、血液中 insulin 濃度の上昇は肝臓における LRP-1 のシヌソイド細胞膜へのソーティングを促進し、A β の肝クリアランスを活性化することが明らかとなった。また、insulin 抵抗性を伴う II 型糖尿病患者では A β の肝クリアランスの低下によって、A β の脳内沈着が加速される可能性が示された。

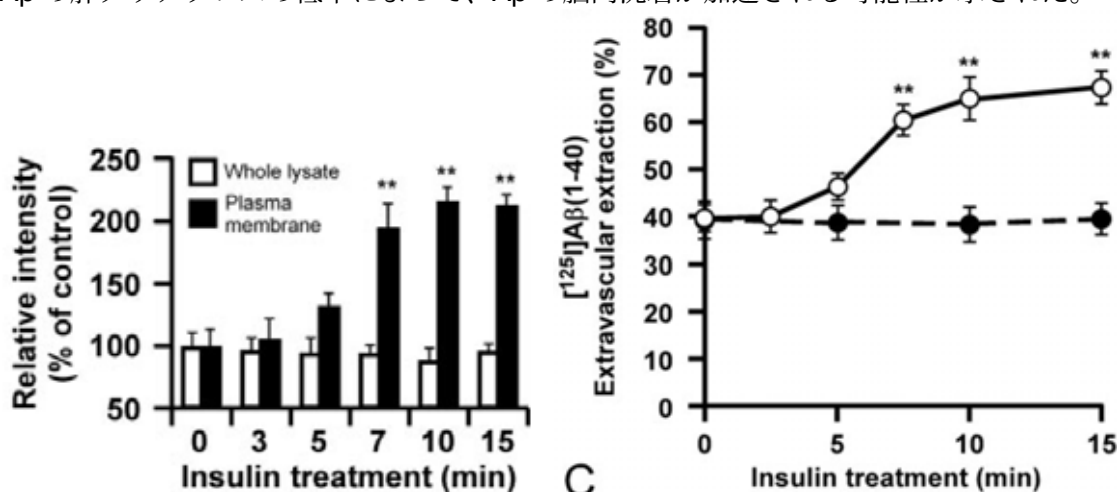


図 1 2 Insulin 投与によって肝臓細胞膜の LRP-1 タンパク質の発現量が急激の上昇する (左図)。Insulin 投与によって肝臓への [¹²⁵I]hA β (1-40)の取り込みが活性化され (○)、肝臓への取り込み率の活性化された割合のみが全て RAP によって阻害された (●) (右図)。

7. 脂質関連の血液脳関門における輸送機構

7-1) 脳関門における ABCA ファミリーの発現と制御:

1-5)で述べたようにラット条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株(TR-BBB)と脳毛細血管画分に ATP binding cassette (ABC) transporter の ABCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8/9 の mRNA が発現していることが明らかになった。また、LXR α 及び LXR β が単離ラット脳毛細血管及び条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞(TR-BBB 細胞)に検出され TR-BBB 細胞に対して LXR リガンド処理を行うことによって、ABCA1 の発現が誘導された(Biol. Pharm. Bull., 27:1437-1440 (2004), J. Neurochem., 95:294-304 (2005))。

そこで、血液脳脊髄液関門における cholesterol の関与について解析を行ったところ、脈絡叢上皮細胞において ABCA1, ABCG1 が発現し、LXR α と LXR β が発現していた(J. Neurochem., 100:968-978 (2007))。条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞株(TR-CSFB)に対する 24-S(OH) Cholesterol 処理によって ABCA1 及び ABCG1 の mRNA とタンパク質発現は顕著に誘導された。ApoA-1 および高密度蛋白質(HDL)を介した [³H]-Cholesterol の TR-CSFB 細胞における apical 方向の排出は、24-S(OH)cholesterol 処理で顕著に促進された。ApoE3 による [³H]Cholesterol の apical 方向への排出は、apoE4 よりも約 30% 大きかった (図 1 3)。ApoE4 はアルツハイマー病の危険因子であり、脈絡叢上皮細胞における Cholesterol 排出輸送の apoE isoform 特異性は、脈絡叢上皮細胞での脂質蓄積性やアルツハイマー病の病態形成に影響を与える可能性が示唆された。

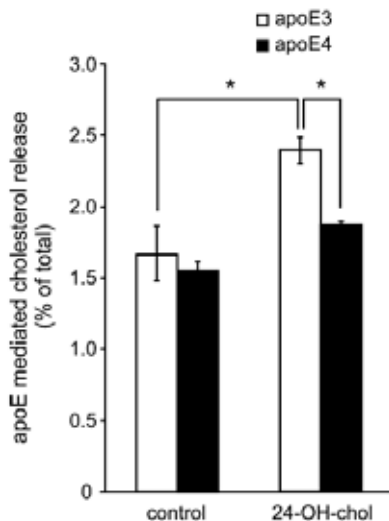


図1 3 条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞(TR-CSFB)からの cholesterol の release は、LXR ligand である 24-S(OH)cholesterol によって誘導された。その誘導は Apo E3 を acceptor として添加した法が、Apo E4 を acceptor として添加した場合よりも大きかった。

7-2) 脳関門における Cholesterol 代謝物の排出輸送分子機構：

ApoE4 はアルツハイマー病の危険因子であると報告されていることから、脳内脂質の恒常性維持機構を解明することは A β の脳内蓄積と ApoE4 との関係を解明する上で重要である。脳は Cholesterol を豊富に含む組織であり、cholesterol は脳内において de novo 合成される。Cholesterol の脳からの消失機構に関しては cholesterol そのものが血液脳関門を介して循環血中に排出されるのではなく、その主たる代謝物である 24-S(OH)cholesterol が血液脳関門を介して受動拡散によって循環血中に排出されると考えられていた。本研究によって、血液脳関門は cholesterol を排出せず、24-S(OH)cholesterol を半減期 103 分で担体依存性の輸送によって脳から血液方向へ排出することを初めて示した(*J. Neurochem.*, 103:1430-1438 (2007)) (図1 4)。さらに、その排出輸送に有機アニオントランスポーターである oatp2 が関与していることを明らかにした。本結果は、24-S(OH)cholesterol の血液脳関門における排出が受動拡散と考えられていた従来の仮説を覆す中枢 cholesterol 恒常性における脳関門機能の重要性を示す成果である。これらの結果を基に、コレステロールの脳内保持機構に関する仮説的モデルと Ab の脳脊髄液関門輸送機構を図1 5にまとめた。

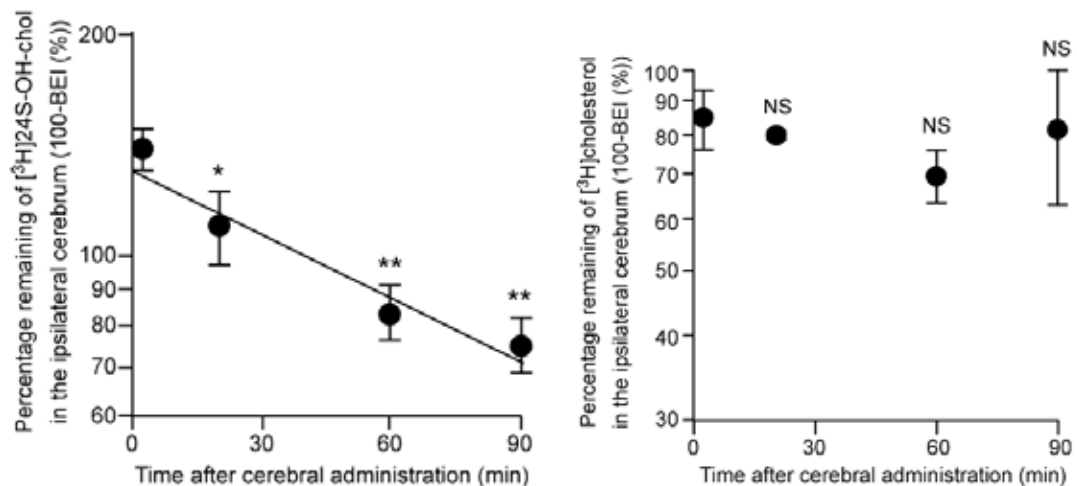


図1 4 ラット脳内に投与した 24-S(OH)cholesterol は半減期 103 分で脳から排出され (左図)、cholesterol は脳から排出されなかった (右図)。

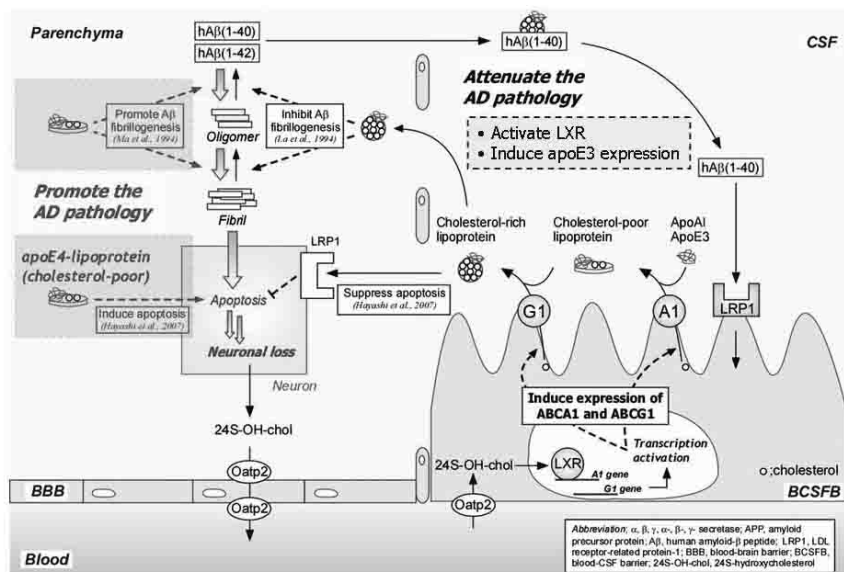


図15 コレステロールの脳内保持機構に関する仮説的モデルと LRP-1 を介した hAβ の脳脊髄液関門輸送のまとめ

8. 血液脳関門輸送機能解析のための新しい実験手法の開発

Aβの血液脳関門排出輸送の実体を解明する研究には種々の新規実験法の開発が必要であった。その中の一つが、脳毛細血管内皮細胞の輸送担体蛋白質の発現量を siRNA で低下させる手法である。上皮細胞と比べ内皮細胞への siRNA の導入効率は低いことから、これまで siRNA を用いて in vivo 実験系で血液脳関門の輸送機能を抑制することに成功した報告はなかった。もう一つの技術として、脳毛細血管内皮細胞を高純度で精製する方法が挙げられる。条件的不死化培養細胞は純度の面で問題ないが、常に in vivo にどれだけ近いかが問題となる。一方、一般に用いられている脳毛細血管の単離方法はガラスビーズ法と呼ばれるもので、星状膠細胞や神経細胞や周皮細胞のコンタミが無視できない。Aβの輸送系の実体を脳毛細血管内皮細胞で証明するにはできるだけ純度の高い脳毛細血管内皮細胞を単離する方法を開発することが重要である。そこで、下記のように in vivo siRNA 法と磁気ビーズ精製法の開発に取り組んだ。

