

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590243

研究課題名（和文）サル細胞を用いた血液脳関門（BBB）*in vitro* 再構成モデルの開発研究課題名（英文）*In vitro* blood-brain barrier reconstruction model (BBB Kit) and their application to the functional analysis

研究代表者：

丹羽 正美 (NIWA MASAMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20136641

研究成果の概要（和文）：血液脳関門（Blood-Brain Barrier、BBB）は、脳毛細血管内皮細胞、アストロサイトおよびペリサイトの3種類の細胞が機能的に一体となって構築している。また、BBBは、単なる脳内と血液の間で物質の移動を調節するだけではなく、機能的な neurovascular unit を形成し、今まで考えられていた以上に、ニューロン機能と一体化されていることが理解され始めている。BBB機能解析に有用なツールである BBB *in vitro* 再構成モデルの構築には、これらの細胞間クロストークを可能にする微小環境を再現することが重要で、我々は、サル脳毛細血管内皮細胞とラットアストロサイトおよびラットペリサイトの3種類の細胞を立体的に共培養することで、サル型 BBB *in vitro* 再構成モデルを構築した（BBBキット™）。BBBキットは、生体内環境に近似した実験ツールで、薬物候補の脳内移行性を開発の早期段階で予測する創薬支援ツールとして有用である。

研究成果の概要（英文）：The blood-brain barrier (BBB), a member of the neurovascular unit (NVU), functions in communication between brain capillary endothelial cells and other neighboring cells such as astrocytes and pericytes. Many drugs that are currently under development are intended to act centrally, but they do not cross the BBB. Furthermore, the crosstalk between the BBB and related cells contributing to the NVU remains to be elucidated. Based on our breakthrough in using rat primary brain capillary endothelial cells, pericytes and astrocytes to create a triple co-culture BBB model (BBB Kit), an *in vitro* models for screening the BBB penetration of drug candidates and research on BBB pathophysiology, we succeeded in modeling the monkey BBB with primary monkey brain capillary endothelial cells, rat pericytes and rat astrocytes. In addition, we constructed a porcine BBB model consisting of porcine brain capillary endothelial cells, rat pericytes, and rat astrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経、血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) は、中枢神経系に作用する薬物の脳内移行性を決定する。*in vitro* の実験系で薬効が発見された化合物も、BBB を通過して効率的に脳内に移行しなければ薬物に成り得ない。神経細胞を保護育成し脳内の恒常性を維持するという本来の関門機能が、薬物の脳内への移行を阻害し中枢神経作用薬の開発を困難にしている。したがって、生体の BBB 機能を *in vitro* で再現した血液脳関門 (BBB) 再構成モデル (BBB キット) は、医薬品開発過程における合理的な薬剤設計のための重要な情報を提供し、中枢神経作用薬候補の脳内移行性や薬物の BBB 保護作用を開発の早期段階で予測するための創薬支援ツールとして有用である。最近、我々はラットの初代培養脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト、ペリサイトを用いた世界初の 3 細胞構成型 *in vitro* BBB モデル (BBB キット) の開発に成功し実用化した。前臨床試験に至る創薬研究の過程で、薬物候補物質の脳内移行性に関する初期データは、先ずこのラット型 BBB キットによるスクリーニングで得られるが、次の段階のリード化合物同定化と最適化の過程では、より上位のヒト細胞や、よりヒトに近似した霊長類の細胞の実験系による選別選択が必要になる。ヒト脳より得られた脳毛細血管内皮細胞、アストロサイト及びペリサイトで構成されたヒト型 BBB キットが必要であるが、これらの細胞は僅かに実験用として市販されているだけで、ヒト脳からの安定的な必要量の細胞採集と培養法の困難さ、また人権保護の法令遵守の問題などの理由で、現在までヒト培養細胞を用いたヒト型 BBB キットは完成されていない。ヒト ES 細胞や iPS 細胞からの機能的な BBB 細胞への分化誘導も未だ達成されていない

状況である。また、ヒト脳毛細血管内皮細胞を不死化した細胞株 hCMEC/D3 があるが、ラット不死化細胞 (RBE4, GP8.3) と同様、タイトジャンクション (TJs) を形成せず BBB 機能を喪失し使用できない。そこで、我々のラット細胞による機能的 BBB キットの成功と、サル (カニクイザル) の新鮮脳の安定した定期的な供給が得られる目処が立ったこと (株式会社 GMJ (神戸市)、株式会社イナリサーチ (伊那市)) を契機に、ヒトにより近似したサル型 BBB キットの作成を企画した。

