

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20731

研究課題名（和文）BBTB標的創薬に有用な生体模倣性新規in vitroヒトBBTBモデルの樹立

研究課題名（英文）Establishment of a novel microphysiological in vitro human BBTB model useful for BBTB-targeted drug development

研究代表者

森尾 花恵（Morio, Hanae）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70908524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトグリオーマ細胞株に加え、当研究室で樹立した汎用性・機能性に優れたヒト不死化脳毛細血管内皮細胞、ヒト不死化アストロサイト、およびヒト不死化脳ペリサイトを構成細胞とし、独自のin vitroヒト階層型血液脳腫瘍関門（BBTB）モデルを構築した。本モデルの構築には特殊な技術・装置を要さないとともに、細胞のハンドリングのしやすさといった汎用性の観点から、簡易なモデル構築が可能である。本モデルを用いた解析からは、これまでのBBTBの機能に関する知見をサポートする結果も得られており、本モデルは今後の更なる改良によりBBTB標的治療薬の脳移行性および薬効評価に有用なモデルとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、グリオーマに対する新薬の薬効評価にはin vivoモデルが汎用されてきた。また、BBTBについてもin vivoモデルが存在するが、それを用いた実験に必要な経費や時間、高度な技術に関して問題を解決できるin vitro BBTBモデルが現在求められている。これに対し、本研究では生体模倣性を高める独自の階層型スフェロイド構築技術、そして汎用性・機能性に優れた独自のヒト不死化細胞を用いたことより、既存の他のモデルの欠点・課題を解決できるモデルとなることが期待される。本モデルは更なる改良を重ねることで、新規グリオーマ治療薬および治療法の開発の効率化に貢献できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have constructed an in vitro multicellular spheroidal human BBTB model using human immortalized brain microvascular endothelial cells HBMEC, human immortalized astrocytes HASTR, human immortalized brain pericytes HBPC, which have established in our laboratory, and human glioma cell lines (AM-38, U-87 MG, U-251 MG, or CCF-STTG1). Construction of this model does not require any use of special techniques or equipment, and can be done simply from the standpoint of versatility, such as the high cell proliferative capacity and ease of handling of the human immortalized cells. Part of the results obtained from the analysis using the model supports the previous findings on the barrier capacity of the BBTB, and therefore it is expected that further improvement of the model construction method will make it a useful model for the evaluation of brain migration and efficacy of the drug in BBTB-targeted therapeutics.

研究分野：がん研究

キーワード：グリオーマ 血液脳腫瘍関門 in vitroモデル ヒト不死化脳細胞 階層型スフェロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

グリオーマは悪性度の高い難治性がんとして知られている。これに対する新たな創薬標的として、脳腫瘍血管バリア (blood-brain-tumor barrier, BBTB) がある。BBTB は、脳血液関門 (blood-brain barrier, BBB) とともに薬物脳内移行に対する障壁であり、かつ酸素や栄養の供給源であることから、近年、BBTB 突破を介した薬物のグリオーマ移行および BBTB 破壊によるがんへの兵糧攻めが新たな治療戦略として期待されている (Cancers 2020;12:242)。BBTB を標的とした創薬には、ヒト BBTB を高度に再現し、かつ候補薬の BBTB 突破・破壊能をスクリーニングするためのモデルが必要であるが、現在創薬の現場に実装されているモデルは存在しない。

### 2. 研究の目的

これまでもヒト BBTB モデルの開発が試みられてきたが、これらでは生体内構造の模倣が不十分である (Cancers 2021;13:955)。これに対し、「ヒト生体内における BBTB の高度な再現性、かつ創薬への実装性をいかにモデルに付与するか」が本領域の核心をなす課題である。そこで本課題解決に向け、本研究では BBTB 標的創薬に有用な汎用性・生体模倣性を兼ね備える新規 *in vitro* ヒト BBTB モデルの樹立を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 当研究室で樹立した汎用性・機能性に優れたヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 HBMEC (Mol Pharm 2019;16:4461-71)、ヒト不死化アストロサイト HASTR (J Neurochem 2016;136:92-105 および J Pharmacol Sci 2018;137:350-358)、ヒト不死化脳ペリサイト HBPC (Mol Neurobiol 2018;55:5993-6006) とし、そしてヒトグリオーマ細胞株 (AM-38, U-87 MG, U-251 MG, CCF-STTG1) を構成細胞とし、複数の培養条件 (細胞播種数・添加剤等) を用いて *in vitro* ヒト BBTB モデルを構築法を検討した。