8-1) siRNA 法を用いた血液脳関門における遺伝子抑制法の樹立：

CREST 研究において血液脳関門で非常に重要な働きをしていることを明らかにした有機アニオン輸送担体 OAT3 をモデルとして、in vivo siRNA 法を樹立することを目的とした。In vitro 培養細胞においてマウス有機アニオン輸送担体 OAT3 の輸送機能（ベンジルペニシリンの取り込み）を顕著に低下させる siRNA を 3 種類見出した。Hydrodynamic 法によるマウス尾静脈投与によってこの siRNA は脳毛細血管に発現する OAT3 の機能を弱いものの抑制することができた(Biochem Biophys Res Commun., 340(1):263-267 (2006))。本結果は、決して十分であるとは言えないものの in vivo で血液脳関門輸送機能の抑制した最初の報告として位置付けられる。

8-2) 高純度の脳毛細血管内皮細胞単離精製法の開発：

脳毛細血管内皮細胞は細胞容積で脳の 0.1% と極めて微量である。これまで遠心法とガラスビーズカラムの組み合わせによって単離する方法が主流であった。しかし、この方法では神経細胞やグリア細胞のコンタミが避けられないために、脳毛細血管内皮細胞の輸送担体や受容体の発現解析には限界があった。そこで、内皮細胞特異的な抗原 PECAM1 に対する抗体を用いた磁気ビーズ精製法を検討した(図16)。ラット及びマウス的大脑から神経細胞と星状膠細胞のコンタミをほぼ無視できる高純度の脳毛細血管内皮細胞画分を単離する新規の方法を開発した(Pharm. Res., 24 : 588-694 (2007), J. Neurochem., 104:147-154 (2008))。

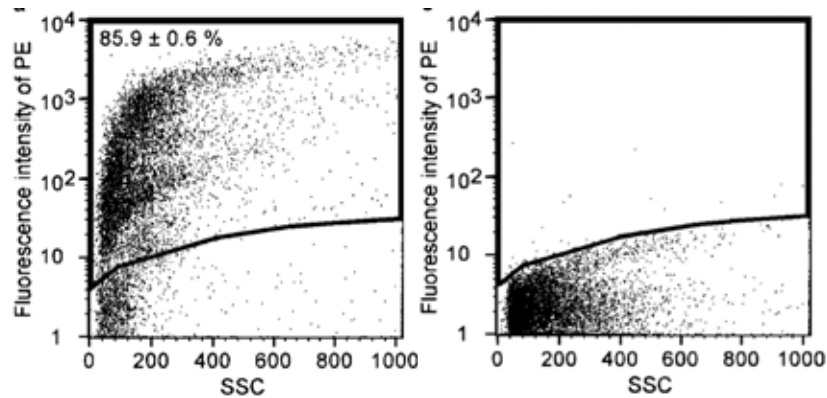


図16 内皮細胞マーカーPECAM1の抗体由来の蛍光(PE)のFACS解析。磁気ビーズ精製後、86%の細胞の population が PE 陽性に検出された(左図)。一方で、磁気ビーズ精製前のサンプルでは PE 陽性シグナルがほとんど検出されなかった(右図)。

9. 質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた新しい定量手法の開発

Aβの血液脳関門排出輸送機構の解明に限らず、輸送担体の実体解明において細胞膜に発現する蛋白質の同定は必須である。従来は、蛋白質の解析には抗体を用いる以外に方法がないだけでなく、絶対発現量を測定することは事実上不可能であったと言える。質量分析装置を用いた解析は、可溶性の蛋白質について技術開発が進んでいたが、細胞膜蛋白質は水に不溶であることから、質量分析の対象外サンプルであった。私達は、CREST 研究において、抗体の作成が研究の大きな鍵を握ることを数多く経験したことから、抗体を用いないで細胞膜蛋白質を定性分析し、さらに、その絶対発現量を測定する手法を開発することは、研究を加速する上で非常に重要であると考えた。そこで、当初の目標にはなかったが、「細胞膜蛋白質の高感度同時絶対定量法の開発」に取り組んだ。これには高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS/MS)を用いた。

前述のように、Aβの血液脳関門排出輸送過程と脳内代謝過程を評価する上で、脳内の非標識未変化体 Aβを代謝物と区別して正確に測定することは重要である。これまで、ELISA 法で Aβを測定することができたが、抗体の Aβ特異性から Aβの代謝物を測定する可能性は排除できなかった。質量分析計を用いた定量法の報告はあったが、サンプル前処理に抗体を用いることから、回収率の点から定量絶対値が得られるか不明であった。そこで、当初の目標にはなかったが、「LC-MS/MS を用いた Aβの高感度絶対定量法」の開発に取り組んだ。

9-1) 質量分析による膜タンパク質の同時定性・定量分析法の開発：

脳毛細血管内皮細胞における輸送担体の発現解析は PCR 法を用いた mRNA レベルか、あるいは抗体を用いた免疫染色法が主流である。輸送機能の実体を反映するタンパク質の定量的情報は、動物種差や病態変動の解析において非常に重要である。今後、ヒトの脳毛細血管内皮細胞膜における Aβの輸送担体・受容体の発現変動解析にむけて、マウス脳毛細血管内皮細胞膜に発現するタンパク質の定量法を開発した。単離した脳毛細血管をトリプシン処理、ペプチドライブラリー調整し、さらに、標的蛋白質の内部標準ペプチドを添加し、LC-MSMS を用いてピーク面積を測定し、検量線から定量値を求める方法である(図17)。この方法を用いて、37 分子の膜タンパク質を 1 fmol/sample の高感度で一斉に絶対発現量を定量することに世界で初めて成功した(*Pharm. Res.*, 25:1469-1483 (2008))。本技術をもちいてマウス脳毛細血管内皮細胞、肝臓、腎臓における膜タンパク質 36 分子の絶対発現プロファイルを同定することができた。さらに、非常に多くの時間を要するデータ解析についても本技術に特化した解析ソフトウェアを開発した。

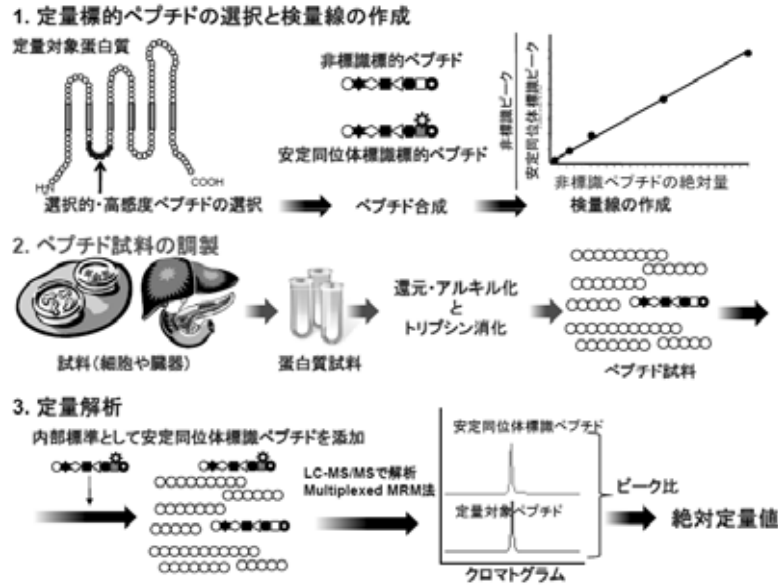


図 1 7 質量分析法を用いた生体試料中のトランスポータータンパク質の絶対定量の概要

9-2) 質量分析による膜タンパク質定量のための標的ペプチドの *in silico* 選択法の開発：

上記で開発した LC-MS/MS を用いた膜タンパク質の絶対定量において、検出感度の高い特異的なトリプシン消化ペプチドを標的ペプチドとして選択できることが定量精度と感度を決定する重要な要因である。従来はタンパク質試料を実際にプロテオミクス解析し、標的ペプチドを選択していたが、非常に時間がかかり、かつ、多量のタンパク質試料を要する。本プロジェクトでは、蓄積したデータから標的ペプチドを配列情報のみから *in silico* で選択する基準を開発した(*Pharm. Res.*, 25:1469-1483 (2008)) (表 3、図 1 8)。さらに、標的ペプチドの *in silico* 選択を自動化するソフトウェアを「平成 1 8 年度実用化検討」の採用によって完成させた。この成果によって、A β の輸送に関わる候補分子の同定と定量を非常に迅速に、かつ高い信頼性と感度で解析することを初めて可能になった。

Criteria for first selection (requirements)	
For detection using mass spectrometry	
Length between 6 and 16 amino acids	
No posttranslational modifications	
No single nucleotide polymorphism	
For complete digestion with trypsin	
No transmembrane region	
No continuous sequence of arginine or lysine in digestion region	
For stability of peptide	
No methionine or cysteine residues	
For stable isotope labeling	
Containing one of leucine, isoleucine, valine, alanine or proline residue	
Criteria for second selection (additional conditions)	
Length between 8 and 10 amino acids	
No histidine residue	

