

「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。そこで申請代表者は、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。

血液脳関門の機能解析研究において、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、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の輸送機能特性を解析し、*in vivo* の特性を十分に保持していることを報告した。さらに、脳毛細血管内皮細胞、星状膠細胞、周皮細胞の共培養条件を確立した。

*In vivo* 系で脳排出過程を解析する方法として開発した Brain Efflux Index (BEI) 法を用いて、神経伝達物質である GABA が脳から担体輸送系で排出されることを報告した。さらに、この排出輸送の少なくとも一部は血液脳関門に発現している GAT2/BGT-1 によることを報告した。さらに、抗てんかん薬であるバルプロ酸が血液脳関門を介して脳から循環血液方向へ排出されていることを報告した。一方、system Xc<sup>-</sup> は細胞内シスチンを取り込んで L-グルタミン酸を排出する輸送系であり、細胞内に SH 基を供給する重要な役割を果たしている。この輸送担体の実体である xCT は正常時の脳毛細血管内皮細胞にほとんど発現していないが酸化ストレス下で誘導されることを報告した。

今後は、新規輸送系を含め、これら脳毛細血管内皮細胞膜の局在性を免疫組織学的手法で解析を進めると同時に、特に、ABC transporter superfamily の各輸送担体の血液脳関門における発現と機能を中心に解析を進める予定である。

## 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、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) In vitro 血液脳関門モデル構築のための星状膠細胞、周皮細胞の条件的不死化細胞株の機能評価、2) 神経伝達物質及び薬物の脳関門排出輸送系の解析とその分子機構の解明、3) 血液脳関門輸送担体遺伝子の発現誘導の解析について実施した。

### 【方法】

温度感受性 SV40 large T 抗原遺伝子導入ラットから、星状膠細胞、脳周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、その特性を解析した。

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、これまでの研究で樹立した条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB) を用い、標識化合物を用いて基質の輸送速度の測定、輸送の駆動力の解析、各種阻害剤共存下における輸送速度の影響の解析を行い、血液脳関門輸送特性を明らかにした。

輸送担体に対する抗体を用いて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。

酸化的ストレスのモデルとして、外頸動脈から内頸動脈方向へ diethyl maleate を定速注入した。System Xc<sup>-</sup> の機能評価は、<sup>14</sup>C-cystine を静脈投与し Integration plot 法を用いて解析した。

### 【結果・考察・結論】

血液脳関門の in vitro 輸送実験系を確立するには、脳毛細血管内皮細胞の条件的不死化細胞株のみでは限界がある。共立薬科大グループは、in vivo 特性を比較的保持したラット脳周皮細胞 (TR-PCT) の条件的不死化細胞株を樹立した。さらに、東北大グループによって樹立したラット星状膠細胞 (TR-AST) の条件的不死化細胞株の特性は脳星状膠細胞の特性を比較的保持していることが明らかになった。TR-AST, TR-PCT を用い、既に樹立したラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB) との共培養実験を行い、非接触系と接触系の各々について共培養の最適条件を確立した。平成 14 年度は、共培養系を用いて血液脳関門機能発現調節機構をタンパク・遺伝子レベルで解析し、in vitro 血液脳関門モデルを確立する予定である。

抑制性神経伝達物質の GABA は、ラット大脳に投与後、脳から循環血液中へ排出された。GAT1 の阻害作用を持つ nipecotic acid を同時投与したとき、GABA の脳からの排出速度は nipecotic acid の濃度依存的に促進された。TM-BBB を用いて、GAT1, GAT2, GAT3, GAT4 の mRNA 発現解析を行なったところ、GAT2 のみが発現していた。さらに、western blot 法を用いて脳

毛細血管画分に GAT2 タンパクが発現していることを明らかにした。マウス脳スライスを用いて免疫染色を行なったところ、脳毛細血管に GAT2 が発現していることが示された。これらの結果から、血液脳関門には GABA を排出する輸送系が働いており、少なくとも一部は GAT2 がその役割を担っていることが明らかになった。