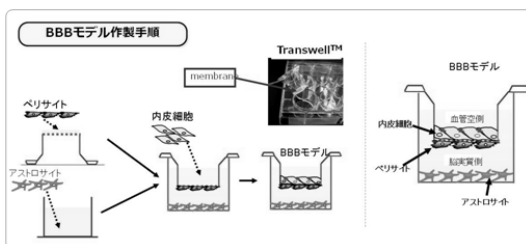
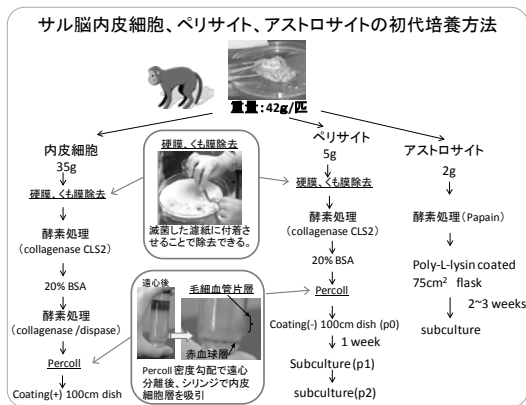
現在の薬物の脳内移行性を検定する *in vitro* BBB 再構成モデルの細胞として、その利便性から不死化脳毛細血管内皮細胞株 (RBE4, GP8.3, hCMEC/D3 など) や脳以外の他組織由来の細胞株 (ECV304, Caco-2, MDCK) が用いられているが、これらの細胞株は BBB の根源的な関門機能であるタイトジャンクション (TJs) を形成せず、生体 BBB 内皮細胞との遺伝子やタンパク質の発現差異のなどからも、生体機能を再現した BBB モデルとは言い難く、薬物の脳内移行性検定には不適切である。初代培養細胞を用いた我々の機能的なラット型 BBB キットが汎用され、創薬の初期スクリーニング過程をより合理的にする所以である。さらに、次のステップの薬効標的化の絞り込みの段階で、サル BBB 関連細胞を用いた BBB キットがあれば、より上位の *in vitro* 実験系として、開発過程のさらなる効率化に貢献する。同時にまた、霊長類のデータ収集の困難さから、現在まで主に、ラットやマウスで蓄積されてきた BBB トランスポーター、タイトジャンクションタンパクや酵素などの発現プロファイルなどに修正を加える事が出来る。

次世代型としてのサル型 BBB キットの創薬への実用的な提供が求められていた。

## 2. 研究の目的

血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) を介する薬物の脳内移行性を検証するためのより正確な創薬支援型実験系を確立するために、カニクイザル (*Macaca irus* 霊長目オナガザル科) の細胞を用いたサル型 BBB *in vitro* 再構成モデル (サル型 BBB キット) を作成する (図 1)。最近、我々は世界で初めて 3 種類の細胞から成るラット型 BBB キットを開発し実用化した (図 2)。この *in vitro* BBB モデルで得られたデータをヒトの臨床効果予測へ発展させるためには、次のステップで、少しでもヒトに近似した BBB キットでのデータ選別が必要である。本研究は、ラット BBB キットの完成を基礎に、サル脳からの各種細胞の分離法と培養法を確立し、合理的な医薬品開発に益する創薬支援ツールとしてのサル型 BBB キットを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法



### BBB キットの機能検定

a) タイトジャンクソン機能: EVOM 電気抵抗計を用いた経内皮膜電気抵抗

(transendothelial electrical resistance, TEER)。

\*タイトジャンクション機能は、立体培養装置内単層培養細胞の TEER で評価され、150 Ω・cm<sup>2</sup> 以上が BBB 細胞としての基準である。(Gillard PJ & De Boer AG, *Eur J Pharm Sci* 12:95-102, 2000)

b) タイトジャンクションタンパク質 (claudin-5, ZO-1)、トランスポーター (p-glycoprotein) などの BBB 特異的タン

パク質の発現、c) トレーサーを用いた機能解析 (以下のトレーサーを用い、細胞間隙輸送、トランスポーター輸送を検討した。)、i) 細胞間隙輸送; sodium fluorescein, <sup>14</sup>C-sucrose、ii) GLUT-1; <sup>3</sup>H-3-methyl-D-glucose、iii) MDR, BCRP; rhodamine 123、iv) MRP; BCECF、v) スカベンジャー受容体; Dil-acetyl-LDL の取込み。透過係数 (Pe) を  $1/PS_e = 1/PS_{total} - 1/PS_{mem}$  より算出した。