表 3 標的ペプチドの *in silico* 選択基準

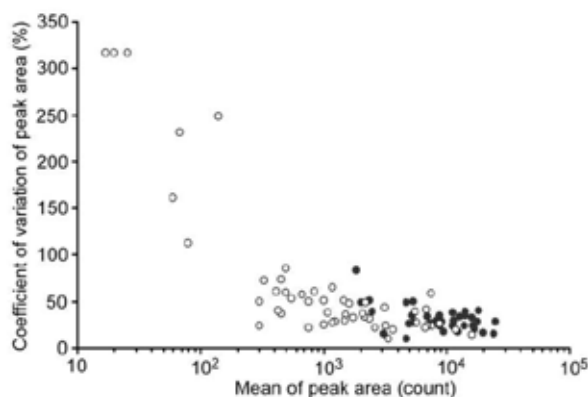


図 1 8 *In silico* 選択基準による選択ペプチドの感度: *In silico* 選択基準による選択ペプチド (10 fmol; ●) と Human serum albumin のトリプシン消化ペプチド群 (10 fmol; ○) のピーク強度 (面積) (横軸) 及びサンプルのバラツキ (縦軸)。Human serum albumin のトリプシン消化ペプチドは感度を示すピーク強度に 1000 倍の違いがあり、ピーク強度が小さいほ

どバラツキが大きかった。選択ペプチドは 10^3 count 以上のピークエリア強度 (面積) でありバラツキが小さく、定量に適している。

9-3) 質量分析法を用いた A β の定量法の開発：

A β の脳内での代謝分解過程は、血液脳関門排出輸送過程と併行しており、その寄与を解析するには A β の未変化体や代謝分解物を定量解析する方法を開発することが重要である。現在、A β の定量法は ELISA 法が用いられているが、未変化体や代謝分解物を網羅的に定量解析するには質量分析装置を用いる必要がある。高感度質量分析装置 (UPLC-MS/MS) を用いることで、脳試料から A β を効率よく抽出し、13 fmol/sample の hA β (1-40) を定量できるレベルに達した (図 1 9)。この感度は ELISA 法に匹敵する。

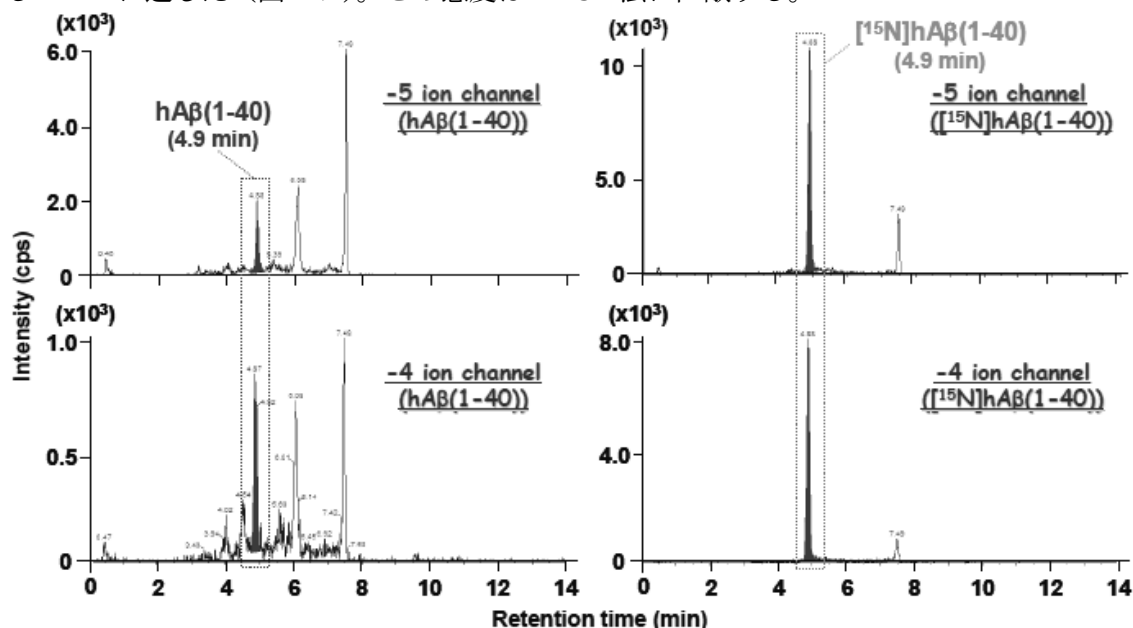


図 1 9 マウス脳内に投与した hA β (1-40) の UPLC-MS/MS を用いた検出 (左図)。右図は、内部標準として添加した ^{15}N 標識 hA β (1-40) のクロマトグラム。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

図 2 0 に示したように、脳内で産生された A β は 2 量体を形成、あるいは LRP ligand との複合体を形成すると脳から血液方向へ排出されないことが分かった。脳内の A β は脳 1 グラム当たり 570 pg/min の速度で消失することが示された。一方、脳脊髄液関門を介した A β の消失は 41 pg/(min g brain) であることが示された。つまり、A β の消失経路に関して血液脳脊髄液関門の寄与は 10% 以下と小さいことが示された。代謝分解過程は約 20% が寄与すると推察され、LRP-1 を介した脳から血液方向の排出輸送は最大で 20% が寄与すると推察された。血液脳関門を介した A β の脳から血液方向への輸送に関わる分子の同定には至らなかったが、輸送系の複合体の一部を形成している可能性のある蛋白質を見出した。A β 輸送の実体解明研究は引き続き行う。血液中へ移行した A β は肝臓の血管を 1 回流れるごとに約 70% が肝細胞に取り込まれる。これは肝細胞膜に局在する LRP-1 が担っており、絶食時にその細胞膜上の発現量が低い、インスリンによって LRP-1 の細胞内から細胞膜へのソーティングが促進され細胞膜上の発現量が上昇することによって、A β の輸送速度が増加することが分かった。さらに、in vivo で A β の脳からの消失を促進する化合物を 2 つ見出したことから、これをリード化合物として A β の脳内蓄積抑制作用を有する作用薬の開発へ研究をさらに発展させたい。

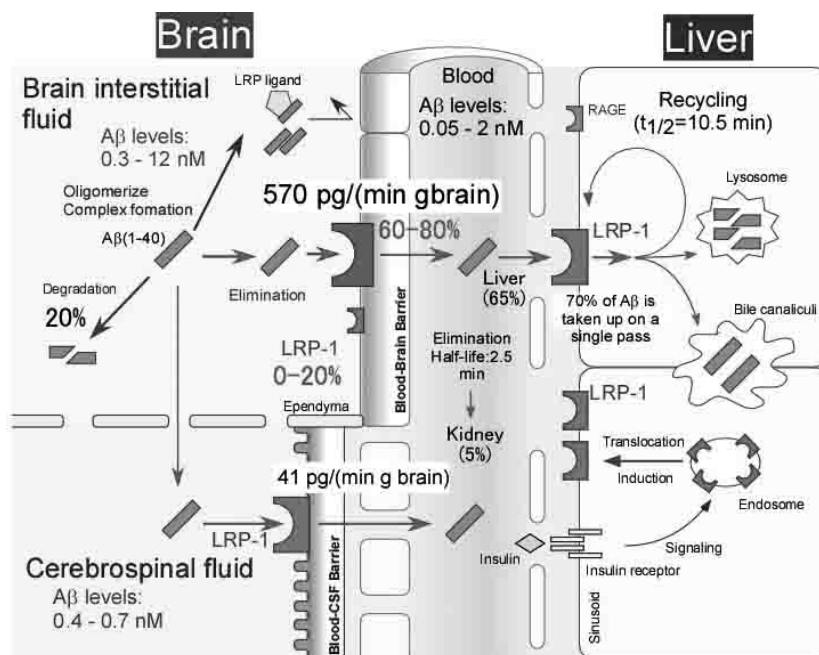


図 2 0 脳内で産生された Aβ の体内動態機構

当初の計画になかったが、LC-MS/MS を用いた非標識未変化 Aβ の高感度絶対定量法の開発に成功したことが成果のひとつとして挙げられる。この手法の開発によって、脳、脳脊髄液、血液中の Aβ 及び代謝物を直接定量するという臨床応用の可能性が出てきた。

本研究を促進するために、当初の計画になかったが細胞膜蛋白質の高感度同時絶対定量法を開発したことは、特筆すべき成果として挙げられる。図 2 1 に示すように、この手法は細胞膜蛋白質だけでなくあらゆる蛋白質の絶対定量を実現したことから、その応用性は幅広い。発現量を疾患などで単に比較するだけでなく、蛋白質の 1 分子活性を基に *in vivo* 機能を再構築する上で必須の技術であると言える。図 2 2 に示すように、創薬研究において課題であった動物種差や正常と病態の違いなど多くのギャップを、機能性蛋白質の絶対定量値を用いて解明することができると考えられる。蛋白質発現量と機能を統合することで *pharmacoproteomics* という新しい学問分野の構築が始まると考えられる。

この新技術は、他の多くの分野への応用が可能であり、大学発ベンチャー創出推進事業の課題として採択され、成果の社会還元を目指した実用化研究へ発展させつつある。



図 2 1 LC-MS/MS を用いた蛋白質の高感度同時絶対定量法が開発されたことで、薬物の体内動態や効果や毒性に関わる機能性蛋白質の定量が可能になった。ヒトの生体機能を評

価することは困難であるが、機能を担う蛋白質の絶対量を測定し、各々の蛋白質の1分子活性と統合することで機能を再構築する道を開いた。

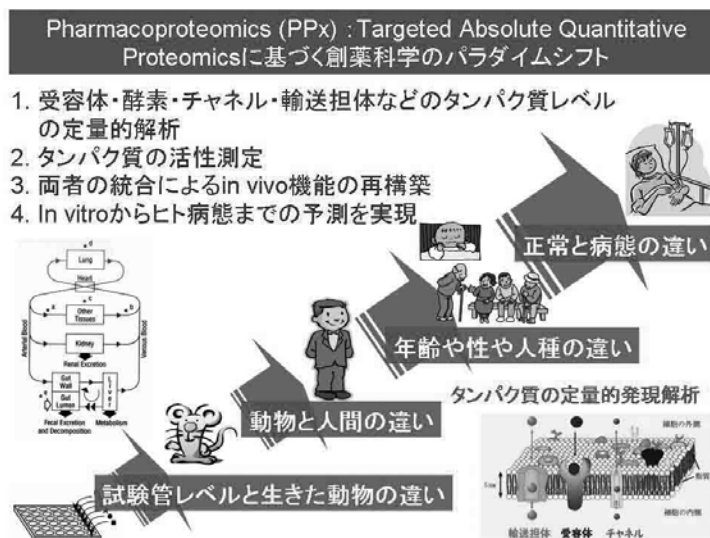


図2-2 LC-MS/MSを用いた蛋白質の高感度同時絶対定量法の開発によって、これまでブラックボックスのままであった機能性蛋白質の絶対発現量が明らかになる。これらの値に基づいて「違い」の本質を解明し、創薬研究を大きく発展させることが期待できる。Pharmacoproteomics という新しい学問領域の創生が始まる。