System Xc<sup>-</sup> は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を細胞内から外へ排出し、同時に cystine を細胞内へ取り込む働きがある。既に、血液脳関門にグルタミン酸とアスパラギン酸を排出する輸送系が機能していることを報告したが、その実体は不明である。そこで、system Xc<sup>-</sup> が血液脳関門で機能しているか否かを検討したところ、正常な脳関門は cystine を殆ど脳内へ取り込まないことが示された。しかし、Diethyl maleate 処理後、血液脳関門は cystine を取り込む輸送系が誘導された。In vitro マウス脳毛細血管内皮細胞培養系を用いて diethyl maleate 処理を行なったところ、cystine 輸送活性が時間依存的に誘導された。定量的 PCR 法を用いて、xCT の mRNA 量を測定したところ、輸送活性に対応した時間依存的誘導が示された。以上の結果から、system Xc<sup>-</sup> (xCT) は、正常時にはほとんど血液脳関門で働いていないが、酸化ストレス条件下では誘導され、循環血液中に高濃度で存在する cystine を脳内へ運ぶことが示唆された。正常時に機能している酸性アミノ酸の血液脳関門排出輸送の実体について別途検討し、その分子機構を予備的に明らかにしている。平成14年度は、その詳細な検討を行なう予定である。

### 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

#### 金沢大学グループ

- ① 研究分担グループ長名  
玉井 郁己(金沢大学薬学部、助教授)
- 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. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

Original articles

(東北大学グループ)

- Tetsuka K., Hosoya K., Ohtsuki S., Takanaga H., Yanai N., Ueda M., Obinata M., Terasaki T.: Acidic amino acid transport characteristics in newly developed conditionally immortalized rat type 2 astrocyte cell line (TR-AST). *Cell Struc. Func.*, 26: 197-203 (2001).
- Takanaga H., Ohtsuki S., Hosoya K., Terasaki T.: GAT2/BGT-1 as a system responsible for the transport of  $\gamma$ -aminobutyric acid at the mouse blood-brain barrier, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21:1232-1239 (2001).
- Kakee A., Takanaga H., Terasaki T., Naito M., Tsuruo T., Sugiyama Y.: Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 79:110-118 (2001).
- Kakee A., Takanaga H., Hosoya K., Sugiyama Y., Terasaki T.: In vivo evidence for brain-to-blood efflux transport of valproic acid across the blood-brain barrier, *Microvasc. Res.*, 63: 233-238 (2002).
- Hosoya K., Saeki S., Terasaki T.: Activation of carrier-mediated transport of L-cystine at the blood-brain and blood-retinal barriers in vivo. *Microvasc. Res.*, 62:136-142 (2001).
- Hosoya K., Kondo T., Tomi M., Takanaga H., Ohtsuki S., Terasaki T.: MCT1-mediated transport of L-lactic acid at the inner blood-retinal barrier: A possible route for delivery of monocarboxylic acid drugs to the retina. *Pharm. Res.*, 18:1669-1676 (2001).
- Tomi M., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S., Terasaki T.: Induction of the xCT gene expression and L-cystine transport activity by diethyl maleate at the inner blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43: 774-779 (2002).

(共立薬科大学グループ)

- Asashima T., Iizasa H., Terasaki T., Hosoya K., Tetsuka K., Ueda M., Obinata M., and Nakashima E.: Newly developed rat brain pericyte cell line "TR-PCT1" responds to transforming growth factor-1 and -glycerophosphate. *Eur. J. Cell Biol.* 81: 145-152 (2002)

(金沢大学グループ)

- Tamai, I., Nozawa, T., Koshida, M., Nezu, J., Sai, Y., Tsuji, A.: Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide OATP-B in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm. Res.*, 18: 1262-1269 (2001).
- Kido, Y., Tamai, I., Ohnari, A., Sai, Y., Kagami, T., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N.,

Asano, M., Tsuji, A.: Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 79: 959-969 (2001).

- Kido, Y., Tamai, I., Nakanishi, T., Kagami, T., Hirosawa, I., Sai, Y., Tsuji, A.: Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab. Pharmacoki.*, 17: 34-41 (2002)

#### Reviews

(東北大学グループ)

- 大槻純男、高長ひとみ、細谷健一、寺崎哲也：概説-血液脳関門研究の最近の進歩、生体の科学、52: 532-540 (2001).
- 細谷健一、高長ひとみ、大槻純男、寺崎哲也：血液脳関門輸送系の分子機構と生理的役割、生体の科学、52: 552-562 (2001).
- 出口芳春、森本一洋、寺崎哲也：脳微小透析法の血液脳関門輸送研究への応用、生体の科学、52: 563-570 (2001).
- 出口芳春、奥津広士、内藤隆文、黄倉崇、山田静雄、弓削卓郎、古川明彦、大槻純男、細谷健一、寺崎哲也、森本一洋、木村良平：Basic Fibroblast Growth Factor の血液脳関門透過機構、薬物動態、16: 140-144 (2001)

(2) 特許出願

国内 1 件、海外 0 件