

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07231

研究課題名(和文) iPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いたヒト血液脳関門の実体解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of human blood-brain barrier using iPS-derived brain microvascular endothelial cells

研究代表者

出口 芳春 (Deguchi, Yoshiharu)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40254255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの血液脳関門(BBB)の機能を解明することは、新規中枢医薬品の開発およびヒトの脳機能を明らかにする上で重要な課題である。この課題を解く一つの方法として、ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞(hiPS-BMECs)を使用することがある。本研究の目的はhiPS-BMECsを用いたin vitro BBBモデル実験装置を構築し、ヒトBBB輸送機能を明らかにすることであった。その結果、hiPS-BMECsに発現するトランスポーターおよび輸送性レセプターの発現を明らかにすることができた。また、BBBを介した血液-脳間の透過に関わる分子を検出できる実験系を構築することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおける中枢疾患の原因究明ならびに優れた治療薬を開発する上で、血液脳関門(BBB)の機能を解明することは意義深い。ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた今回の研究において、脳と血液間の非対称性輸送や脳からの排出輸送を検出できるin vitro BBB実験装置を構築するとともに、ヒト血液脳関門の機能を解明することができた。この研究成果は世界初であり、ヒト血液脳関門の実体解明のみならず、新規医薬品開発、中枢疾患の原因究明、ひいてはテーラーメイド医療への貢献など、その応用は無限に広がる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate function of the human blood-brain barrier (BBB) is an important issue in the development of new central acting drugs and in clarifying human brain function. One way to solve this problem is to use human iPS cell-derived brain capillary endothelial cells (hiPS-BMECs). The purpose of this study was to construct an in vitro experimental system using hiPS-BMECs and to elucidate their transport function between blood and brain. The results of this study revealed the expression of transporters and transportable receptors expressed in hiPS-BMECs. In addition, we succeeded in constructing an in vitro experimental system that could investigate the transport function across the BBB.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 ヒトiPS細胞 トランスポーター 輸送性レセプター 不死化脳毛細血管内皮細胞 脳移行性 高分子輸送 ドラッグデリバリーシステム

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、アルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢疾患に罹る患者が増加している。これら中枢疾患の病因究明と治療薬の開発は、医療費の削減と健康長寿社会を実現する上で喫緊の課題である。

薬物の脳移行性は BBB の物質輸送機能に支配される。BBB の解剖学的実体は細胞同士が密着結合した脳毛細血管内皮細胞である。BBB の研究は、これまでマウスやラット、ウシなどの動物を用いて進展してきたが、ヒトの BBB についてはほとんどわかっていない。

ヒトの BBB の機能を解明するにはヒトの脳毛細血管内皮細胞を用いることが必要不可欠である。現在のところ、フランスコシヤン研究所の Couraud 博士らが開発したヒト由来不死化脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) がヒト BBB のモデルとして汎用されている。申請者らも Couraud 博士と共に、hCMEC/D3 細胞を用いて様々な薬物の BBB 輸送機能を多角的に検討してきた。一方で、hCMEC/D3 細胞は細胞同士の密着結合性が弱いことから、血液-脳間の非対称性輸送、排出輸送、トランスサイトシス輸送を検出するには限界があった。最近、Lippmann らはヒト iPS 細胞から高い細胞間密着結合能を有する脳血管内皮細胞の作製に成功した (Nature Biotechnol., 30, 783 (2012))。この報告を契機に、世界中の研究者が独自の的方法論でヒト iPS 由来脳毛細血管内皮細胞 (hiPS-BMECs) の開発に取り組んでいる。申請者らも、我が国で初めて hiPS-BMECs を作製した川端健二教授 (医薬基盤研究所) との協力体制を組織し、2015 年から hiPS-BMECs の分化誘導法の改良と物質輸送機能解析に取り組んでいる。

hiPS-BMECs 関連の研究においては、上述したように iPS 細胞からの分化誘導法の開発が主流であり、肝心の物質輸送機能を網羅的かつ詳細に検討した報告はほとんどない。申請者は細胞間密着結合性の高い hiPS-BMECs を *in vitro* BBB モデルとして使い、トランスポーターとレセプターの機能を詳細に解析することで、ヒト BBB における輸送機能が解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト BBB のモデル細胞として hiPS-BMECs を使い、世界中の誰もが解決できなかったヒト BBB の輸送機能の解明を目的とした。そのために、以下の項目を検討した。

- (1) 内因性物質および薬物輸送に関連するトランスポーター群、輸送性レセプター群の遺伝子発現と機能性タンパク質の発現。
- (2) 血液-脳間の方向性輸送の検出。
- (3) hiPS-BMECs を用いた薬物の輸送機構の解明。
- (4) hiPS-BMECs におけるトランスサイトシス機構の存在。