4. 2 “In vitro 血液脳関門モデルを用いた LRP-1 を介した hAβ(1-40) 輸送における複合体効果の解析を担当 (東京大学グループ)”

(1) 実施の内容

1. In vitro 血液脳関門モデルを用いた LRP-1 を介した hAβ(1-40) 輸送における複合体効果の解析：

岩坪グループでは、寺崎グループが確立した条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 TR-BBB 細胞を用い、a) TR-BBB 細胞が $[^{125}\text{I}]$ 標識した hAβ(1-40) を迅速に取り込み、速やかに排出すること、b) TR-BBB 細胞による $[^{125}\text{I}]$ hAβ(1-40) 取り込みは受容体を介していること、c) TR-BBB 細胞による $[^{125}\text{I}]$ hAβ(1-40) 取り込みは LDL 受容体 family の阻害剤である RAP により阻害されることを見いだした。さらに d) LRP-1 を発現する MEF1 細胞で $[^{125}\text{I}]$ Aβ(1-40) 取り込みが見られないこと、e) 精製した LRP-1 と hAβ(1-40) の直接結合が認められないこと、も明らかにした。これらの結果から TR-BBB 細胞には LRP-1 及び未知の co-receptor を介した hAβ(1-40) 取り込み機構が存在する可能性が考えられた (図2-3, 2-4)。

さらに、LRP-1 を発現する他の培養細胞では $[^{125}\text{I}]$ hAβ(1-40) の取り込みが検出できなかったことから、TR-BBB 細胞は、LRP-1 を介した hAβ(1-40) の輸送解析に有用な評価系であることが示された (J. Biol. Chem., Epub ahead of print)。

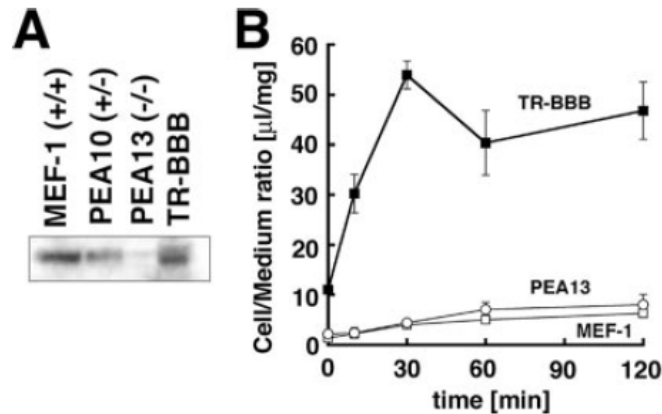


図 2 3 TR-BBB 細胞は $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ 取り込み輸送活性を有していた(B)。MEF-1 細胞は TR-BBB 細胞と同レベルの LRP-1 を発現しているが(A)、 $[^{125}\text{I}]\text{hA}\beta(1-40)$ の取り込み輸送活性は非常に低かった。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

Zlokovic らの報告以降、血液脳関門を介した $\text{A}\beta$ 排出輸送には LRP-1 が直接関与していると考えられてきた。しかし、岩坪グループの解析によって、LRP-1 が直接 $\text{A}\beta$ と結合しているのではなく、co-receptor を介して $\text{A}\beta$ の輸送に関わっているという全く新しいモデルを提唱した (図 2 4)。今後、co-receptor の同定などのさらなる解析が必要であるが、本成果は新薬の新しいターゲットを提示しただけではなく、アルツハイマー病の発症機構の解明にも重要な知見を与えるものである。さらに、TR-BBB 細胞が血液脳関門における $\text{A}\beta$ 輸送の in vitro 系として有用であることを示したことは、本系が今後の輸送解析、さらには化合物スクリーニングにも有効であることを示しており、関連領域に対して有用な評価系を提示することができた。

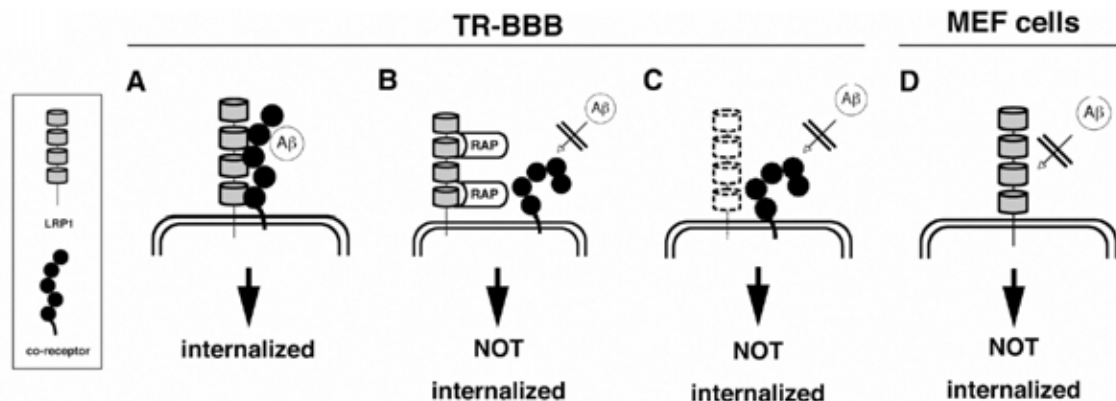


図 2 4 TR-BBB 細胞の $\text{hA}\beta(1-40)$ 取り込みにおける co-receptor 仮説

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

5-1) 脳内 $\text{A}\beta$ の消失機構と治療薬の開発

脳内 $\text{A}\beta$ の消失機構として、代謝酵素による分解、グリア細胞による貪食および血液脳関門や血液脳脊髄液関門を介した脳から循環血液中への排出輸送が提唱されている (Selkoe, 2001)。Iwata ら (2000) は、中性エンドペプチダーゼ様のプロテアーゼ neprilysin が脳内 $\text{A}\beta$ (1-42)分解を担う主要な酵素であることを neprilysin 遺伝子欠損マウスを用いた検討結果に基づいて示唆した (Iwata et al., 2001)。脳内 $\text{A}\beta$ 分解酵素として、さらに、endothelin-converting enzyme (ECE) および insulin-degrading enzyme (IDE) が報告されている (Eckman et al., 2003; Farris et al., 2003)。ECE は至適 pH が酸性側にあるため、主に細胞内の酸性コンパートメントにおける $\text{A}\beta$ 分解に関与していると考えられ、IDE は $\text{A}\beta$ よ

り AICD の分解に関与するとの見方が強い (Farris et al., 2003)。Neprilysin を脳内に過剰発現させることによって、AD モデルマウスにおける脳内 A β 濃度が低下することや (Iwata et al., 2004)、neprilysin は神経細胞に発現する somatostatin 受容体を介して発現調節されていることが報告された (Saito et al., 2005)。Neprilysin は加齢によって発現が減少するため (Iwata et al., 2002)、somatostatin 受容体の神経細胞に高発現するサブタイプに対するアゴニストが neprilysin の発現増加を作用機序とした AD 型認知症治療薬となる可能性が示されている。

一方、AD 脳の老人斑アミロイドコアの周囲には変性した神経突起と共に反応性アストロサイトや活性化ミクログリアが観察される。アストロサイトは、apolipoprotein (apoE) と結合した A β を low-density lipoprotein related-protein (LRP) 依存的な経路によって細胞内に取り込み、分解することが報告されている (Arelín et al., 2002; Wyss-Coray et al., 2003; Koistinaho et al., 2004)。また、AD 脳の活性化ミクログリアは、receptor for advanced glycation end-product (RAGE)、scavenger receptor および folmyl peptide receptor-like (FPRL) を介して A β やアミロイド繊維を認識して貪食する。Heat shock protein 90 はミクログリアによる A β の貪食を増加させる (Kakimura et al., 2002) のに対し、high mobility group box protein 1 はそれを抑制することが報告されている (Takata et al., 2004)。従って、ミクログリアをターゲットとした新たな AD 型認知症治療薬の可能性が示唆されている。

Shibata らは、マウスを用いて LRP-1 が BBB における hA β (1-40)排出輸送に対する主要分子であることを示唆した (Shibata et al., 2000)。さらに、Shibata ら (2000) は hA β (1-40) は脳内で apoE や α 2M と複合体を形成し、脳からの LRP-1 を介した hA β (1-40)排出が促進されると考察している (Shibata et al., 2000)。本研究によって、LRP-1 を介した脳から血液方向の排出機構、及び hA β (1-40)が脳内 LRP-1 リガンドと複合体を形成して脳から血液方向へ排出されるという LRP-1 機構は寄与が非常に少ないことが示唆された (Ito et al., 2006, Ito et al., 2007)。

本研究によって、insulin が BBB を介した hA β (1-40)排出輸送を阻害することを明らかにした。A β は insulin 受容体と結合することが報告されている (Xie et al., 2002)が、本研究では、insulin 受容体チロシンキナーゼ阻害剤存在下において hA β (1-40)排出は変化しなかった。一方、IDE 阻害剤存在下では hA β (1-40)排出輸送は減少した (Shiiki et al., 2004)。これらの結果から、本研究によって、insulin による hA β (1-40)排出輸送の阻害効果は insulin 受容体を介した作用でなく、一部 IDE 阻害による効果であることが示唆された。