(2) 脳毛細血管内皮細胞 (BMEC) が構築する脳毛細血管の機能解析として、BMEC マーカー遺伝子のタンパク質発現・局在解析 (免疫染色法) と低分子化合物を用いたバリア機能解析をおこなった。

(3) *In vitro* ヒト BBB モデル (Biol Pharm Bull 2021;44:984-991) との比較解析 (RNA-seq, 免疫染色法) により、BBTB 特異的に発現する遺伝子群の同定を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) グリオーマ細胞および HBMEC を用いた *in vitro* ヒト BBTB モデル構築の検討

初めに、HBMEC がグリオーマ細胞塊を覆うような *in vitro* ヒト BBTB モデルの構築を試みた。V 底プレートにて AM-38 あるいは U-87 MG のグリオーマ細胞塊を作成し、その後 HBMEC を播種することによるモデルの構築を試みた (グリオーマ細胞数 : HBMEC 細胞数 = 1 or 2 : 1)。HBMEC の継代培養に用いている培地にてモデルを構築した場合には、グリオーマ細胞と HBMEC が各々で細胞塊を構築してしまうことから、1つの細胞塊としてモデルを構築することは困難であることが明らかとなった。

続いて、上記培地に一定量のメチルセルロースを加えたものを用いることにより、異なる細胞種間で生じた分離の回避を試みた。上記で認められた各細胞種による細胞塊の生成は抑制できることが明らかとなった一方で、HBMEC がグリオーマ細胞塊の表面を全体的かつ均一に被覆できる確率は顕著に低いことが明らかとなった。

生体内において、BBB は脳に最も多く存在するグリア細胞であるアストロサイトや、BMEC を直接取り囲むペリサイトによってその構造や機能が保持されており、BBTB にとってもこれら細胞が重要な役割を果たしていることが容易に想定される。簡易的なモデルとしてグリオーマ細胞と HBMEC の2種を用いた *in vitro* ヒト BBTB モデルの構築を試みていたが、本研究期間中にその方法を確立することは困難であると判断した。

#### (2) 上記モデルに HASTR および HBPC を加えた *in vitro* ヒト BBTB モデル構築の検討

(1) にて認められた限界に対して、当研究室で樹立したヒト不死化アストロサイト HASTR およびヒト不死化ペリサイト HBPC を加えることによる *in vitro* ヒト BBTB モデルの構築法の検討をおこなった。

初めに、一定量のメチルセルロースを加えた培地を用いることで、HBMEC (750 cells) が HASTR (1750 cells) の細胞塊の表面全体を被覆できることが明らかとなった (細胞数は当研究室の *in vitro* ヒト BBB モデル構築に関する既報を参照とした, Biol Pharm Bull 2021;44:984-991)。このことから、HASTR にグリオーマ細胞を混ぜこんだ形で細胞塊を構築することにより、その周囲を HBMEC にて被覆できる可能性が考えられた。

上記の結果を受け、HASTR にグリオーマ細胞 (AM-38, U-87 MG, U-251 MG, CCF-STTG1 のいずれか) を混合させた形で細胞塊を作成し、それに続いて HBPC、HBMEC を播種することによるモデルの構築を試みた。HASTR (正常アストロサイト) と比較してグリオーマ細胞の増殖能は非常に

高いことを考慮し、HASTR と比較して顕著に少ないグリオーマ細胞数を構築に用いた。その結果、メチルセルロースを用いた培養法により、HASTR とヒトグリオーマ細胞が均一に分布した細胞塊を核として、その周囲に HBPC と HBMEC が覆うような形態にて、以前より安定して *in vitro* ヒト BBTB モデルの構築が可能となることが明らかとなった。

一方で、グリオーマ細胞の増殖能の高さから HBMEC を播種した数日後には HBMEC の層がグリオーマ細胞により突き破られる現象が認められることから、化合物透過性を評価するためのモデルとしての汎用性という観点では未だ課題が残っているのが現状である。これに対しては、メチルセルロースを用いた培養法を用いてグリオーマ細胞を中心にその周りをアストロサイトで覆うような細胞塊を、*in vitro* ヒト BBTB モデルの核として採用することも検討している。上記細胞塊においては、グリオーマと HASTR の細胞数およびその比率により細胞塊中のグリオーマ細胞の動向が変化することが明らかとなっており、その情報を基に、より安定して本細胞塊を *in vitro* ヒト BBTB モデルの核として取り入れるための方法を開拓中である。

