

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22599

研究課題名（和文）「血液くも膜関門排出輸送に基づく中枢解毒」仮説の実証研究

研究課題名（英文）Challenges to the hypothesis that the blood-arachnoid barrier efflux transport systems function as central nervous system detoxification system

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、仮説「血液くも膜関門が、神経毒性物質に対する脳脊髄液からのクリアランス輸送システムを備え、中枢解毒装置として機能する」を実証することを目指した。本研究を通して、パーキンソン病において脳内に蓄積する病原性タンパク質 -シヌクレインの脳脊髄液からの消失過程には、くも膜における受容体を介した排出機構が関与している可能性が提示された。血液くも膜関門における病原性タンパク質を内包する細胞内小胞、タンパク質、ペプチド及び低分子代謝物に対する多様な排出輸送系の同定に向けて、質量分析による網羅的分析系及び絶対定量系を構築した。

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するための単なる支持被膜であるとの考えが通説であった。これに対し本研究は、「中枢環境を規定し、中枢解毒装置として機能する、動的インターフェースとしての血液くも膜関門輸送系の役割」という新たな概念を構築し、血液くも膜関門の機能破綻と中枢神経病態との関連性解明に迫るものであり、中枢病態の解明や治療法の開発へ突破口を開く潜在性を有している点において、学術的意義だけでなく社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：This study aims to validate our hypothesis that the blood-arachnoid barrier possesses the dynamic clearance system for neurotoxic substances in the cerebrospinal fluid and functions as a central nervous system detoxification system. The present study has proposed that -synuclein, a pathogenic protein, which is known to be and accumulated in the brain of the Parkinson's disease, would undergo the LDL receptor-related protein-mediated efflux transport from the cerebrospinal fluid. The study has also established the comprehensive proteomics and the LC-MS/MS-based targeted absolute quantification system for extracellular vesicles, pathogenic proteins, peptides, and metabolites to clarify various efflux transport system at the blood-arachnoid barrier.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液くも膜関門 排出輸送

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳脊髄液中の物質動態制御機構としての「血液くも膜関門」の役割

脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid, CSF) 中の物質動態を制御する機構を明らかにすることは、脳内環境の維持機構や中枢病態機序の解明において重要である。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, BBB) とは一部異なる輸送系を発現して、循環血液と CSF との物質交換を厳密に行い、CSF 中の内因性物質や薬物の脳内動態を制御していることが知られている。研究代表者の立川らは、CSF 中物質動態の制御機構として、血液脳脊髄液関門における、神経毒性物質や老廃物の能動的な排出輸送を担うトランスポーター (輸送体) の分子の実体と局在性を解明してきた (Drug Delivery to the Brain-Physiological Concepts, Methodologies and Approaches, Springer, New York, pp23-62, 2014)。特に本研究立案に関連して、CSF 中からの β -amyloid(1-40) の排泄経路として、BCSFB の Lipoprotein Receptor related Protein-1 (LRP-1) 受容体が発見されることを見出した (*J Neurochem* 118:407-415, 2011)。一方で、脳室内に局在する脈絡叢の輸送機能だけでは、CSF 全体の β -amyloid(1-40) の物質動態を説明できないことが明らかとなった。これだけでなく、BCSFB における有機カチオントランスポーターを介したクレアチニンの CSF からの消失クリアランスや、有機アニオントランスポーターを介したプロスタグランジン D₂ や cephalothin の CSF 消失クリアランスは、CSF の 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 6%~20% を説明できるにすぎない (*J Neurochem* 12:750-760, 2012; *J Pharmacol Exp Ther* 343:608-16, 2012; *J Neurochem* 107:432-42, 2008)。

そこで循環血液と CSF を隔てるもう一つの脳関門として、密着結合を有するくも膜上皮細胞を機能的実体とする『血液くも膜関門 (Blood-Arachnoid Barrier, BAB)』に着目した。2018 年に研究代表者の立川らは、本研究の先駆けとして、独自開発した質量分析による輸送体タンパク質絶対定量 (qTAP) と速度論解析を駆使して、ラットくも膜におけるトランスポータータンパク質の発現を示すと同時に、低分子の CSF 中動態制御機構が、BAB における排出輸送で規定されることをラット *in vivo* で実証した (*Mol Pharm* 15:911-922, 2018; *Mol Pharm* 16:2021-2027, 2019)。以上の結果から、BAB が多様な輸送系を備え、CSF 中物質動態を制御しているという動的インターフェースとしての位置づけがなされた。