P-gp は ATP 依存的に hA β (1-40)および hA β (1-42)と直接結合することから、BBB の血液側膜における hA β 排出輸送に P-gp の関与が推察されている (Lam et al., 2001)。P-gp 遺伝子欠損マウス脳に投与した [125 I]hA β (1-40)および [125 I]hA β (1-42)の排出輸送は野生型マウスに比べて減少し、さらに、P-gp 遺伝子欠損/APP TG マウスの脳内 A β 蓄積量は APP TG マウスよりも増加していることが報告された (Cirrito et al., 2005)。P-gp 遺伝子欠損/APP Tg マウス脳の病理像は、BBB における P-gp 発現量が減少したヒト脳における病理像と類似しているため (Vogelgesang et al., 2002)、BBB における P-gp 発現量の減少は脳内 A β 蓄積に対して何らかの促進作用を示すことが推察される。本研究では、[125 I]hA β (1-40)の脳からの排出に対して P-gp 阻害剤は影響しないという結果が得られ、P-gp は hA β (1-40)排出輸送に寄与していないことが示唆された (Ito et al., 2006)。

静脈内投与された [125 I]hA β (1-40)は主に肝臓を介して消失半減期 2.5 分で循環血液中から消失することが報告された (Hone et al., 2003; Ghiso et al., 2004; Kandimalla et al., 2005)。本研究では、肝臓に発現する LRP-1 を介した輸送が末梢における A β クリアランスの中心的な役割を果たすことを明らかにした (Tamaki et al., 2006)。さらに、insulin は LRP-1 の細胞膜上の LRP-1 の発現量を上昇させ、[125 I]hA β (1-40)の肝臓への取り込みを上昇させることを明らかにした (Tamaki et al., 2007)。Insulin 抵抗性時には、肝臓を介した A β クリアランスが低下することが考えられる。

循環血液中の hA β (1-40)は一部脳内に移行し、receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) や LRP-2 が関与することが静脈内投与法や脳灌流法を用いた解析から示唆されている (Zlokovic, 1996; Poduslo et al., 2001; Deane et al., 2003)。Deane ら

(2004a) は、加齢によって BBB における RAGE の発現量の増加と LRP-1 の発現量の低下が起こることによって、循環血液中から脳への A β 流入が増加すると推測しており、循環血液中 A β が脳内 A β 蓄積に関与していると考察している。しかし、Poduslo らのグループは、AD モデルマウスに静脈内投与した [125 I]hA β (1-40)が脳内の老人斑から観察されないことから、BBB に発現する A β 流入輸送は脳内 A β 蓄積に対して寄与はほとんどなく、脳からの排出や脳内での分解の低下が脳内 A β 蓄積に重要な役割を果たしていると報告している (Wengenack et al., 2000; Kandimalla et al., 2005)。本研究によって、hA β (1-40)の脳から血液方向の排出クリアランスは、血液から脳内への取り込みクリアランスに比べて 2~10 倍大きいことが明らかになり、後者の説が有力であることが示唆された。

血液脳関門を介した A β クリアランスを上昇させることは脳内の A β 蓄積を防ぐこととなり、そのような効果を持つ化合物は AD 型認知症治療薬のシーズ化合物となる可能性があるが、これまでのそのような効果を持つ化合物の報告はない。本研究では、血液脳関門の A β 輸送を評価できる *in vitro* 系を構築し、スクリーニングを行った結果、*in vivo* においても A β クリアランスを上昇させる化合物 2 種類を見いだした。

5-2) LC-MS/MS を用いた蛋白質の高感度同時絶対定量法

質量分析計 (MS)を用いた大規模なタンパク質解析は「プロテオミクス」と総称され、抗体を用いた個別研究が主体であった生命科学分野にブレイクスルーをもたらした。2000 年前後から、プロテオミクス研究は生命科学のみならず、臨床研究にも急速に広まっていった。疾患患者の組織や血液中に特異的に発現するタンパク質は、創薬や診断に繋がることが期待されるため、そのバイオマーカー探索研究が盛んに行われた。しかし、バイオマーカー探索が治療に繋がった成功例は少なく、臨床応用は非常に狭い範囲に限られているのが現状である (Ludwig & Weinstein, 2005)。「プロテオミクス」は、バイオマーカー探索に代表される大規模なタンパク質発現解析を行う「発現プロテオミクス」とタンパク質間相互作用を始めとする機能を網羅的に解析する「機能プロテオミクス」に大きく分類される。

網羅的なタンパク質発現解析には、高いタンパク質分離能が必要である。プロテオミクスが生まれる以前から、生化学分野では 2D-PAGE がタンパク質分離検出法として汎用されていた。しかし、分離されたタンパク質の同定にはペプチドシーケンサーや抗体を用いるしかなく、ハイスループットで高感度な検出法が必要であった。近年の MS と *In gel digestion* 法の進歩によって 2D-PAGE / MS が確立されると、2D-PAGE は容易なタンパク質分離法としてプロテオミクスの最もスタンダードな手法となった。また、2 種類の波長が異なる蛍光色素でプレラベル化する 2D-DIGE 法 (two-dimensional difference gel electrophoresis) が開発され (Unlu, et al., 1997)、サンプル間でのタンパク質量の相対比較が容易になり、バイオマーカー探索への応用が加速することとなった。

MS は質量によって分離検出するため、一方のサンプルのタンパク質 (アミノ酸) を安定同位体標識すれば、サンプル間のタンパク質に質量差が生じ、複数サンプル間のタンパク質発現量を相対的に比較することが可能である。安定同位体標識法には、予め安定同位体標識したアミノ酸を含む培地中で細胞を培養することで細胞中のタンパク質をラベル化する代謝標識法と ICAT 法や iTRAQ 法に代表されるように細胞からタンパク質を抽出後に分子量が異なる同位体試薬を反応させる化学標識法がある (Gygi, et al., 1999, Laz, et al., 2004)。その他、SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) 法のように、チップに固定化した官能基に目的タンパク質を捕捉し、効率よくイオン化し、MS で検出するという方法も開発され、バイオマーカー探索研究の加速に繋がっている (Kuwata et al., 1998)。トランスポーターを始めとする膜タンパク質は、極めて難溶性であり、タンパク質レベルで分離精製することは困難である。生体試料タンパク質のトリプシン消化ペプチドを高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で網羅的に検出するショットガン法は、難溶性のタンパク質にも適応可能であり、タンパク質同定法として汎用されてきた。本研究で開発したタンパク質の絶対定量法は、ショットガン法を応用したものである。ショ糖勾配遠心分離法によって細胞や組織から抽出した膜タンパク質は、7M グアニジン塩酸で可溶化し、還元アルキル化後にプロテアーゼ処理を行う。それによって効率よく酵素消化を行い、安定同位体標識した合成ペプチドを加え、内部標準法によって定

量している。

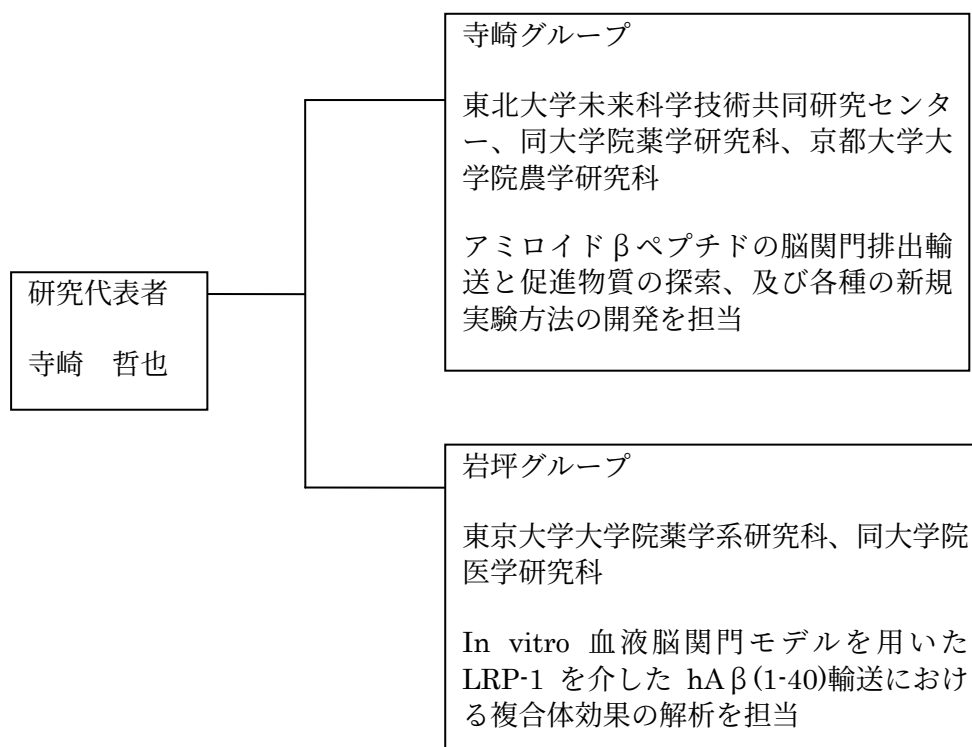
しかし、ショットガン法では膨大なノイズペプチドによって、トランスポーターのような微量タンパク質を検出することは非常に困難であった。タンデム質量分析計の **selected reaction monitoring (SRM)** モードは、対象のペプチドを特異的に検出することでその課題を解決した。イオン化されたペプチド (親イオン) は、質量フィルターを通過後、窒素などの不活性化ガスによって破壊され、それにより生じたペプチド断片 (娘イオン) を第2の質量フィルターで検出することで、選択的に微量成分由来のペプチドを同定できる。複数の質量フィルター設定を高速に切り換えることで、複数のペプチドを一分析で測定することが可能である。また、不活性化ガスによるフラグメンテーションはアミド結合部位で起こり易いため、1つのペプチドから生成する質量の異なる3つ以上の娘イオンを検出すれば連続した2残基以上のアミノ酸配列が帰属できる。さらに、標的ペプチドと同一のアミノ酸配列を持つ安定同位体標識ペプチドを合成し、既知量を試料中に加えることで内部標準として用いる。以上の、アミノ酸配列情報及び標的-内部標準ペプチドピーク間のLC溶出時間の一致から、信頼性の高い定量値が得られる (**multiplexed MRM**)。

