

審査の結果の要旨

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も働く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。従って、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し、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。さらに、BBB 研究におけるもうひとつの課題として、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 の生理機能や中枢疾患と 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。

本研究では、BBB における新たな排出輸送担体の同定、ならびに星状膠細胞および周皮細胞による排出輸送担体及び TJ 構成分子の発現・機能制御機構を解析し、以下の成果を得た。

1. ラット BBB の血液側膜における ABCG2 の発現と薬物排出輸送機能

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、同定した(Genbank accession No. AB105817)。rABCG2 の塩基配列はヒト及びマウス ABCG2 と高い相同性を示し、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。樹立した抗 ABCG2 抗体を用いて、rABCG2 タンパクは糖鎖修飾され、S-S 結合を介した複合体としてラット BBB に発現していること、さらに、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 rABCG2 を単独に過剰発現させた細胞株および脳毛細血管内皮細胞株 TR-BBB13 を用いて、rABCG2 が両細

胞において、薬物 mitoxantrone および BODIPY-prazosin を排出することを見いだした。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。さらに、本研究では、RNAi 法を利用して、基質スペクトルが類似している ABCB1 や ABCC1、同じサブファミリーに属する ABCG1 に影響を及ぼさず、選択的に BCEC における rABCG2 の発現を抑制することに成功した。本手法は rABCG2 の BBB 排出輸送における寄与の解明への応用が期待される。

2. 星状膠細胞分泌因子による BBB における ABCG2 の発現・機能誘導

本研究では、*in vivo* の性質を良好に保持し、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解析系を確立した。星状膠細胞株(TR-AST4)および脳周皮細胞株(TR-PCT1)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、rABCG2 mRNA および輸送活性が上昇することを示した一方、PCT-CM は影響を及ぼさなかった。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 の輸送活性上昇に少なくとも一部関与していると考えられた。以上から、星状膠細胞分泌因子や Akt シグナルが ABCG2 機能誘導を介して薬物の BBB 透過性変動因子として働くことが示唆された。

3. 周皮細胞由来 angiopoietin-1 による occludin 発現誘導と TGF- β 1 および VEGF による occludin 発現抑制

TJ 構成分子の BBB 周囲の細胞による発現制御機構を解析した結果、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、occludin mRNA 量は AST-CM および PCT-CM 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 細胞は活性化型 ang-1 マルチマーを分泌し、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。

種々の神経変性疾患時に脳内で産生が上昇する TGF- β 1 および VEGF はともに TR-BBB13 細胞における occludin mRNA 量を濃度依存的に減少させた。TR-AST4 細胞における TGF- β 1 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- β 1 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が示唆された。TJ の破壊は VEGF や TGF- β 1 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。

以上、本研究は、薬物排出輸送を担う rABCG2 トランスポーターが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、共培養系を用いて、周皮細胞由来 ang-1/Tie-2 経路を介して TJ 分子である occludin の発現が誘導されること、ならびに星状膠細胞分泌因子によって rABCG2 の機能が誘導されることを明らかにした。これらの成果は、中枢疾患治療薬開発の障壁となる血液脳関門の機能制御に関する重要な知見であり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。