

令和元年6月1日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08364

研究課題名(和文) アラクノイドバリアー上皮細胞を実体とする血液脳脊髄液関門の輸送機構解明

研究課題名(英文) Transport systems at the arachnoid barrier cells-forming blood-cerebrospinal fluid barrier.

研究代表者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：00401810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳脊髄液(CSF)中の物質動態を制御するメカニズムを解明することは、中枢疾患の病態解明やCSF中薬物濃度が治療効果を左右する疾患治療において重要である。本研究は、密着結合を形成するアラクノイドバリアー細胞を実体とする、血液くも膜関門(Blood-Arachnoid Barrier)が、多様な輸送担体を発現し、CSF中の内因性物質や薬物の輸送制御機構としての役割を担うことを明らかにした。本研究から、血液くも膜関門が血液脳脊髄液関門の機能的実体として、血液-脳実質/脳脊髄液間の動的インターフェース機能を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、くも膜は脳や脊髄を物理的に保護し、中枢神経系と末梢組織を隔てる単なる支持被膜であるとされていた。本研究は、この概念を塗り替え、血液くも膜関門が有する、脳脊髄液中の動的な物質環境制御機構の一端を明らかにし、脳血管内皮細胞を実体とする血液脳関門、脈絡叢を実体とする血液脳脊髄液関門に並ぶ、第3の脳関門の概念を確立した。本研究成果は、脳内物質環境の破綻により引き起こされる中枢病態の分子機構の解明や中枢作用薬の開発戦略に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Clarifying regulatory mechanisms of CSF transport kinetics is important to understand central nervous system (CNS) diseases and to develop CNS drug therapeutics. The present study has revealed that the blood-arachnoid barrier, which is composed of arachnoid barrier cells with tight junctions, possesses various transport systems and plays a role as a regulatory system of endogenous substances and CNS drugs transports in the CSF. Here, we propose that the blood-arachnoid barrier functions as the outer blood-CSF barrier, a dynamic interface between the circulating blood and the brain/CSF.

研究分野：脳関門科学

キーワード：くも膜 血液くも膜関門 血液脳脊髄液関門 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳脊髄液動態における脳関門の役割

脳脊髄液(Cerebrospinal fluid, CSF)中の物質動態を制御する機構を解明することは、中枢病態の解明やCSF中薬物濃度が治療効果を左右する細菌性髄膜炎などの薬物治療において重要である。脳関門(Brain Barrier)は、循環血液と脳実質/脳脊髄液との物質交換を厳密に制御し、脳内の物質環境を維持している。その中で、血液-脳脊髄液関門(Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier, BCSFB)は、脈絡叢上皮細胞を機能的実体とし、血液脳関門(Blood-Brain Barrier)とは一部異なる輸送系を発現して、CSF中の内因性物質や薬物の動態を制御していることが通説となっている。しかし、脈絡叢上皮細胞のCSF側膜に局在するP-glycoprotein (P-gp/ABCB1)は、CSFへのback flux輸送が想定されているが、これに反してP-gp knockout mouseでは血液中に投与した基質薬物のCSF中濃度が上昇する(*J Pharmacol Exp Ther* 339:935-44, 2011)との結果と整合性がとれない。さらに、CSF内の薬物動態は、BBB輸送によって規定されるとする論文報告もあるが、CSF中濃度と脳実質内濃度の相関性解析が中心であり、例外となる薬物も多く見出されている(*Mol Pharm* 11:477-485, 2014)。以上の報告は、CSF中の内因性物質や薬物濃度が、BBBや脈絡叢上皮細胞を実体とするBCSFBとは異なる機構で制御されていることを強く示唆している。

(2) 外側血液脳脊髄液関門としての「血液くも膜関門」仮説

研究代表者は、脈絡叢上皮細胞を実体とするBCSFBにおける多様な輸送系の局在性と機能を解明してきた(*Drug Delivery to the Brain-Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*, Springer, New York, pp23-62, 2014)。一方で、脈絡叢上皮細胞のCSF膜側に局在する有機カチオン輸送担体の基質となるクレアチニンや、有機アニオン輸送担体の基質となるprostaglandin D₂やcephalothinのCSF消失クリアランスは、bulk flowを差し引いても、脈絡叢における取り込みクリアランスではわずかに6-20%程度しか説明できない(*J Neurochem* 12:750-760, 2012; *J Pharmacol Exp Ther* 343:608-16, 2012; *J Neurochem* 107:432-42, 2008)ことに、疑問を抱いてきた。