本来、プロテオミクスは発現タンパク質全体 (プロテオーム) の解析を目的とするため、その網羅性が追求されてきた。近年、これに対して **focused proteomics** あるいは **targeted proteomics** と呼ばれる分野が生まれてきた。発現器官や翻訳後修飾など特定のタンパク質群に焦点を絞ったタンパク質解析であり、本研究で開発した定量法も特定の蛋白質に標的を絞っている点で、この1分野であると言える。本方法で同時定量可能なのは、現在、最大で **37 タンパク質 / assay** であり、網羅性に欠ける。しかし、微量タンパク質を検出できる、絶対定量値が得られるという2つの大きな利点がある。

従って、本定量法はタンパク質が関与する生命科学のあらゆる領域で利用される可能性が高い汎用性の高い基盤技術として位置付けることができる。

6. 研究実施体制

(1)体制



(2)メンバー表

①東北大学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
寺崎 哲也	東北大学大学院薬学研究科	教授	研究総括	平成15年12月～平成21年3月
大槻 純男	東北大学大学院薬学研究科	准教授	Aβ輸送系解析	平成15年12月～平成21年3月
伊藤 慎悟	東北大学大学院薬学研究科	研究員	AβのBBB輸送系解析	平成15年12月～平成19年10月
		助教	AβのBBB輸送系解析	平成19年11月～平成21年3月
勝倉 由樹	東北大学大学院薬学研究科	JST研究員	プロテオミクス解析	平成18年10月～平成21年3月
船山 直子	東北大学大学院薬学研究科	JST研究補助員	研究事務	平成15年12月～平成21年3月
川上 裕貴	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	プロテオミクス解析	平成19年4月～平成21年3月
内田 康雄	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	Aβ輸送系解析	平成18年4月～平成21年3月
伊藤 克彰	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	Aβ輸送系解析	平成20年4月～平成21年3月

岩瀬 怜	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	プロテオミクス解析	平成19年4月～平成21年3月
大峰 健	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	プロテオミクス解析	平成19年4月～平成21年3月
松宮 浩太	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成19年4月～平成21年3月
高橋 祥	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成19年4月～平成21年3月
相澤 三四郎	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成20年4月～平成21年3月
池田 千絵美	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成20年4月～平成21年3月
村田 将	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成20年4月～平成21年3月
若林 良太	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成20年4月～平成21年3月
堀 里子	東北大学大学院薬学研究科	助手	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成17年3月
立川 正憲	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成17年3月
Jiraganya Bhongsatiern	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成16年9月
鈴木 博也	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	神経毒性物質輸送解析	平成15年12月～平成17年3月
松田 明大	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成17年3月
Miron Madalina	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成17年3月
浅島 朋子	東北大学大学院薬学研究科	助手	神経毒性物質輸送解析	平成15年12月～平成18年3月
壺岐 裕子	東北大学大学院薬学研究科	JST 研究員	A β 輸送系解析	平成17年4月～平成17年8月
上家美和子	東北大学大学院薬学研究科	JST 研究員	質量分析	平成17年5月～平成18年1月
田牧 千裕	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	抗体作成	平成15年12月～平成18年3月
佐藤 沙麻里	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	肝輸送系解析	平成15年12月～平成18年3月
柳 利樹	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成15年12月～平成18年3月
山口 啓史	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	神経毒性物質輸送解析	平成15年12月～平成18年3月
大浦 和人	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成16年4月～平成18年3月
荒井 杏子	東北大学大学院薬学研究科	JST 研究員	A β 輸送系解析	平成18年4月～平成18年9月
上野 孝哉	東北大学大学	大学院生	A β 輸送系解析	平成17年4月～平成19年3月

	院薬学研究科			
土井 陽子	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
荒木加世子	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月
赤沼 伸乙	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 15 年 12 月～平成 19 年 9 月
上家 潤一	東北大学大学院薬学研究科	助教	プロテオミクス解析	平成 17 年 4 月～平成 19 年 10 月
植田 和光	京都大学大学院農学研究科	教授	ABCA1 の役割解析	平成 15 年 12 月～平成 20 年 3 月
藤吉 正哉	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	脳脊髄液関門解析	平成 15 年 12 月～平成 20 年 3 月
木村 周古	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	神経毒性物質輸送解析	平成 15 年 12 月～平成 20 年 3 月
小田島 大雅	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	神経毒性物質輸送解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
柊津 泰子	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
船木 美歩	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
矢内 一成	東北大学大学院薬学研究科	大学院生	A β 輸送系解析	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
Yan Li	東北大学大学院薬学研究科	研究員	A β の BBB 輸送系解析	平成 20 年 4 月～平成 21 年 1 月

②東京大学グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岩坪 威	東京大学大学院医学研究科	教授	内因性 A β 組織蓄積性解析	平成 15 年 12 月～平成 21 年 3 月
橋本 唯史	東京大学大学院医学研究科	助教	内因性 A β 組織蓄積性解析	平成 15 年 12 月～平成 20 年 4 月
山田 薫	東京大学大学院薬学系研究科	研究員	内因性 A β 組織蓄積性解析	平成 15 年 12 月～平成 21 年 2 月
矢吹 千織	東京大学大学院薬学系研究科	大学院生	内因性 A β 組織蓄積性解析	平成 17 年 4 月～平成 19 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

- (1) ワークショップ・シンポジウム等 (ありません)
- (2) 招聘した研究者等 (ありません)

8. 発展研究による主な研究成果

- (1) 論文発表 (英文論文 51 件 邦文論文 11 件)

Original Articles

1. S. Hori, S. Ohtsuki, K. Hosoya, E. Nakashima, T. Terasaki: A Pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain

- capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. **J. Neurochem.**, 89: 503-513 (2004)
2. S. Ohtsuki, T. Kikkawa, S. Mori, S. Hori, H. Takanaga, M. Otagiri, T. Terasaki: Mouse "reduced in osteosclerosis" transporter (Roct) functions as an organic anion transporter 3 (mOAT3) and is localized at abluminal membrane of blood-brain barrier. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 309: 1273-1281 (2004)
 3. Y. Deguchi, Y. Naito, S. Ohtsuki, Y. Miyakawa, K. Morimoto, K. Hosoya, S. Sakurada, T. Terasaki: Blood-brain barrier permeability of novel [D-Arg²]dermorphin (1–4) analogues: transport property is related to the slow onset of antinociceptive activity in the central nervous system. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 310: 177-184 (2004)
 4. S. Hori, S. Ohtsuki, M. Tachikawa, N. Kimura, T. Kondo, M. Watanabe, E. Nakashima, T. Terasaki: Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). **J. Neurochem.**, 90:526-536 (2004)
 5. K. Hosoya, A. Minamizono, K. Katayama, T. Terasaki, M. Tomi: Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood-retinal barrier. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, 45: 1232-1239. (2004).
 6. W. Pan, A.J. Kastin, T.C. Zankel, P. van Kerkhof, T. Terasaki, G. Bu: Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. **J. Cell Sci.**, 117:5071-5078 (2004)
 7. S. Ohtsuki, T. Takizawa, H. Takanaga, S. Hori, K. Hosoya, T. Terasaki: Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cells. **J. Neurochem.**, 90:743-749 (2004)
 8. S. Mori, S. Ohtsuki, H. Takanaga, T. Kikkawa, Y.S. Kang, T. Terasaki: Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of thiopurine nucleobase analogs. **J. Neurochem.**, 90:931-941 (2004)
 9. T. Nakashima, M. Tomi, K. Katayama, M. Tachikawa, M. Watanabe, T. Terasaki, K. Hosoya: Blood-to-retina transport of creatine via creatine transporter (CRT) at the rat inner blood-retinal barrier. **J. Neurochem.**, 89: 1454-1461 (2004).
 10. M. Tachikawa, M. Fukaya, T. Terasaki, S. Ohtsuki, M. Watanabe: Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis., **Eur. J. Neurosci.**, 20:144-160 (2004)
 11. S. Ohtsuki, Y. Watanabe, S. Hori, H. Suzuki, J. Bhongsatiern, M. Fujiyoshi, M. Kamoi, N. Kamiya, H. Takanaga, T. Terasaki: mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. **Biol. Pharm. Bull.**, 27:1437-1440 (2004)
 12. M. Tomi, H. Abukawa, Y. Nagai, T. Hata, H. Takanaga, S. Ohtsuki, T. Terasaki, K. Hosoya: Identification of selectively expressed genes in rat retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) by mRNA differential display analysis involving brain capillary endothelial cell lines (TR-BBB). **Mol. Vis.**, 10:537-543 (2004)
 - 13. T. Shiiki, S. Ohtsuki, A. Kurihara, H. Naganuma, K. Nishimura, M. Tachikawa, K. Hosoya, T. Terasaki: Brain insulin impairs amyloid- β (1-40) clearance from the brain. **J. Neurosci.** 24:9632-9637 (2004)
 14. T. Kondo, K. Hosoya, S. Hori, M. Tomi, S. Ohtsuki, T. Terasaki: PKC/MAPK signaling suppression by retinal pericyte conditioned medium prevents retinal endothelial cell proliferation. **J. Cell. Physiol.** 203:378-386 (2005)
 15. J. Bhongsatiern, S. Ohtsuki, M. Tachikawa, S. Hori, T. Terasaki: Retinal specific ATP-binding cassette transporter (ABCR/ABCA4) is expressed at the choroid plexus in rat brain. **J. Neurochem.** 92:1277-1280 (2005)
 16. S. Hori, S. Ohtsuki, M. Ichinowatari, T. Yokota, T. Kanda, T. Terasaki: Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. **J. Neurochem.** 93:63-71 (2005)
 17. S. Ohtsuki, M. Tomi, T. Hata, Y. Nagai, S. Hori, S. Mori, K. Hosoya, T. Terasaki: Dominant expression of androgen receptors and their functional regulation of organic anion transporter 3 in rat brain capillary endothelial cells; comparison of gene