### サル型 BBB キットによる既存薬物の脳移行性検定

薬物の脳内移行性検定は BBB モデルのインサート内側(血管腔側)に化合物を入れ、一定時間内に内皮細胞及びペリサイトの層を通過し、プレートのウェル内 (脳実質側) に漏れ出てきた化合物濃度を測定した。濃度測定の結果から透過係数を算出した。得られた透過係数とラット型 BBB キットで得られた申請者らが蓄積したデータベースと比較した。

### サル型 BBB キットと hCMEC/D3 型 BBB キット

サル型キットの構築条件で不死化細胞 hCMEC/D3 による BBB キットを作成し機能検定を行った。

ヒト不死化脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) に対するサルアストロサイトとサルペリサイトの BBB 誘導効果を観察した。

## 4. 研究成果

我々の考案した血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル (BBB キット) (特許第 5113332 号平成 24 年 10 月 19 日及び第 5105905 号平成 24 年 10 月 12 日) を霊長類細胞で実現するために、サル脳からの効率的な脳毛細血管内皮細胞、脳ペリサイトおよびアストロサイトの分離抽出法を試み、これまでに我々が確立してきたラット初代培養細胞用の細胞採取方法を改変して内皮細胞の初代分離培養方法を確立した。典型例であるが、雄性 3 歳カニクイザルの摘出脳 (湿重量 62 g) より原材料分として脳組織 42 g を得て、35 g から脳毛細血管内皮細胞 (5 g は脳ペリサイトおよび 2 g はアストロサイト用) を抽出採取して初代培養を行ったところ、培養 4 日目で  $21.6 \times 10^6$  の細胞数が得られた。2 腔培養装置の単層培養で、培養 1 日目より血液脳関門 (BBB) の機能的指標の 1 つであるタイトジャンクション (TJs) 形成能を反映する径内皮電気抵抗 (TEER) は、培養 1 日目で既に良質な TJs 形成を示す 148 Ω・cm<sup>2</sup> と高値で、以降順調に上

昇し培養3日目で  $250 \Omega \cdot \text{cm}^2$  に達した。サルとラット脳ペリサイトおよびアストロサイトの脳毛細血管内皮細胞への BBB 機能誘導作用の受容能力も十分に効率的で、2腔培養装置を用いた共培養系 (BBB キット) での TEER (培養4日目) は  $900 \Omega \cdot \text{cm}^2$  を達成した。P-gp 機能の TJs タンパクのである claudin-5 と ZO-1 の内皮細胞にける細胞組織化学的発現も、強固な TJs 機能を示す様相であった。サル細胞 BBB キットで得られた薬剤の BBB 透過性係数も、*in vivo* の脳内移行性と一致していた。サル脳毛細血管内皮細胞の初代培養法を確立し、ラット脳ペリサイトおよびアストロサイトとの共培養で機能的な BBB キットを構築した。

幼若サル脳毛細血管内皮細胞の初代培養法に基づく、ラット脳ペリサイトおよびラット脳アストロサイトとの共培養で完成した機能的なサル型 *in vitro* BBB 再構成モデル (BBB キット) の機能検定と薬物の脳内移行性検定を行った。高いタイトジャンクション (TJs) 機能 (経内皮膜電気抵抗で  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上) と、良好な TJs タンパク質 (claudin-5, occludin, ZO-1)、トランスポーター (P-glycoprotein) の発現が得られた。トレーサー (sodium fluorescein,  $^{14}\text{C}$ -sucrose) を用いた細胞間隙輸送、 $^3\text{H}$ -3-methyl-D-glucose を用いた糖輸送担体機能、rhodamine 123 による P-糖タンパクの機能と極性、およびスカベンジャー受容体の確認 (Dil-acetyl-LDL の取込み) について、ラット型 BBB キットと比較検討し、概ね同等の機能を検出した。BBB モデルのインサート内側 (血管腔側) に化合物を入れ、一定時間内に内皮細胞及びペリサイトの層を通過し、プレートのウェル内 (脳実質側) に漏れ出てきた薬物濃度を測定して脳内移行性を検定した。caffeine、antipyrin、L-phenylalanin、及び sucrose の BBB 透過係数 (Papp) は、ラット型 BBB キットで得られた Papp と良く相関していた。P-糖タンパクに關与する verapamil、cyclosporin A、digoxin および Rhodamine123 では、サル型 BBB キットで、より高値な Papp が得られた。P-糖タンパクのタンパク発現が、げっ歯類とヒトでは異なる事が報告されている (Ohtsuki et al. 2011) ので、今後、種差も含めて検討を続けたい。