過去の文献を紐解いてみると、循環血液とCSFを隔てるもう一つのBCSFBの解剖学的実体として、くも膜で密着結合を有するアラクノイドバリアー上皮細胞(Arachnoid Barrier細胞, AB細胞)の存在が報告されていた(図1)。さらに、St. Jude Children's Research HospitalのErin G. Schuetz博士のグループが、免疫組織染色を用いてP-gpがAB細胞の血液側膜に局在していることを報告(*Drug Metab Dispos* 41:923 - 931, 2013)し、P-gp knockout miceでみられたCSF中の基質薬物濃度の上昇現象は、AB細胞のP-gpの排出機能欠失によって惹き起こされている可能性がある。しかし、これまでにAB細胞における内因性物質や薬物のCSF内動態に対する機能的役割を解明した報告は見られない。くも膜のAB細胞の表面積は、脈絡叢上皮細胞の3~8倍と推定される(*Brain Res* 18:197-218, 1970, *Drug Metab Dispos* 41:923-931, 2013)ことから、研究代表者は「物質のCSF濃度制御には、AB細胞が担うBCSFBが、脈絡叢上皮細胞が担うBCSFBに比べて大きな役割を果たしている」との仮説を立てた。そこで研究代表者は、脈絡叢上皮細胞を実体とするBCSFBを「内側(inner)BCSFB」として区別し、AB細胞を実体とするBCSFBを「外側(outer)BCSFB」と名付け(図1)、循環血液-CSF間の動的インターフェースとして機能するCSF動態制御機構としての位置付けを確立する本研究を着想した。

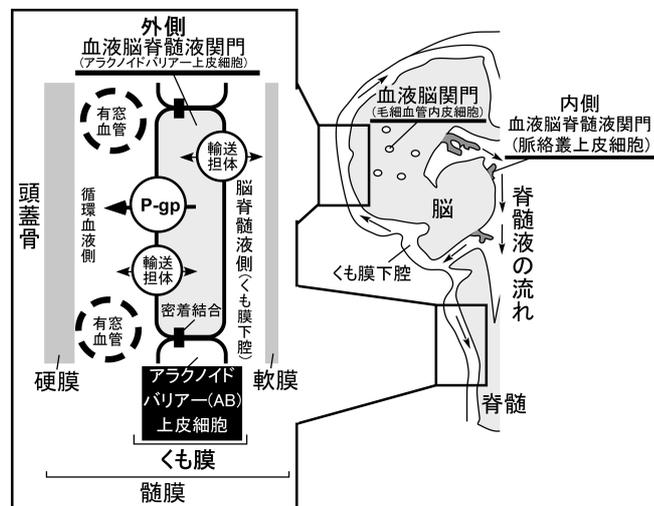


図1 アラクノイドバリアー(AB)細胞を実体とする外側血液-脳脊髄液関門(Outer Blood-Cerebrospinal fluid Barrier (BCSFB))の模式図

2. 研究の目的

本研究は、仮説「物質のCSF濃度制御には、AB細胞が担うouter BCSFBにおける輸送系が主要な役割を果たす」を実証し、これまでの通説「BCSFBの輸送機能は、脈絡叢上皮細胞が担う」を覆し、「BCSFBの輸送機能は、AB細胞が担う」に塗り替えることを目的とした。具体的には、(i)質量分析による標的タンパク質絶対定量法(Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP)を用いて、ラットくも膜組織における輸送体の発現アトラスを構築するとともに、(ii)(i)で検出された輸送体について、AB細胞における局在性を証明し、(iii)(i)で検出された輸送体の機能を明らかにし、CSF中物質動態に果たす役割を解明することを目標とした。最終的

には、内因性物質や薬物の CSF 内動態制御機構としての「outer BCSFB」の役割を確立することを旨とした。

3. 研究の方法

- (1) 質量分析による標的タンパク質絶対定量法(QTAP)を用いたラット軟髄膜における輸送体タンパク質の発現アトラスの作成
くも膜を含む軟髄膜をラットから単離し、細胞膜画分を調整した。高分解能質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて、輸送体(輸送担体・受容体・チャネル)のタンパク質発現量を LC-MS/MS Parallel reaction monitoring (PRM) mode で算出した。
- (2) 免疫組織化学的手法を用いた AB 上皮細胞における輸送体の局在性解析
AB 上皮細胞は、脈絡叢上皮細胞と同様に、血液側と CSF 側の細胞膜に異なる輸送担体を発現することで方向性を持った輸送を担っていると想定される。QTAP で検出された輸送体に対する特異抗体とラット軟髄膜凍結切片を用いて、蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、AB 上皮細胞における蛍光を検出し、局在性を解析した。
- (3) *In vivo* ラットにおける CSF 中からの物質消失機構の速度論的解析
CSF からの物質排出過程を解析するため、脈絡叢の寄与を最大限排除し、くも膜の寄与を直接的に評価可能なラット大槽内投与方法を用いて、輸送基質を CSF 内に投与した。経時的に、CSF を採取し、CSF 中の基質濃度を LC-MS/MS や ELISA で算出又は蛍光強度を測定することで、CSF 中からの消失クリアランスを算出した。既知の輸送体阻害剤による阻害スペクトルから、くも膜における輸送体の寄与を解析した。
- (4) 大槽内投与後の有機アニオン輸送体輸送基質のくも膜組織への分布可視化
大槽内投与後の CSF 消失がくも膜を介していることを示すために、有機アニオン輸送体(Oatp)の蛍光輸送基質 sulforhodamine 101(SR-101)をモデル基質として用い、大槽内投与後にくも膜組織の凍結切片を作成し、くも膜における蛍光分布を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した。

