

論文の内容の要旨

論文題目 血液脳関門における排出輸送担体 ABCG2 および
密着結合分子 occludin の発現・機能制御に関する研究

氏名 堀 里子

血液脳関門(blood-brain barrier, BBB) の実体である脳毛細血管内皮細胞(brain capillary endothelial cell, BCEC) は互いに密着結合(tight junction, TJ)で連結し、選択的な物質輸送を行うことで、中枢防御システムとして働いている。近年、BBB における排出輸送は血中から脳への異物の進入を制限するだけでなく、脳内代謝物の除去機構として機能することが明らかにされてきた。しかし、脳内の内因性化合物の排出輸送、特に血液側膜の排出輸送過程は ABCB1 をはじめとする既知の輸送担体だけでは説明できなかった。BBB における排出輸送担体の解明は、BBB の生理的役割を理解するだけでなく、中枢移行性の良好な薬物開発を考える上で重要な課題である。そこで、本研究は BBB における新たな排出輸送担体の同定を第一の目的とした。もうひとつの BBB 研究における課題として、BBB 機能分子の制御機構の解明が挙げられる。関門機能制御機構の解明は BBB の生理機能、および中枢疾患と BBB 機能障害との関連を理解する上で不可欠である。中でも、BCEC 周囲を覆う星状膠細胞や周皮細胞は BBB 機能制御の一端を担う重要な働きをもつと考えられている。そこで本研究は、

BBB における排出輸送担体及び TJ 構成分子の発現・機能制御機構を星状膠細胞および周皮細胞とのパラクライン相互作用に注目して解明することを第二の目的とした。

BBB に局在する ABC トランスポーターの探索から、排出輸送担体 ABCG2 の部分配列が、ラット脳と比較して、脳毛細血管分画(bCAP)に濃縮的に増幅されることを見いだした。そこで、ラット bCAP から ABCG2 のラットホモログ(rABCG2) cDNA を単離し、塩基配列を決定した(Genbank accession No. AB105817)。rABCG2 の塩基配列はヒト及びマウス ABCG2 とそれぞれ 81%、93%の相同性を示し、二量体で機能する ABC ハーフトランスポーターであることが予測された。まず、抗 ABCG2 抗体を樹立し、BBB における rABCG2 タンパクの発現と膜局在を解析した。Western blot 解析から、ラット bCAP および TR-BBB13 細胞において、糖鎖修飾された rABCG2 タンパクが S-S 結合を介した複合体として発現していることを示した。さらにラット脳切片に対する免疫組織学的解析から、rABCG2 は脳毛細血管の血液側膜選択的に局在していることを明らかにした。次に bCAP から単離した rABCG2 cDNA 遺伝子導入細胞株 (HEK293/rABCG2myc)および TR-BBB13 細胞を用いて輸送機能解析を行った。いずれの細胞も rABCG2 を介して薬物 mitoxantrone 及び BODIPY-prazosin を細胞外に排出した。rABCG2 単独に過剰発現させた rABCG2 タンパクは bCAP および TR-BBB13 細胞と同様の修飾タンパクとして細胞膜上に発現し、同じ基質を輸送した。以上から、ラット BBB において、rABCG2 はホモ二量体として血液側膜に局在し、薬物を循環血中に排出輸送していることが示唆された。

BBB には rABCG2 と基質スペクトルが類似している ABCB1 や ABCC1 が発現している。従って、rABCG2 の血液脳関門排出輸送における寄与を明らかにするためには、rABCG2 を特異的にノックダウンする手法が有効であると考えられる。従来の阻害剤を用いた輸送解析では、阻害剤の特異性が問題となってきた。そこで、RNAi 法を利用して、rABCG2 を標的とした siRNA を TR-BBB 細胞にトランスフェクションしたところ、rABCG2 の発現が抑制された一方で、類似した基質スペクトルをもつ ABCB1 や ABCC1、同じサブファミリーに属する ABCG1 の発現量は変化しなかった。従って、本 siRNA によって BCEC における rABCG2 発現が特異的に抑制されることが示された。BBB には基質スペクトルが類似した輸送担体が発現し、特異的阻害剤の選択が難しいことから、本手法が rABCG2 の機能解析に応用できる可能性がある。

次に、BBB の脳側細胞膜を取り囲む星状膠細胞や周皮細胞による rABCG2 制御機

構を検討した。私たちは、これまで温度感受性 SV40 largeT 抗原遺伝子導入ラットを用い、*in vivo* の性質を良好に保持した条件的不死化ラット BCEC(TR-BBB13)、星状膠細胞(TR-AST4)および脳周皮細胞株(TR-PCT1)を樹立してきた。本研究では、これら同じ遺伝背景をもつ3種の条件的不死化細胞株を用いて、従来の種差や由来組織の問題を解決した BBB 構築細胞間のパラクライン相互作用が解析可能な系を確立した。TR-AST4 細胞および TR-PCT1 細胞から調整した培養上清（それぞれ AST-CM、PCT-CM）を用いて両細胞分泌因子が rABCG2 輸送活性に及ぼす影響を検討した。その結果、AST-CM によってのみ、rABCG2 mRNA および輸送活性が上昇することを示した。さらに、TR-BBB13 細胞における Akt キナーゼは、AST-CM または bFGF 処理によってリン酸化した。造血細胞において、Akt 活性化は ABCG2 の細胞膜局在量を増大させることが報告されている。よって、TR-AST4 細胞が産生する Akt 活性化因子を介した rABCG2 の細胞膜局在量上昇が rABCG2 輸送活性の上昇に少なくとも一部関与している可能性が考えられる。