BBB キットとして良好なサル型 *in vitro* BBB 再現系が構築できた事が確認できた。また、サルおよびラット脳ペリサイトとサルおよびラットアストロサイトの3細胞共培養によるヒト脳毛細血管

細胞株 hCMEC/D3 細胞への BBB 機能誘導効果を検討したが、いずれも有意な BBB 誘導効果は観察されなかった。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Gohei So, Takeshi Hiu, Shoji Horai, Kentaro Hayashi, Kunihiko Tanaka, Kazuhiko Suyama, Maria A. Deli, Isumi Nagata, Masami Niwa. Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30:727-735, 2010
2. Maria A. Deli, Szilvia Veszelkaa, Boglarka Csiszara, Andrea Totha, Agnes Kittel, Maria Csetec, Aron Siposc, Aniko Szalaic, Livia Fulopd, Botond Penked, Csongor S. Abrahama, Masami Niwa. Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid- $\beta$ -induced toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* 22: 777-794, 2010
3. 中川慎介、田中邦彦、田川泰、丹羽正美. 血液脳関門再構成モデルと機能解明への活用. *分子脳血管病* 9(3): 17-25, 2010
4. Andrea Toth, Szilvia Veszelka, Shinsuke Nakagawa, Masami Niwa, Maria A. Deli. Patented *in vitro* blood-brain barrier models in CNS drug discovery *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 6:107-118, 2011
5. Eva Hellinger, Szilvia Veszelka, Andrea Toth, Fruzsina Walter, Agnes Kittel, Monika Laura Bakk, Karoly Tihanyi, Viktor Hada, Shinsuke Nakagawa, Thuy Dinh Ha Duy, Masami Niwa, Maria A Deli, Monika Vastag. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2 and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *European*

Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 82: 34-350, 2012

6. Shoji Horai, Shinsuke Nakagawa, Kunihiko Tanaka, Yoichi Morofuji, Pierre-Olivier Couraud, Maria A. Deli, Hiroki Ozawa, Masami Niwa: Cilostazol strengthens barrier integrity in brain endothelial cells. Cell Mol Neurobiol 33: 291-307, 2013

[学会発表] (計 5 件)

1. 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 16 日～18 日大阪国際会議場 (大阪)

S Nakagawa, MA Deli1, DHD THUY, M Sagara, N Yamada, K Tanaka, M Niwa. Development of in vitro monkey BBB model

2. 13th International Symposium on "Signalling at the Blood-Brain and Blood-Tumour Barriers. 2010 年 9 月 2 日～4、Zurich. An In vitro monkey BBB model. S Nakagawa, MA Deli1, DHD Thuy, M Sagara, N Yamada, G So, R Tatsumi, K Tanaka, M Niwa

3. 第 5 回 Japanese Consortium for Age-related Neurodegenerative disorders (J-CAN 2012)、2012 年 08 月 25 日 八重洲ファーストフィナンシャルビル(東京都)

In vitro 血液脳関門再構成モデル (BBB キット) を用いた BBB 機能の解析  
中川慎介、丹羽正美

4. 第 14 回応用薬理シンポジウム、2012 年 09 月 3 日～4 日 ベルクラシック甲府(山梨県). 血液脳関門 In vitro 再構成モデル (BBB キット). 中川慎介、MA. Deli、DHD Thuy、相良真由美、田中邦彦、丹羽正美

5. 第 24 回日本脳循環代謝学会総会、2012 年 11 月 8 日～9 日 リーガロイヤルホテル 広島 (広島県). 血液脳関門 In vitro 再構成モデル (BBB キット) と機能解明への活用. 中川慎介、MA. Deli、DHD Thuy、相良真由美、田中邦彦、丹羽正美

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 正美 (NIWA MASAMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 20136641

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

田中 邦彦 (TANAK KUNIHICO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 80380955