4. 研究成果

- (1) ラット軟髄膜における輸送体タンパク質の発現アトラス
ラットから単離した軟髄膜の細胞膜画分において、51 種類の輸送体のタンパク質発現量を標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)で算出した。主要な薬物排出トランスポーターである Mdr1a 及び Bcrp や、有機アニオン性薬物トランスポーター(Oatp, Oat)など、合計 22 種類の輸送体のタンパク質発現量が決定された(*Mol Pharm* 16:2021-2027, 2018)。以上の結果から、多様な内因性物質・薬物輸送体が発現していることが示された。
- (2) QTAP で見出された輸送体(有機アニオン輸送体;Oat1)の CSF 動態制御における役割の解明
BAB における輸送体を介した CSF 動態制御機構を実証するため、(1)の QTAP 解析においてラット軟髄膜細胞膜画分で、高発現量を示した Oat1 に着目した。大槽内投与方法を用いて、基質であるパラアミノ馬尿酸(PAH)の CSF 中からの消失に対する Oat1 の関与を *in vivo* で解析した。その結果、大槽内に投与した PAH は CSF 中から時間依存的に消失し、消失クリアランスは 26.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ と算出された。阻害剤を用いた解析から、PAH の CSF からの排出輸送に対する Oat1 の寄与は約 80%であった。以上の結果から、BAB には Oat1 を介した CSF からの薬物排出輸送機構が存在し、クモ膜下腔 CSF からの薬物の消失経路として機能していることが示唆された(*Mol Pharm* 16:2021-2027, 2018)。
- (3) くも膜における有機アニオン輸送体 Oatp1a4 の発現と CSF 動態制御における役割の解明

有機アニオン輸送体 Oatp1a4 の基質となる有機アニオン性蛍光プローブである sulforhodamine-101(SR-101)をラット大槽内に投与し、CSF 中からの排出過程を解析した。SR-101 の CSF 消失クリアランスは bulk flow マーカーとして大槽内に同時投与した FITC-inulin の 4 倍以上だった。その消失過程は、有機アニオン輸送担体 Oatp の基質である taurocholate 及び digoxin によって有意に阻害された。脊髄組織切片において、SR-101 の蛍光は脊髄クモ膜に限局したが、阻害剤存在下では脊髄実質内でも検出された。Oatp1a4 の抗体を用いてラットくも膜の免疫組織化学解析を行った結果、Oatp1a4 はタンパク質レベルで、血管内皮細胞だけでなく、AB 細胞に局在することが示された(図 2)。以上の結果から、BAB には有機アニオン輸送機構が存在し、CSF 中有機アニオン性薬物の消失動態に寄与することで、中枢実質内への物質移行を制限していることが示唆された(*Mol Pharm* 16:2021-2027, 2019)。

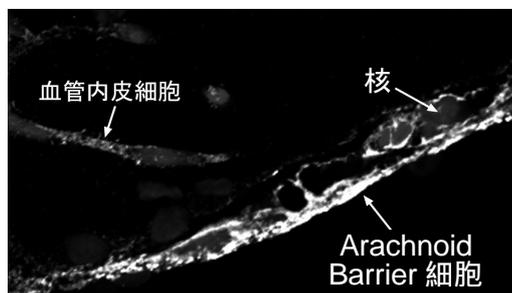


図 2 Oatp1a4 の AB 細胞での発現

以上の結果から、BAB には有機アニオン輸送機構が存在し、CSF 中有機アニオン性薬物の消失動態に寄与することで、中枢実質内への物質移行を制限していることが示唆された(*Mol Pharm* 16:2021-2027, 2019)。