- expression between the blood-brain and -retinal barriers. *J. Cell. Physiol.* 204:896-900 (2005)
18. S. Ohtsuki, N. Kamiya, S. Hori, T. Terasaki: Vascular endothelium-selective gene induction by Tie2 promoter/enhancer in the brain and retina of a transgenic rat. *Pharm. Res.* 22:852-857 (2005)
 19. P. Garberg, M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, RD Hurst, T. Lindmark, A. Mabondzo, JE Nilsson, TJ Raub, D Stanimirovic, T. Terasaki, JO Oberg, T. Osterberg : In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro.* 19: 299-334 (2005)
 20. T. Nakashima, M. Tomi, M. Tachikawa, M. Watanabe, T. Terasaki, K. Hosoya: Evidence for creatine biosynthesis in Muler glia. *Glia* 52:47-52 (2005)
 21. M. Tomi, M. Mori, M. Tachikawa, K. Katayama, T. Terasaki, K. Hosoya: L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1)-Mediated L-Leucine Transport at the inner Blood-Retinal Barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2522-2530 (2005)
 22. Jie Zhou, Baljit K. Deo, Kenichi Hosoya, Tetsuya Terasaki, Irina G. Obrosova, Frank C. Brosius, III, Arno K. Kumagai: Increased JNK Phosphorylation and Oxidative Stress in Response to Increased Glucose Flux through Increased GLUT1 Expression in Rat Retinal Endothelial Cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 46:3403-3410 (2005)
 23. YS. Kang, KE. Lee, NY. Lee, T. Terasaki: Donepezil, tacrine and alpha-phenyl-n-tert-butyl nitron (PBN) inhibit choline transport by conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines (TR-BBB). *Arch Pharm Res.* 28:443-450 (2005)
 24. T. Deguchi, Y. Kouno, T. Terasaki, A. Takadate, M. Otagiri: Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm. Res.* 22:619-627 (2005)
 25. M. Okabe, M. Unno, H. Harigae, M. Kaku, Y. Okutsu, T. Saeki, T. Mizoi, K. Shiiba, H. Takanaga, T. Terasaki, S. Matsuno, I. Saeki, T. Abe: Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: A doxorubicin importer. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:754-762 (2005)
 26. T. Tachikawa, M. Watanabe, S. Hori, M. Fukaya, S. Ohtsuki, T. Asashima, T. Terasaki: Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult brain. *J. Neurochem.* 95:294-304 (2005)
 27. T. Deguchi, K. Isozaki, K. Yousuke, T. Terasaki, M. Otagiri: Involvement of organic anion transporters in the efflux of uremic toxins across the blood-brain barrier. *J Neurochem.*, 96(4):1051-1059 (2006).
 28. T. Hino, T. Yokota, S. Ito, K. Nishina, YS Kang, S. Mori, S. Hori, T. Kanda, T. Terasaki, Mizusawa H., In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 340(1):263-267 (2006).
 29. T. Asashima, S. Hori, S. Ohtsuki, M. Tachikawa, M. Watanabe, C. Mukai, S. Kitagaki, N. Miyakoshi, T. Terasaki: ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. *Pharm Res.*, 23:1235-1242 (2006)
 30. C. Tamaki, S. Ohtsuki, T. Iwatsubo, T. Hashimoto, K. Yamada, C. Yabuki, T. Terasaki: Major involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in the clearance of plasma free amyloid beta-peptide by the liver. *Pharm Res.*, 23:1407-1416 (2006)
 - 31. S. Ito, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid- β peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci. Res.* 56:246-252 (2006)
 32. M. Belanger, T. Asashima, S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, S. Ito, T. Terasaki: Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. *Neurochem. Int.*, 50:95-101 (2007)
 33. S. Ohtsuki, S. Sato, H. Yamaguchi, M. Kamoi, T. Asashima, T. Terasaki: Exogenous expression of claudin-5 induced barrier properties in cultured rat brain capillary

- endothelial cells. **J. Cell. Physiol.**, 210:81-86 (2007)
34. M. Fujiyoshi, S. Ohtsuki, S. Hori, M. Tachikawa, T. Terasaki: 24S-Hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression. **J. Neurochem.** 100:968-978 (2007)
 35. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, T. Asashima, T. Terasaki: Establishing a method to isolate rat brain capillary endothelial cells by magnetic cell sorting and dominant mRNA expression of multidrug resistance-associated protein 1 and 4 in highly purified rat brain capillary endothelial cells. **Pharm. Res.**, 24:588-694 (2007)
 36. S. Ohtsuki, M. Kamoi, Y. Watanabe, H. Suzuki, S. Hori, T. Terasaki: Correlation of induction of ATP binding cassette transporter A5 (ABCA5) and ABCB1 mRNAs with differentiation state of human colon tumor. **Biol. Pharm. Bull.**, 30:1144-1146 (2007)
 37. S. Ohtsuki, S. Ito, A. Matsuda, S. Hori, T. Abe, T. Terasaki: Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. **J. Neurochem.**, 103:1430-1438 (2007)
 38. C. Tamaki, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid β -peptide (1-40) by intracellular translocation of LRP-1 to the plasma membrane in hepatocytes. **Mol. Pharmacol.**, 72:850-855 (2007)
 - 39. S. Ito, S. Ohtsuki, J. Kamiie, Y. Nezu, T. Terasaki: Cerebral clearance of human amyloid- β peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. **J. Neurochem.**, 103:2482-2490 (2007)
 40. S. Akanuma, S. hori, S. Ohtsuki, M. Fujiyoshi, T. Terasaki: Expression of nuclear receptor mRNA and liver X receptor-mediated regulation of ABC transporter A1 at rat blood-brain barrier. **Neurochem. Int.**, 52: 669-674 (2008)
 41. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, T. Terasaki: mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. **J. Neurochem.**, 104:147-154 (2008)
 42. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Multichannel liquid chromatography–tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. **Pharm. Res.**, 24:2281-2296 (2007)
 43. S. Akanuma, S. Ohtsuki, Y. Doi, M. Tachikawa, S. Ito, S. Hoti, T. Asashima, T. Hashimoto, K. Yamada, K. Ueda, T. Iwatsubo, T. Terasaki: ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid- β peptide (1-40) at the blood-brain barrier. **Neurochem. Int.**, 52:955-961 (2008)
 - 44. J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki: Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. **Pharm. Res.**, 25:1469-1483 (2008)
 - 45. K. Yamada, T. Hashimoto, C. Yabuki, Y. Nagae, M. Tachikawa, D.K. Strickland, Q. Liu, G. Bu, J.M. Basak, D.M. Holtzman, S. Ohtsuki, T. Terasaki, T. Iwatsubo: The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid β peptides in an *in vitro* model of the blood-brain barrier cells. **J. Biol. Chem.** Epub ahead of print.

Reviews

1. S. Ohtsuki: New aspects of the blood brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. **Biol. Pharm. Bull.**, 27:1489-1496 (2004)
2. T. Terasaki, S. Ohtsuki: Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. **NeuroRx**, 2:63-72 (2005)
3. S. Ohtsuki, T. Terasaki: Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for

CNS drug discovery and development. **Pharm. Res.**, 24:1745-1758 (2007)

Book Chapter

1. S. Ohtsuki, S. Hori, T. Terasaki: Modulation of Blood-Brain Barrier Efflux Transporters and the Impact of Treatment on CNS Disorders - Blood-brain barrier clearance as an essential function for CNS detoxification -. IN **The Role of Efflux Transporters in a Functional Blood-Brain Barrier**, E.M. Taylor (Ed), Nova Science Publishers, pp55-83 (2005)
2. T. Terasaki, S. Ohtsuki: Physiological pharmacokinetics and membrane transport for drug delivery research. IN **Interface oral Health Science**, M. Watanabe, N. Takahashi, H. Takada (Ed.), Elsevier, pp266-273 (2005)
3. M. Tachikawa, K. Hosoya, S. Ohtsuki, T. Terasaki: A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, Creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. IN **Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease**, ed., by M. Wyss and G. S. Salomons, Springer, pp83-98 (2007)

日本語総説

1. **大槻純男**、堀里子、寺崎哲也：ダイナミック輸送システムとしての血液脳関門と中枢創薬研究への応用、月刊薬事、46:1243-1249 (2004)
2. **大槻純男**：中枢支援防御システムとしての血液脳関門輸送の生理機能、薬学雑誌、24:791-802 (2004)
3. 渡辺雅彦、立川正憲、寺崎哲也：クレアチンを介した脳内エネルギー代謝の調節機構とニューロン・グリア相関、Clinical Neuroscience, 23: 158-160 (2005)
4. 立川正憲、寺崎哲也：脳内エネルギー代謝における血液脳関門トランスポーターの生理的役割、化学と生物、43: 166-171 (2005).
5. 大槻純男：脳関門輸送の分子機構と脳への DDS、DDS 学会誌、21:102-110 (2006)
6. 大槻純男、寺崎哲也：血液脳脊髄液関門、Clinical Neuroscience、24:1213-1215 (2006)
7. 内田康雄、上家潤一、**大槻純男**、小田切優樹、寺崎哲也：尿毒症物質の血液脳関門と陣輸送、腎と透析、62:327-333 (2007)
8. 寺崎哲也、大槻純男、上家潤一：薬物の薬効、毒性標的への分布：血液脳関門の透過性の評価 「最新創薬学 2007 -薬物動態学特性の解析は創薬のキーワード-」 遺伝子医学 Mook, 8: 170-177 (2007)
9. 大槻純男：血液脳関門におけるモノアミン関連トランスポーターの役割、Clinical Neuroscience、26:1077-1080 (2008).
10. 内田康雄、大槻純男、寺崎哲也：脳関門の ABC トランスポーターの薬物療法における役割、128:1107-1110 (2008).
11. 大峰健、上家潤一、大槻純男、寺崎哲也：質量分析法を用いたタンパク質の複数同時絶対定量法と Pharmacoproteomics への新展開、薬事新報、2558:45-50 (2008)

(2)口頭発表

①学会

招待講演 国内 21 件, 海外 19 件

一般発表 国内 114 件, 海外 75 件

②その他 国内 2 件, 海外 0 件

(3)特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	6 件
海外出願	1 件 (7 ヶ国)
計	

(4)その他特記事項

4-1) コンピューター・ソフト開発

高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置(LC-MS/MS)を用いたタンパク質の高感度同時絶対定量法のペプチド設計とデータ解析に活用する下記の 2 本のソフトを開発した。このソフトによって、開発技術の実用化へ道を開いた。