3. 研究の方法

- (1) hiPS-BMECs に発現する ABC トランスポーター群、SLC トランスポーター群、および輸送性レセプターの発現を明らかにするため、定量的 PCR 法にて遺伝子発現量を定量する。
- (2) 方向性輸送の解析にとって、血液側膜と脳側膜のトランスポーター、輸送性のレセプターの局在解析は免疫染色法にて行い、検出は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。
- (3) Lippmann および我々の分化誘導法にて培養した hiPS-BMECs をトランスウェル上に播種し、方向性輸送の実験に用いた。単純拡散輸送、栄養物質 SLC トランスポーターおよび ABC トランスポーター介在輸送の典型的基質を用いて方向性輸送を薬物動態学的に検討した。
- (4) 薬物のモデルとして、6-メルカプトプリン (6MP) の BBB 輸送に関わる輸送分子を hiPS-BMECs を用いた機能解析から明らかにした。
- (5) トランスフェリンレセプター、レプチンレセプターなどの輸送性レセプターの輸送機能を本研究で構築した hiPS-BMECs 搭載 *in vitro* BBB モデルシステムにて検討した。
- (6) この細胞の最大の欠点であった P-糖タンパク質 (P-gp) の機能欠損を解決するために、研究協力者である川端博士と共に P-gp 発現 hiPS-BMECs の作製と機能解析を実施した。

4. 研究成果

- (1) hiPS-BMECs において、多くの ABC および SLC トランスポーター、輸送性トランスポーターの遺伝子発現を確認した。ABC トランスポーター群については、ABCC1 (MRP1)、ABCC5 (MRP5)、

ABCG2 (BCRP) が、対象として用いたヒト不死化細胞hCMEC/D3細胞における発現に比べ相対的に高値を示した。SLCトランスポーター群に関しては、SLC2A1 (GLUT1)、SLC2A3 (GLUT3)、SLC1A3 (GLAST)、SLC7A5/SLC3A2 (LAT1/4F2hc)、SLC16A1 (MCT1)に加え、SLC02A1 (OATP2A1)、SLC35F2、SLC44A2 (CTL2) の発現が高いことが特徴的であった。また、輸送性レセプターに関しては、LRP1の発現が高かった。