(2) 神経毒性物質の CSF 動態制御機構としてのくも膜の寄与仮説

日本は超高齢化社会に突入し、30 年後、2 人に 1 人は、中枢神経疾患に罹患すると推定されており、革新的コンセプトに基づく中枢疾患治療薬の開発が急務である。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、病原性タンパク質 β -amyloid や α -synuclein などの神経毒性物質が、長い年月をかけて徐々に脳内に過剰に蓄積することで、神経障害をもたらす。本研究で、「神経毒性物質の脳内蓄積には、くも膜の機能低下が関係するのではないか」との挑戦的課題を着想した。近年、米国 Rochester 大学 Iliff 博士らによって、脳実質内で産生された β -amyloid が、血管周囲腔を通過して、くも膜下腔内の CSF 中に高流速で排泄される経路 (Glymphatic System) の存在が報告された (*Neurobiol Dis* 93:215-25, 2016)。本報告は、神経毒性物質の脳実質内から CSF への排泄経路が、中枢解毒機構を担うことを示唆するが、「くも膜下腔内 CSF に流れ込んだ、神経毒性物質や老廃物が、CSF 外・脳外にどのように排泄されるのか」という中枢解毒の本質をなす問題は解決されていない。以上から、脈絡叢に比較し表面積が 3~8 倍大きいと推定されるくも膜が、 β -amyloid など脳蓄積性神経毒性物質を、脳外へ積極的に排出する機能を持ち、CSF 中物質動態を能動的に制御する機構として主要な役割を果たすのではないかとの説を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、仮説 (図 1) 「くも膜上皮細胞を機能的実体とする血液くも膜関門 (BAB) が、脳内/CSF からの神経毒性物質や老廃物の能動的な排出 (くみ出し) 輸送を担い、中枢解毒装置として機能する。」を実証し、BAB の機能低下と、神経変性疾患 (神経毒性物質/老廃物の脳内蓄積) との因果関係を解明することを目的とした。仮説の証明によって、従来「くも膜は、脳や脊髄を物理的に保護するための単なる支持被膜であり、脳関門としての役割は能動的なものではない」を根本から塗り替える。本研究は、高次脳機能発現のための中枢環境維持機構や、その破綻による中枢病態の新たな発症機構を提示し、従来型の神経変性疾患の予防治療戦略に変革をもたらす潜在性を有すると考えられる。

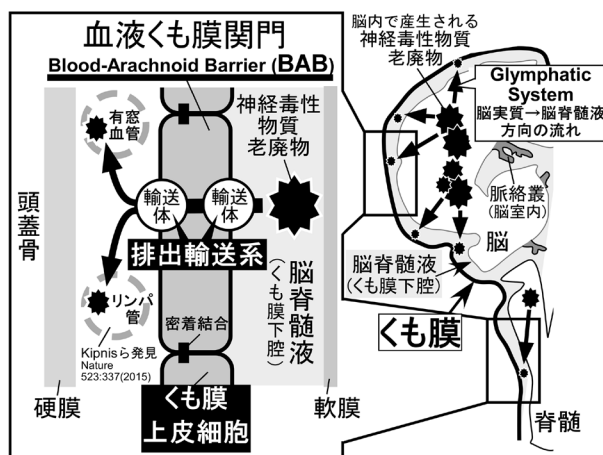


図1 血液くも膜関門排出輸送による中枢解毒仮説

3. 研究の方法

(1) α -シヌクレインのCSF 消失過程におけるくも膜組織への分布と輸送体の寄与解析

先行研究において、研究代表者の立川らは、パーキンソン病において脳内に蓄積する病原性タンパク質 α -シヌクレインのCSF 内動態に着目し、大槽内投与後のCSF からの消失過程において、少なくとも一部に輸送体 low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) を介した排出機構が関与することを見出している。 α -シヌクレインのCSF からの消失過程における血液くも膜関門の寄与を解析するため、 α -シヌクレインをラット大槽内投与後の軟髄膜組織の凍結切片を用いた免疫染色を行った。LRP サブタイプを絞り込むため、標的タンパク質絶対定量プロテオミクス (qTAP, *Fluids Barriers CNS* 10:21, 2013) を用いて、くも膜を含む軟髄膜組織における LRP サブタイプの絶対定量を行った。LRP サブタイプの欠損細胞を用いて、 α -シヌクレイン輸送への寄与を解析した。

(2) CSF 中に蓄積する神経毒性物質同定のための標的タンパク質定量系及び網羅的低分子代謝物定量系の構築

タンパク質の絶対定量系は、標的タンパク質絶対定量プロテオミクス (qTAP) に基づいて、定量標的ペプチドを選択した。絶対定量系の構築には、液体クロマトグラフィーを連結した質量分析計 (LC-MS/MS) の selected reaction monitoring 機能を用いた。低分子代謝物に対する定量系の構築には、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (capillary electrophoresis mass spectrometry, CE/MS) を用いた。機関倫理委員会の承認に基づき、中枢疾患症例から髄液検体を収集した。