(4)病原性タンパク質 α -synuclein (α -syn) の CSF 中からの消失特性

脳内老廃物は脳実質内から CSF へ恒常的に排泄されるとする Glymphatic system の概念が提唱されている。そこで、CSF 中へ移行した老廃物が脳外へ排泄される機構を明らかにすることは、老廃物の脳内蓄積を回避する方法を確立するうえで重要である。そこで本研究では、パーキンソン病において脳内に蓄積する α -syn の CSF 内動態に着目し、「 α -syn は CSF から BAB の輸送系を介して消失する」という仮説を検証した。 α -Syn と bulk flow マーカー FITC-inulin の混合液を、大槽内投与法でラットに投与した結果、投与後 20 min まで、FITC-inulin は CSF 中からの消失が見られなかった一方で、 α -syn は、大槽内投与後の CSF 消失クリアランスは 4.0 μ L/min であった。阻害剤として、LDL Receptor-Related Protein (LRP1) の基質となる活性型 2-macroglobulin 共存下での、CSF 中 α -syn 濃度を測定した結果、 α -syn の CSF 濃度が有意に上昇した。以上の結果から、 α -syn は輸送体が関与する排出機構で CSF から消失し、少なくとも一部に BAB の LRP1 が関与している可能性が示された。

以上の結果(1)~(4)から、くも膜は物理的な支持膜に過ぎないと考えられてきたが (Sci Am, 261; 68-74, 1989) 本研究によって、くも膜は多様な輸送体タンパク質を発現し、CSF 中物質動態を制御しているという、BAB 動的インターフェースとしての位置づけが明確になった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yaguchi Y, Tachikawa M, Zhang Z, Terasaki T (2019) Organic Anion Transporting Polypeptide 1a4 (Oatp1a4/Slco1a4) at the Blood-Arachnoid Barrier is the Major Pathway of Sulforhodamine-101 Clearance from Cerebrospinal Fluid of Rats. *Mol Pharm*, 査読有, 16:2021-2027.

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00005.

Zhang Z, Tachikawa M, Uchida Y, Terasaki T (2018) Drug clearance from cerebrospinal fluid mediated by organic anion transporters 1 (Slc22a6) and 3 (Slc22a8) at arachnoid membrane of rats. *Mol Pharm*, 査読有, 15:911-922.

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00852.

Tachikawa M, Toki H, Watanabe M, Tomi M, Hosoya K, Terasaki T (2018) Gene expression of A6-like subgroup of ATP-binding cassette transporters in mouse brain parenchyma and microvessels. *Anat Sci Int*, 査読有, 93:456-463.

DOI: 10.1007/s12565-018-0435-0.

[学会発表](計 10 件)

立川正憲、寺崎哲也、ヒト血液脳関門における脳転移性メラノーマ由来エクソソームの輸送機構と種差、日本薬学会第 139 年会, 2019

矢口優佳、立川正憲、内田康雄、寺崎哲也、血液くも膜関門を介した脳脊髄液中 α -synuclein 排出輸送機構の解明、第 40 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2018

立川正憲、網羅的定量プロテオミクスと薬動力学に基づくプラズマ生体作用の分子的解明、第 40 回日本光医学・光生物学会, 2018

立川正憲、定量プロテオミクスを基軸とする「脳関門中枢創薬科学」の新たな展開、第 24 回創剤フォーラム若手研究会, 2018

張正宇、立川正憲、内田康雄、寺崎哲也、標的定量質量分析法に基づくくも膜上皮細胞と脈絡叢上皮細胞の有機アニオントランスポータータンパク質の解析：脳脊髄液中薬物動態における役割評価、第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2017

矢口優佳、立川正憲、張正宇、内田康雄、寺崎哲也、有機アニオン性物質プロスタグランジン D₂ 及び sulforhodamine-101 の脳脊髄液クリアランス経路としてのラット血液くも膜関門 Oatp1a4 の機能的役割、第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2017

Tachikawa M, Yaguchi Y, Zhang Z, Uchida Y, Terasaki T, Oat1/3 and Oatp1a4 are acting as avid elimination pathway of organic anion in the CSF at the blood-arachnoid barrier (BAB), 12th INTERNATIONAL CONFERENCE on CEREBRAL VASCULAR BIOLOGY 2017 (国際学会), 2017

張正宇、立川正憲、内田康雄、矢口優佳、寺崎哲也、脳脊髄液中薬物動態における血液くも膜関門の役割：有機アニオン排出経路としての oat1, oat3 の輸送機能と発現の証明、日本薬学会第 137 年会, 2017

矢口優佳、立川正憲、張正宇、内田康雄、寺崎哲也、脳脊髄液中薬物動態における血液くも膜関門の役割：有機アニオン排出経路としての oatp1a4 の輸送機能と発現の証明、日本薬学会第 137 年会, 2017

立川正憲、アラクノイドバリアーにおける有機アニオン輸送体の発現と外側血液脳脊髄液関門としての機能的役割、日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。