

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659072

研究課題名(和文) 脳関門プロスタグランジン排出制御機構解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of prostaglandin elimination across brain barriers and its application to neural inflammatory diseases

研究代表者

細谷 健一 (HOSOYA, Ken-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70301033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：病態時におけるプロスタグランジンの産生に関与する酵素(mPGES-1及びL-PGDS)の脳における発現局在を免疫組織化学的に解析した結果、mPGES-1及びL-PGDSは軟膜に発現し、mPGES-1についてはアストロサイトに発現していた。さらに、炎症モデルにおいて、mPGES-1はこれら細胞に加え、脳毛細血管内皮細胞に強く発現することが示された。脳毛細血管内皮細胞は血液脳関門の実体細胞であり、本関門を介した炎症関連物質PGD2は、PGE2と同様に排出輸送が低下していた。以上の結果から、脳内プロスタグランジンの生理活性について、血液脳関門が重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression and localization of mPGES-1 and L-PGDS proteins was examined by immunohistochemical analysis. L-PGDS were expressed in leptomeningeal cells. The signals derived from mPGES-1 were detected in leptomeningeal cells and astrocytes. In the inflammatory model of mice, this mPGES-1 signal was strongly detected in brain capillary endothelial cells, which forms the blood-brain barrier (BBB). In this model, the elimination of PGD2, which is involved in the progression of inflammatory responses, across the BBB was attenuated. From these results, the BBB plays a role in the regulation of the physiological function of prostaglandins in the brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：プロスタグランジン 血液脳関門 脳内炎症 プロスタグランジン合成酵素 血液脳脊髄液関門 リポ多糖

## 1. 研究開始当初の背景

興奮性神経伝達の異常な活発化(興奮毒性)は、痙攣発作の誘発や神経細胞死とそれに伴うアルツハイマー病を始めとした中枢神経疾患発症の引き金となる。興奮性神経伝達物質 L-グルタミン酸に加え、生理活性脂質プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) がこれら興奮毒性に関与することが報告されており、これら物質の脳内量及びその神経薬理的効果の制御は、興奮神経毒性回避及び中枢神経疾患発症・進行メカニズムを理解する上でますます重要視されている。申請者は、「脳関門内因性物質排除機構と薬物との相互作用」の重要性を解明する研究を推進しており、最近血液脳関門 PGE<sub>2</sub> 排出輸送について、申請者は以下の点をこれまでの研究から見いだしている。

マウス BBB を介し PGE<sub>2</sub> は排出され、その消失半減期は 16 分であること。さらにその排出は血液脳関門 PGE<sub>2</sub> 輸送担体 MRP4 を阻害する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) や抗生物質によって阻害される。

リポ多糖 (LPS) 投与によって末梢組織炎症を惹起させたマウスにおいて BBB を介した PGE<sub>2</sub> 排出は減弱すること、一部の抗生物質投与によって、その排出はほぼ 0 になる。

[ , *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 333, 912-9 (2010); , *Fluids Barriers CNS*, 8:24 (2011)]

申請者は国内外で初めて BBB が脳内 PGE<sub>2</sub> クリアランスに役割を果たしていることを明らかにした。一方で、炎症時における PGE<sub>2</sub> 排出減弱は BBB に発現する輸送担体の変化では十分に説明出来ない (*J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 432-40 (2003); *J. Neurochem.* 87 891-901 (2003))。

BBB が「中枢神経支援防御システム」として機能することは近年の研究から実証されてきている。BBB を介した PGE<sub>2</sub> 排出輸送は脳内過剰炎症を回避させるために機能していると推察されることから、その変動は脳炎症応答を制御している可能性が高い。近年、脳と循環血液中の BBB を介した物質交換機能は神経活動によって制御されることが報告されているもの (*Neuron*, 67, 834-46 (2010))、低分子輸送担体に着目した研究は非常に乏しい。以上の観点から、BBB に発現する輸送担体を阻害するという既成の概念から脱却し、「炎症時において活性化された脳細胞シグナル系、及びそれに付随する各種産生物質が血液脳関門 PGE<sub>2</sub> 排出輸送減弱に寄与する」という挑戦的仮説及びその実証計画の立案に申請者は至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、「炎症時血液脳関門ではプロスタグランジン排出機能が減弱し、その過程を制御する方策の構築」を最終目的とする。この目標を達成するため、炎症時における脳内プロスタグランジン産生及びそのクリアランス機構の変動を詳細に明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症モデル動物の構築

6 週齢 ddY 系統雄性マウスまたは 6 週齢 Wistar 系統雄性ラットに対し、lipopolysaccharide (LPS) を 3-5 mg/kg となるように腹腔内投与し、24 時間経過後に各種解析を実施した。

### (2) 抗プロスタグランジン合成酵素抗体作成

各合成酵素について、対象配列を BLAST 検索することにて特異的抗原部位を決定した。特異的抗原部位は polymerase chain reaction (PCR) 法によって増幅し、抗原発現用プラスミド pGEX4T-2 (GE ヘルスケア) に組み込んだ。なお、内部配列が報告配列と一致することをキャピラリーシーケンサー (ABI3100) にて確認した。大腸菌 BL21 (GE ヘルスケア) ヘプラスミドを導入し、液体培養後に IPTG を加えることで対象抗原タンパク質合成を誘導させた。発現させた抗原タンパク質はグルタチオン S 転スフェラーゼ (GST) 融合型であることから、Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア) にて精製した。