1. 標的タンパク質アミノ酸配列抽出システム
2. MRM 定量システム

4-2) 受賞

大学院学生と若手スタッフの育成の成果が下記の賞として評価された。

<学生>

1. 立川正憲：第 9 回グリアクラブ賞「脳内クレアチン代謝とニューロン・グリア相関」、2004 年 2 月
2. 立川正憲：ファーマバイオフォーラム 2004 優秀発表賞、「脳内クレアチン代謝における血液脳関門・グリア・ニューロンの役割」、2004 年 12 月
3. 藤吉正哉：日本薬剤学会 20 年会、永井財団学生スカラシップ「血液脳脊髄液関門における cholesterol 排出輸送と LXR による制御」、2005 年 3 月
4. 田牧千裕：日本薬剤学会 21 年会、永井財団学生スカラシップ「Insulin による血液中 amyloid beta-peptide (1-40)の肝クリアランスの制御」、2006 年 3 月
5. 内田康雄：第 3 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、ポスター賞 LC-MS/MS-Cocktail 法による ABC transporter の大規模基質スクリーニング法の開発、2006 年 5 月
6. 矢内一成：第 21 会日本薬物動態学会年会、ベストポスター賞“Evaluation of conditionally immortalized mouse brain capillary endothelial cells as in vitro blood-brain barrier model based on absolute amount of transporter proteins”、2006 年 11 月
7. 大峰健：日本薬剤学会第 22 年会最優秀発表賞「Informatics アプローチを用いたヒトトランスポータータンパク質 27 分子の同時定量解析法の開発」、2007 年 5 月
8. 内田康雄：日本薬剤学会第 23 年会最優秀発表賞「定量的プロテオミクスを用いた in vitro 輸送系からの血液脳関門 P-glycoprotein 輸送機能の再構築」、2008 年 5 月

<スタッフ>

9. 大槻純男：平成 16 年度 日本薬学会奨励賞「脳関門輸送の分子生物薬剤学的研究」、2004 年 3 月
10. 堀里子：Best Poster Presentation Award (7th International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, Potsdam-Sanssouci, Germany, “Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s)”、2004 年 9 月
11. 大槻純男：東京テクノフォーラム ゴールドメダル賞「中枢支援・防御システムとしての新たな血液脳関門輸送機構の解明」、2007 年 4 月
12. 大槻純男：第 2 回トランスポーター研究会ベストポスター賞「LC-MS/MS を用いた高感度多分子同時定量によるトランスポーターの定量的タンパク質発現プロファイルの構築技術」、2007 年 6 月
13. 大槻純男：国際薬物動態学会(ISSX) New Investigator Award 2008 Asian Pacific Region、2008 年 5 月
14. 大槻純男：インテリジェントコスモス奨励賞「脳関門輸送機構を利用した神経変性疾患に対する新たな治療戦略の構築」、2008 年 5 月

<研究代表者>

15. 寺崎哲也：American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Fellow, 2004 年 11 月
16. 寺崎哲也：Poster Award “Effect of GLUT1 deficiency on the developmental expression of GLUT1, MCT1, and MCT2 mRNA in mouse brain.” 8th Cerebral Vascular Biology, Munster, Germany, 2005 年 6 月

17. 寺崎哲也：平成 19 年度日本薬学会学会賞「血液脳関門機能と薬物の体内分布」、2007 年 5 月
18. 寺崎哲也：平成 19 年度日本薬物動態学会学会賞「脳関門輸送研究の新技术開発と脳支援防御機構解明」、2007 年 10 月
19. 寺崎哲也：東北大学ディテイングイッシュト・プロフェッサー（初代）の称号授与、2008 年 4 月

4-3) 報道

1. 寺崎哲也：脳を守る～脳の防衛網を解き明かす、テレビ放映（スカイパーフェクTV 765CH（サイエンスチャンネル）、サイエンスフロンティア21）、科学技術振興機構（作成：日本テレビ）
2. 大槻純男：ゴールドメダル受賞、読売新聞 2007 年 4 月 12 日掲載
3. 大槻純男：「脳の「掃除役機能」解明」、読売新聞 2007 年 4 月 30 日掲載
4. 大槻純男：「脳内のごみ排除、治療へ」、読売新聞 2007 年 10 月 19 日掲載

9. 結び

アミロイド蛋白質の血液脳脊髄液関門における脳から血液方向への輸送、及び血液から肝細胞内への取り込み輸送に LRP-1 が主な役割を果たしていることを明らかにすることができた。しかし、血液脳関門におけるアミロイド蛋白質の輸送については、他の研究者が報告している LRP-1、P-糖蛋白質、ABCA1 などはほとんど関与しないことを明らかにしたものの、最終的に輸送を担う分子の同定にまで至ることができなかった。A β の血液脳関門輸送を特異的に阻害し、かつそれ自身が血液脳関門を介して脳から血液方向へ排出輸送される A β と全くことなる蛋白質を複数見出すことができたことから、これらを用いて現在、解析を継続中の輸送系候補を絞り込む予定である。

当初の目標に設定していなかったが、新技术開発の一つとして LC-MS/MS を用いて A β 蛋白質を直接定量する方法の開発に成功したことは大きな意義があると考えられる。脳内だけでなく血液や脳脊髄液中の A β 蛋白質の未変化体と代謝物の同時絶対定量への道を開くことができたことは、脳内 A β 蓄積の診断方法の開発へと発展することが期待できる。

A β の脳関門排出輸送を活性化する化合物の探索は、リスクを伴うチャレンジングな課題であったが、候補物質を見出すことができたことは、創薬への糸口となるだけでなく、A β の輸送機構の解明においても重要な意義がある。引き続き輸送の活性化機構の解明に取り組む予定である。

脳の 0.1%しか存在しない脳毛細血管内皮細胞の輸送機能を解明することは困難を極めた。血管内皮細胞への siRNA を含めた遺伝子導入効率が非常に低いなど、新しい技術開発の必要性を強く感じた。質量分析法を用いた細胞膜の蛋白質レベルの解析は、当初の計画に盛り込んでいなかった。しかし、抗体を用いた輸送担体の発現解析の限界をこれまで強く感じており、また、mRNA レベルの解析結果は機能の大小を必ずしも反映しているとは言えないなど、技術的な限界と問題を感じていた。平成 17 年度から、質量分析の専門家である上家潤一博士を助手として採用し、本プロジェクトのメンバーに参加したことで、質量分析装置の性能を最大限に引き出した形で研究の大きな進展が見られた。特に、疎水性のため、サンプル前処理が困難で、質量分析法での解析が不可能とされてきた膜蛋白質の高感度定量法を開発できたことは、非常に意義が深い。抗体に頼ってきた蛋白質レベルの研究の限界を大きく打ち破ることができるようになった。アミノ酸配列情報のみからあらゆる蛋白質の定量法が開発できるようになったことは、画期的成果であったと自己評価する。例えば、脈絡叢上皮細胞に発現する LRP についてそのサブタイプ解析だけでなく絶対発現量まで測定できたことは抗体を用いた研究を超える新しい研究領域を開拓できると考えている。この LC-MS/MS を用いた蛋白質の高感度同時絶対定量法は、「動物種差、加齢、性差、病態間での複数の研究対象蛋白質の発現量の変動を絶対値で比較することを可能にした」という点で大きな意義があると考えられる。創薬研究において種々の問題を解決するとともに、バイオマーカーの高感度診断法の開発への応用、実験動物や細胞などの品質管理への応用、発酵生産の効率化など蛋白質が関与する生命科学のあらゆる研究において応用さ

れると考える。

研究費の中で最も多くを占めたものは、LC-MS/MS である。4000QTRAP と API5000 が導入できたことによって、抗体を用いることなく細胞膜蛋白質を 37 種類同時に 1fmol/assay で絶対定量できるようになった。さらに、UPLC の導入によって Aβ の直接定量法の開発も実現した。当初の目標に設定していなかった成果として、in silico で蛋白質定量用のペプチドを自動的に設計するソフト「標的タンパク質アミノ酸配列抽出システム」の開発が挙げられる。これは、平成 18 年度実用化検討課題として認められた予算で開発した。このソフトの開発によって、100 種類の蛋白質の定量ペプチド設計を 5 分以内で完了することができるようになった。さらに、LC-MS/MS を用いた蛋白質の絶対定量法では、数千～数万個のデータを解析する必要があるが、実用化のためには自動解析ソフトの開発が重要であった。研究費の一部は、このソフト開発にも用いた。解析に 2 週間を要したデータをこの自動解析ソフト「MRM 定量システム」を用いると 20 分程度で完了することから、今後、この技術を普及させる上で、2つのソフトは非常に有用であると考えられる。

難しい研究テーマに挑戦しながら、若手研究者を育成することは容易ではなかった。しかし、特記事項の受賞リストに示したように、大学院生が多くの優秀発表賞を受賞した（リスト 1, 3, 9, 10, 13, 17）。また、准教授の大槻純男は国際薬物動態学会からの New Investigator Award を含め 5 つの賞を受賞した。若手育成の観点からは成功を納めたと考える。寺崎は、これらの研究成果が国際的に高く評価されるとともに、設立理事の一人として、現在、国際血液脳関門学会 (IBBS, International Brain Barrier Society) の運営に関わっており、2009 年 6 月 28 日～7 月 2 日、欧米以外で初めての Cerebral Vascular Biology, International Conference (IBBS 主催) を実行委員長として仙台で開催する。本研究成果をさらに発展させ、世界拠点の一つとして血液脳関門研究をリードしていきたいと考えている。なお、2008 年 4 月、CREST から始まって SORST へと発展したこれらの研究業績が認められ、寺崎は東北大学から初代のディスティングイッシュトプロフェッサーの称号が授与された（800 余名の教授の中で 25 名に授与、薬学領域で一名）。

最後に、研究領域総括の深いご理解と温かいご支援、技術参事と事務参事と戦略的創造事業本部の皆様の献身的なご支援に心から感謝申し上げます。





研究期間中（平成 15 年 12 月～平成 21 年 3 月）に、東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野に在籍した教室員