- (2) 遺伝子発現量の高かったBCRPに関して、免疫学的染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で局在を調べた結果、主に血液側細胞膜に発現することがわかった。今回の結果は、単離ヒト脳毛細血管内皮細胞での報告値に対応していることから、ヒトの脳に必要な栄養物質の供給、あるいは脳内の老廃物や毒物の除去に必要なトランスポーターがhiPS-BMECsに保持されていることが明らかになった。
- (3) 単純拡散機構で膜を透過するアンチピリンの血液側から脳側 (A-to-B) 方向の輸送速度は、その逆方向の脳側から血液側 (B-to-A) 方向と同等であった。一方で、カチオン性アミノ酸トランスポーターCAT1の基質アルギニン、SLC35F2の基質YM155の輸送速度は、脳への取り込み方向 (A-to-B方向) が優位であった。また、MCT1基質である乳酸の透過において、プロトン勾配依存的経細胞輸送が観察された。さらに、BCRP基質のプラゾシンとダントロレンにおいて、脳からの排出方向 (B-to-A方向) 優位な輸送が検出された。以上の方向性輸送はいずれも阻害剤存在下で阻害された。以上から、hiPS-BMECsを搭載した実験装置はトランスポーター介在性の方向性輸送を検出できる優れたヒトBBBモデルになる可能性が示唆された。
- (4) 本実験装置が薬物の輸送機構解明に適しているかを検証するために、6-メルカプトプリン (6-MP) をモデル薬物として検討を加えた。申請者は6-MPが脳から積極的に排出される薬物であることを動物実験で明らかにしている。6-MPのB-to-A方向の輸送速度はA-to-B方向に比べて約2倍以上大きいことが観察された。また、一連の阻害実験、分子生物学的実験から、細胞内への取り込み輸送に核酸トランスポーターの1つENBT1が、細胞内からの排出輸送にMRP5が関与することが明らかとなった。
- (5) 本研究で用いたhiPS-BMECsの最大の欠点であったP-糖タンパク質(P-gp)の機能欠損を解決するために、研究協力者である川端博士と共にP-gp発現hiPS-BMECsの作製と機能解析を実施した。その結果、P-gp発現hiPS-BMECs はMOCK細胞に比べてABCB1遺伝子が約500倍以上に上昇していること、かつ P-gp基質のキノジンをを用いた機能解析から細胞内からの排出輸送を再現よく検出できることがわかった。以上の結果に基づき、本細胞を名称【多能性幹細胞由来脳血管内皮細胞及びその製造方法】として特許を出願した (特願2021178573)。
- (6) 脳への高分子デリバリーの実現に向けて、トランスフェリンレセプター、レプチンレセプターなどの高分子たんぱく質をトランスサイトシスする輸送性レセプターの遺伝子発現と機能解析を試みたが、期待した成果は得られなかった。おそらく、これらのレセプターの発現量がin vivoに比べて少ないか、実験装置への吸着現象を抑えることができなかったことが原因であると考えられた。この問題については今後も継続的に研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toshiki Kurosawa, Yoshiharu Deguchi et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Characteristics of 6-Mercaptopurine in Brain Microvascular Endothelial Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 3484-3490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2021.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tatsuki Mochizuki, Yoshiharu Deguchi, et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 Functional Investigation of Solute Carrier Family 35, Member F2, in Three Cellular Models of the Primate Blood-Brain Barrier.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metab Dispos.	6. 最初と最後の頁 3-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.120.000115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashi Nakakura, Yoshiharu Deguchi, et al.	4. 巻 383
2. 論文標題 Fibronectin is essential for formation of fenestrae in endothelial cells of the fenestrated capillary.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 823-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03273-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuma Tega, Yoshiharu Deguchi, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Structural Requirements for Uptake of Diphenhydramine Analogs into hCMEC/D3 Cells Via the Proton-Coupled Organic Cation Antiporter.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 397-403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2020.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuma Tega, Toshiki Kurosawa, Kei Higuchi, Tomoko Yamaguchi, Takashi Nakakura, Tatsuki Mochizuki, Hiroyuki Kusuhara, Kenji Kawabata, Yoshiharu Deguchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Expression and functional characterization of SLC transporters in brain microvascular endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 A65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 住吉孝明, 平中誠弥, 出口芳春, 伊藤昭博, 吉田稔	4. 巻 30
2. 論文標題 血液脳関門透過性を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MEDCHEM NEWS	6. 最初と最後の頁 43-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.8b00099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、佐孝大樹、出堀泰之、富原裕美、天野信之、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞を用いた3次元実験モデルの構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会 (徳島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、手賀悠真、出堀泰之、久保義行、天野信之、出口芳春
2. 発表標題 3次元培養におけるヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞のLAT1の輸送機能
3. 学会等名 第36回 日本薬物動態学会年会 (高崎) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤俊樹、出口芳春
2. 発表標題 2次元および3次元培養ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルを用いたトランスポーター機能評価
3. 学会等名 第36回 日本薬物動態学会年会（高崎）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 出口芳春
2. 発表標題 Human BBB-on-a-chipによる化合物の中枢移行性評価
3. 学会等名 第27回HAB研究機構学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古西修希、出口芳春、et al.
2. 発表標題 P糖タンパク質欠損が血液脳関門恒常性に与える影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会（熊本）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤俊樹、出口芳春、et al.
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来血液脳関門モデルを用いた6-mercaptopurineの輸送機構解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会（熊本）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiki Kurosawa
2. 発表標題 Functional evaluation of SLC and ABC transporters in brain microvascular endothelial cells derived from human iPS cells.
3. 学会等名 第34日本薬物動態学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuki Mochizuki, Tadahaya Mizuno, Kei Higuchi, Yuma Tega, Toshiki Kurosawa, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Yoshiharu Deguchi, Hiroyuki Kusuhara
2. 発表標題 Functional investigation of SLC35F2 as a drug transporter in primate blood brain barrier model cells.
3. 学会等名 第34日本薬物動態学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤俊樹、手賀悠真、山口朋子、川端健二、望月達貴、井上勝央、楠原洋之、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞における6-mercaptopurineの輸送機構解析
3. 学会等名 第41回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Kurosawa, Yuma Tega, Tomoko Yamaguchi, Tatsuki Mochizuki, Yasuhiro Hayashi, Atsushi Yamashita, Hiroyuki Kusuhara, Kenji Kawabata, Yoshiharu Deguchi
2. 発表標題 Evaluation of Transporter Function in Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging The 28th Annual Meeting of the Bioimaging Society（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐孝大樹、黒澤俊樹、手賀悠真、高野真史、橘高敦史、出口芳春
2. 発表標題 ヒトiPS由来脳毛細血管内皮細胞におけるP糖タンパク質の発現誘導
3. 学会等名 第63回 薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 出口芳春, et al.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 285
3. 書名 コンパス生物薬剤学(改訂第3版)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 多能性幹細胞由来脳血管内皮細胞及びその製造方法	発明者 川端健二、山口朋子、出口芳春	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-178573	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

帝京大学薬学部 http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/ 帝京大学 薬学部 薬物動態学研究室 https://www.bbb-teikyo.com/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	黒澤 俊樹 (Kurosawa Toshiki) (90839466)	帝京大学・薬学部・助教 (32643)	
研究分担者	手賀 悠真 (Tega Yuma) (50809043)	帝京大学・薬学部・助教 (32643)	留学のため、2020年3月17日に分担者から削除

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川端 健二 (Kawabata Kenji)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所・プロジェクトリーダー	
研究協力者	大槻 純男 (Ohtsuki Sumio)	熊本大学・薬学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

{ 国際研究集会 } 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関