TR-BBB13 細胞における rABCG2 mRNA は 100 nM 17 β -estradiol 処理によって誘導された。以上から、血液脳関門において、ABCG2 の発現は血中の内因性化合物によっても制御されることが示唆された。血中 17 β -estradiol 濃度は妊娠期には<150 nM に達することが報告されており、このような条件下では ABCG2 を介した排出輸送活性が上昇することが示唆された。

TJ 構成分子の星状膠細胞および周皮細胞による発現制御機構の解析を行ったところ、星状膠細胞選択的に発現誘導が認められた ABCG2 とは異なり、TJ 構成分子である occludin 発現誘導には両細胞が関与していることが明らかになった。TR-BBB13 細胞と TR-AST4 細胞のメンブレンを介した相互作用によって occludin mRNA およびタンパク量が上昇することが見いだされた。さらに、AST-CM および PCT-CM の効果を検討した結果、occludin mRNA 量は両培養上清処理によって濃度依存的に上昇した。PCT-CM による occludin 発現誘導は血管透過性抑制因子である抗 angiopoietin-1(ang-1) 中和抗体によって約 60%阻害されたが、AST-CM による誘導は抑制されなかった。実際、ang-1 は occludin 発現誘導効果を示し、その分泌は TR-PCT1 細胞特異的に認められた。さらに、TR-PCT1 細胞は活性化に必須な 4 量体以上のマルチマーとして ang-1 を分泌し、PCT-CM は TR-BBB13 細胞における Tie-2 リン酸化を誘導した。以上から、周皮細胞から BCEC に至る occludin 誘導シグナルとして ang-1/Tie-2 経路が働くことが

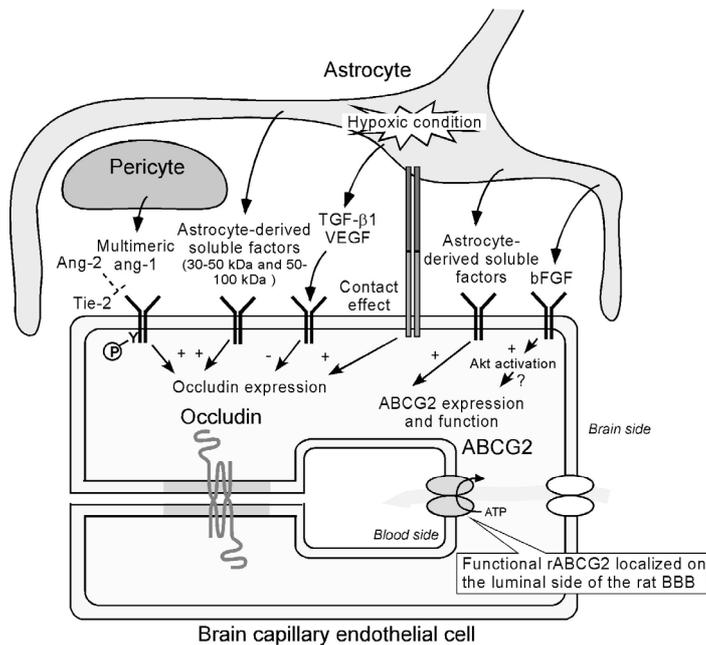


図1 星状膠細胞および周皮細胞によるBBBにおけるoccludinおよびABCG2発現・機能制御機構

さらに、TR-AST4 細胞における TGF-β1 発現は低酸素条件下で誘導された。以上から、脳虚血等の低酸素下では星状膠細胞由来 TGF-β1 の誘導を介した occludin 発現低下が TJ 破綻を導くひとつのメカニズムとして働くことを示唆した。両細胞由来液性因子は正常時だけでなく、病態時においても occludin 発現制御を介して TJ 形成能を制御していると考えられる。

本研究から、rABCG2 は薬物輸送活性をもつ配列およびタンパク複合体として、ラット脳毛細血管の血液側膜に局在していることを明らかにした。さらに、条件的不活化 BBB 細胞共培養系を用いて、周皮細胞由来 ang-1/Tie-2 経路を介した occludin 発現誘導、星状膠細胞分泌因子による Akt 活性化や rABCG2 機能上昇を明らかにした (図1)。以上から、TJ の破壊は VEGF や TGF-β1 の産生増大に加え、ang-1/Tie-2 経路の異常、例えば、周皮細胞からの ang-1 分泌減少や Tie-2 アンタゴニストである ang-2 によるシグナル阻害によっても引き起こされることが考察される。また、星状膠細胞分泌因子や Akt シグナルが薬物の脳透過性変動因子として働く可能性が示された。本モデルは細胞間相互作用に基づく BBB 機能制御因子の同定と BBB 生理機能の解明に役立つと考えられる。周囲の細胞も含めた BBB 制御機構の解明は BBB 異常が関与する病態や治療法を考える上で新規の標的分子を提示しうる重要な情報になると期待される。

見いだされた。一方、分子量で分画した AST-CM を用いて AST-CM 中の 30-50 kDa および 50-100 kDa の分画に含まれる液性因子が occludin 発現誘導に関与することが示唆された

一方、種々の神経変性疾患時に脳内で産生が上昇する TGF-β1 および VEGF はともに TR-BBB13 細胞における occludin mRNA 量をおける occludin mRNA 量が濃度依存的に減少させた。