(3) 細胞外小胞 (エクソソーム) の単離と網羅的プロテオミクス解析

脳実質細胞から分泌され病原性タンパク質を含むと想定される細胞外小胞の特性を明らかにするために、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞をモデルとして、細胞の培養上清を回収し、超遠心分離法を用いて沈殿物から細胞外小胞画分を回収した。細胞外小胞画分のトリプシン消化を行い、液体クロマトグラフィーを連結した高分解能質量分析計 (LC-MS/MS) を用いてタンパク質のラベルフリー定量系を確立した。

(4) 細胞外小胞 (エクソソーム) 及びペプチドの輸送評価系の構築

CSF 中における輸送動態を追跡するための蛍光標識細胞外小胞の作成には、細胞外小胞に局在する CD63 と緑色蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を発現する安定発現株を用いた。LC-MS/MS の selected reaction monitoring 機能を用いて、ペプチドモデル化合物 Destruxin E の絶対定量系の構築を行い、人工脂質膜の透過量及び細胞への取り込み量を定量化した。

4. 研究成果

(1) α -シヌクレイン大槽内投与後のくも膜組織への分布と輸送体の寄与

α -シヌクレイン大槽内投与後のくも膜組織において、 α -シヌクレインの蛍光シグナルが検出された。ラット軟髄膜における LRP1 タンパク質の絶対発現量は $0.80 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$ 、LRP2 は定量限界値 ($<0.89 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$) 以下であった。マウス LRP1 欠損細胞における α -シヌクレインの取り込みは、コントロールに比べて低下傾向にあった。以上の結果から、 α -シヌクレイン CSF からの消失過程には、血液くも膜関門の LRP1 を介した排出機構が関与している可能性が提示された。

(2) 質量分析による病原性タンパク質定量系及び低分子代謝物定量系の構築

脳内に蓄積することが報告されているタンパク質について、定量対象とする標的ペプチド配列を決定した。中枢障害に関与するウイルス由来タンパク質について、定量標的ペプチドを決定し、 $5\text{-}800 \text{ fmol}/\text{injection}$ の範囲において絶対定量可能な系を構築した。さらに、CE-MS を用いて、アミノ酸や糖リン酸、有機酸、ヌクレオチドなど、85 種類のイオン性低分子代謝物に対する網羅的な定量系を確立した。

(3) 細胞外小胞 (エクソソーム) の単離と網羅的プロテオミクスによるタンパク質同定

SH-SY5Y 細胞の培養上清から回収した細胞外小胞画分について、網羅的ラベルフリープロテオミクスの手法を用いて、約 3000 分子のタンパク質を同定し、細胞外小胞に発現する分子プロファイリングを行った。その結果、筋委縮性側索硬化症 (ALS) やハンチントン病症例の脳内で蓄積する病原性タンパク質 TAR DNA-binding protein 43 及び Huntingtin が細胞外小胞画分に発現することが示された。以上から、神経変性疾患病態において CSF 中に蓄積する病原性タンパク質や神経毒性物質の同定のための基盤を確立した。

(4) 細胞外小胞 (エクソソーム) 及びペプチドの輸送評価系の基盤構築

細胞外小胞の膜表面に局在する CD63 と GFP の融合タンパク質を発現する安定発現株を作成し、細胞外小胞の CSF 中における輸送動態を追跡する系を構築した。ペプチドに対するくも膜輸送評価系の構築を目指して、モデル化合物として環状ペプチド Destruxin E の天然型と鏡像異性体の絶対定量系 ($10\text{-}1000 \text{ fmol}/\text{injection}$) を確立した。脂質膜透過モデルとして人工脂質膜における透過性について評価した結果、立体異性体間で有意な差がないことが示された。HeLa 細胞を用いた輸送解析から、Destruxin E は立体異性体を区別されずに能動的な輸送経路を介して細胞膜を透過することが示唆された。以上から、細胞外小胞とペプチド性物質の輸送評価系の基盤が構築された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立川正憲、稲垣舞
2. 発表標題 末梢から中枢への情報伝達制御装置としての血液脳関門物流システムの役割と脳への薬物送達
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 網藤惇、今野源、吉田将人、土井隆行、稲垣舞、寺崎哲也、立川正憲
2. 発表標題 中分子環状デブシペプチドDestruxin Eの細胞膜輸送・細胞内代謝・分子標的V-ATPase阻害における立体特異性の解明
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 脳内クリアランスシステムとしての血液くも膜関門輸送系の役割
3. 学会等名 第43回日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 定量プロテオミクスで解き明かす血液脳関門・血液くも膜関門
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tachikawa M, Terasaki T
2. 発表標題 Blood-brain barrier-permeable proteins and transport characteristics in brain endothelial cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 中枢関門科学：Connecting the human dots
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回神経組織培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	齊藤 貴志 (SAITO Takashi) (90360552)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉良 潤一 (KIRA Jun-ichi) (40183305)	国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授 (32206)	

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