精製した抗原とアジュバンド (DIFCO) とのエマルジョンを、モルモットへ皮下投与し (2 週間間隔, 6 回)、投与完了 2 週間後に全血を採取した。抗血清は全血を遠心することで得た。抗血清を Protein G Sepharose 及び抗原タンパク質結合 cyanogen bromide-activated column を用いて精製し、抗体を得た。

### (3) 合成酵素発現細胞構築

炎症時における PGE<sub>2</sub> の産生亢進への microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) の関与が報告されている。(2) にて mPGES-1 に対する特異的抗体候補が得られたことから、その認識性バリデーションを目的に、mPGES-1 発現細胞を構築した。mPGES-1 の open reading frame を組み込んだ pcDNA4-HisMax plasmid (Life Technologies) を Lipofectamine 2000 (Life Technologies) にて Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に導入した。導入処理 24-48 時間後に各種解析を実施した。

#### (4) Western blot 法による抗体評価

作成した抗体は、マウス脳サンプルや mPGES-1 発現 CHO 細胞から調製した crude membrane fraction をサンプルとした Western blot 法にて特異性を評価した。さらに、抗体反応時に GST 融合抗原を共存させることによって、特異性を評価した。

#### (5) 免疫組織化学的解析

マウスをペントバルビタールナトリウム腹腔内投与 (100 mg/kg) によって麻酔し、4%パラホルムアルデヒド-リン酸バッファー (pH 7.0-7.4) を左心室から全身灌流することによって固定処理した。脳組織について、OCT compound に包埋後凍結切片を、またはパラフィン包埋後ミクロトーム切片を調製した。切片に対して作成した抗体で処理し、次いで蛍光標識二次抗体にて反応させた。蛍光退色剤含有封入剤を用いてプレパートを調製後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### (6) ラット脳から BBB を介したプロスタ

##### グランジン排出輸送

麻酔下ラット大脳皮質 Par2 領域に放射標識 PGD<sub>2</sub> ([<sup>3</sup>H]PGD<sub>2</sub>) 及び BBB 非透過性物質 ([<sup>14</sup>C]D-mannitol) を微量投与し、指定時間後に安楽死させ、投与側大脳皮質を単離した。水酸化ナトリウム溶液 (2 N) にて可溶化し (55°C, 3 時間)、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor, PerkinElmer) を加え、十分に攪拌後、液体シンチレーションカウンターにて <sup>3</sup>H 及び <sup>14</sup>C 放射活性を測定した。なお、各種化合物による阻害効果は、微量投与液中に化合物を共存させることによる脳内残存率の変動を指標に評価した。

## 4. 研究成果

### (1) プロスタグランジン合成酵素の作出及び特異性評価

一般に炎症時における脳内プロスタグランジン濃度上昇には各種合成酵素の発現量上昇が寄与すると言われている。一方で、脳に存在する各種細胞の中で「どの」細胞において発現が上昇するかについて、精査されていない。この「空間的プロスタグランジン合成酵素発現量変動」を明らかにすることを目的に、各種疾患時に脳内発現量上昇が報告されているプロスタグランジン合成酵素に対する抗体作出に取り組んだ。

PGD<sub>2</sub> の疾患時における産生上昇に関与するリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) に対する抗体について候補を作出し、マウス脳 crude membrane fraction を

サンプルとした Western blot 法にて特異性を評価した。その結果、期待されるサイズである約 26 kDa 付近に単一の band が検出され、その band は抗原タンパク質共存にて消失した。従って、作出した抗 L-PGDS 抗体は高い特異性を有することが示唆された。

PGE<sub>2</sub> の炎症時や神経変性疾患時における脳内濃度上昇に関連することが報告されている mPGES-1 に対する抗体について候補を作出し、Western blot 法にて特異性を評価した。mPGES-1 発現が報告されているマウス腎臓及び脳の crude membrane fraction を用いた解析の結果、期待されるサイズである約 15 kDa 付近に単一の band が検出された。また、mPGES-1 一過性導入 CHO 細胞の crude membrane fraction を用いた解析においても、同様に期待されるサイズにバンドが検出された。さらに、これらのバンドは抗原タンパク質共存にて消失した。以上の結果から、作出した抗 mPGES-1 抗体は高い特異性を有することが示唆された。

### (2) 空間的 L-PGDS 及び mPGES-1 発現・局在の解析

マウス脳切片を用い、L-PGDS の脳細胞発現局在パターンを、(1)で作成した抗体を用いた免疫組織化学的解析にて評価した。L-PGDS について、脳細胞の中では脳脊髄液に接する軟膜において高発現することが示唆された。脳脊髄液における PGD<sub>2</sub> の濃度変動は自然睡眠サイクルと相関することが報告されていることから、L-PGDS は脳脊髄液中への PGD<sub>2</sub> 供給に役割を果たす可能性が考えられた。