### (3) *In vitro* ヒト BBB モデルと本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデルにおける遺伝子発現の比較解析

当研究室の既報に沿って構築した HASTR, HBPC, HBMEC の3種からなる *in vitro* ヒト BBB モデルと、本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデル (グリオーマ細胞として U-87 MG, U-251 MG, CCF-STTG1 を使用) を用い、BBB の機能に寄与する代表的な BMEC マーカー遺伝子のタンパク質発現・局在を免疫染色法により比較解析した。その結果、BBB モデルを構成する HBMEC と BBTB モデルを構成する HBMEC における VE-cadherin (BMEC に発現する代表的なタイトジャンクション遺伝子の1つ) の発現および局在については、両者間で有意な差が認められないことが明らかとなった。また、BMEC に発現する代表的な排泄トランスポーター遺伝子について解析をおこなった結果、モデルを構成するグリオーマ細胞種によってその発現が異なる傾向が認められた。腫瘍近辺に存在する血管バリアは脆弱であるという印象はかねてより強く残っている一方、BBTB の機能をグリオーマ治療における障壁として認識すべきか否かについては未だ意見が割れているのが現状である。一致した見解が得られていない中でも、これまで *in vivo* において腫瘍中心部に存在する脳毛細血管では確かにバリア機能が失われているとする一方で、その周囲ではバリア機能が残っていると報告する論文、また腫瘍部に存在する BMEC においては代表的な排泄トランスポーターの発現・機能が保持あるいは上昇していると報告する論文が存在する。本研究結果からは、グリオーマ細胞のヘテロ性とともに上記報告をサポートするような結果が得られていると解釈できる。

また、グリオーマ細胞と共培養により HBMEC にて発現が変動する遺伝子の探索を介して、BBTB 特異的な遺伝子の同定を試みた。本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデルを用いる前に、トランスウェルモデルを用いて単培養した HBMEC および U-87 MG と共培養した HBMEC を用意し、それぞれの HBMEC における遺伝子発現プロファイルを RNA-seq により網羅的に解析した。その結果、U-87 MG との共培養により HBMEC にて発現変動が認められた遺伝子が多く見出され、その中には既報にてグリオーマ患者の BMEC に特徴的であると報告された遺伝子も存在した。これにより、*in vitro* ヒト BBTB モデルの構築に HBMEC を用いる妥当性を一部証明できたと考えられる。これを受け、続いて *in vitro* ヒト BBB モデルと、本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデルを用い、上記解析より見出され、かつ既報にてグリオーマの悪性化への関与が報告されていた遺伝子 A に着目し、そのタンパク質発現を免疫染色法により比較解析した。その結果、上記で認められたようなグリオーマ細胞との共培養による HBMEC における遺伝子 A の発現変動は認められないことが明らかとなった。当研究室ではトランスウェルを用いた *in vitro* ヒト BBTB モデルの構築を本研究と並行しておこなっており、それを用いた解析では上記トランスウェルを用いた解析の結果と同様 (グリオーマ細胞種によって差はあるものの)、グリオーマ細胞との共培養により HBMEC における遺伝子 A の発現変動が認められることを確認している。グリオーマ細胞との共存下にある HBMEC において発現が誘導されうる遺伝子候補は他にも存在し、それについて解析をおこなう余地は残されているものの、上記で認められた二次元および三次元培養での解析結果の不一致性を考慮した上で、今後の解析をおこなう必要があると考えられた。

### (4) *In vitro* ヒト BBB モデルと本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデルを用いた低分子化合物ルシファーイエローの透過性の比較解析

最後に、*in vitro* ヒト BBB モデルと、本研究にて構築した *in vitro* ヒト BBTB モデル (グリオーマ細胞として U-87 MG, U-251 MG, CCF-STTG1 を使用) を用い、低分子化合物ルシファーイエローの透過性の比較解析をおこなった。共焦点顕微鏡により撮影した画像より各モデル内に透過したルシファーイエローの蛍光強度を算出し、評価をおこなった結果、BBB モデルと BBTB モデルとの間でルシファーイエローの透過性に有意な差は認められないことが明らかとなった。この結果は、上記(3)でも示した腫瘍周辺部における血管バリア機能の保持を報告した既報をサポートする結果となる可能性がある。しかし、この解析により得られた結果は、本 BBTB モデルの構築に採用しているグリオーマ細胞数や培養期間によっては変わる可能性が否定できないとともに、BBTB のバリア機能は排泄トランスポーター機能等も含めた解析によって評価する必要があると言えることから、上記項目を考慮した上で今後より詳細な解析をおこなっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田玲奈、森尾花恵、降幡知巳
2. 発表標題 in vitroヒト血液脳腫瘍関門 (blood-brain tumor barrier, BBTB) モデルを用いたBBTBの特徴解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------