同様の手法にて、(1)にて作製した抗 mPGES1 抗体を用い、マウス脳における mPGES-1 の発現局在パターンを評価した。その結果、mPGES-1 は脳実質においてアストロサイトと軟膜細胞に高発現し、BBB の実体である脳毛細血管内皮細胞においてもわずかながら発現することが示唆された。

### (3) 炎症モデルにおける mPGES-1 発現変動の空間的プロファイリング

LPS 投与によって作成した炎症モデルマウス脳の crude membrane fraction を用いた解析から、mPGES-1 タンパク質発現量は正常マウス脳と比較し上昇することが示された。その発現量上昇がどの脳細胞において発生しているかを検証するため、炎症モデルマウスを用いた免疫組織化学的 mPGES-1 発現解析を実施した。その結果、mPGES-1 由来のシグナルはアストロサイトと脳毛細血管内皮細胞において劇的に強く検出された。従って、炎症時において脳内における PGE<sub>2</sub> 産生量上昇には、

アストロサイトや脳毛細血管内皮細胞が果たす役割は大きいことが示唆された。

#### (4) ラット BBB を介した PGD<sub>2</sub> 排出輸送解析と炎症時における変動

我々は PGE<sub>2</sub> の排出輸送が炎症モデルにおいて減弱することを明らかにしている。過去の報告から PGD<sub>2</sub> は PGE<sub>2</sub> と同じ有機アニオン輸送担体の基質であることが報告されている。炎症時における PGD<sub>2</sub> 産生もまた亢進し、脳実質にて炎症応答の発生に参与することが報告されていることから、脳実質と循環血液を隔てる BBB を介した PGD<sub>2</sub> 輸送特性を明らかにすることは重要である。

この点を検証するため、ラット BBB を介した PGD<sub>2</sub> 排出輸送を brain efflux index 法にて検証した結果、ラット大脳皮質を介し [<sup>3</sup>H]PGD<sub>2</sub> は排出輸送され、その消失半減期は約 15 分であることが示された。その排出は BBB に発現する有機アニオン輸送担体である organic anion transporter 3 (OAT3) 阻害剤にて強く阻害され、organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) や prostaglandin transporter (PGT) の阻害剤では、弱く阻害された。以上の結果から、BBB を介して PGD<sub>2</sub> は排出輸送されること、その過程には OAT3 が主に参与することが示唆された。さらにその排出は、LPS 投与ラットにおいて約 71%低下した。従って、BBB を介した PGE<sub>2</sub> 排出輸送の低下と同様に、PGD<sub>2</sub> 排出輸送もまた低下することが示唆された。

#### (5) まとめ

本研究の成果として、以下の三つが挙げられる。

脳内 PGE<sub>2</sub> 及び PGD<sub>2</sub> 産生亢進に関連する酵素発現の時空間的解析ツールの作出

の酵素の炎症時における空間的発現変動、特に BBB の実体細胞である脳毛細血管内皮細胞における mPGES-1 発現量上昇の解明

BBB を介した PGD<sub>2</sub> 排出輸送機構の解明及び炎症時におけるその低下についての実証

特に、炎症時におけるプロスタグランジン排出輸送の減弱が認められる BBB の実体細胞にて PGE<sub>2</sub> の合成亢進に関連する酵素の発現量が上昇するという結果から、細胞内における PGE<sub>2</sub> 量変動に伴う BBB を介した輸送機能変動という可能性が考えられる。現在、詳細な解析に取り組んでおり、その詳細を明らかにすることで、中枢神経系疾患時のプロスタグランジン排出輸送機能の制御に繋がること

が期待される。

## 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3件)

Eskilsson A., Tachikawa M., Hosoya K., Blomqvist A., Distribution of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the mouse brain., *J. Comp. Neurol.* (印刷中); DOI, 10.1002/cne.23593 (査読有)

Tachikawa M., Tsuji K., Yokoyama R., Higuchi T., Ozeki G., Yashiki A., Akanuma S., Hayashi K., Nishiura A., Hosoya K., A clearance system for prostaglandin D<sub>2</sub>, a sleep-promoting factor, in cerebrospinal fluid: role of the blood-cerebrospinal barrier transporters., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 343, 608-16 (2012); DOI, 10.1124/jpet.112.197012 (査読有)

Tachikawa M., Ozeki G., Higuchi T., Akanuma S., Tsuji K., Hosoya K., Role of the blood-cerebrospinal fluid barrier transporter as a cerebral clearance system for prostaglandin E<sub>2</sub> produced in the brain., *J. Neurochem.*, 123, 750-60 (2012); DOI, 10.1111/jnc.12018 (査読有)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 健一 (HOSOYA, Ken-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号: 70301033

(2) 研究分担者

久保 義行 ( KUBO, Yoshiyuki )

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・

准教授

研究者番号 : 20377427

(3) 連携研究者

立川 正憲 ( TACHIKAWA, Masanori )

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 : 00401810

赤沼 伸乙 ( AKANUMA, Shin-ichi )

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・

助教

研究者番号 : 30467089