

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18109002

研究課題名（和文） プロテオミクスの手法を用いた血液脳関門輸送機構の解明

研究課題名（英文） PROTEOMICS-BASED ANALYSIS OF BLOOD-BRAIN BARRIER TRANSPORT SYSTEM

研究代表者

寺崎 哲也 (TERASAKI TETSUYA)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60155463

研究成果の概要（和文）：

質量分析装置を用いて multiplexed MRM モードを活用して、高感度同時に細胞膜蛋白質を定量する方法を開発した。本研究で最も優れた成果は、定量に適したペプチドをアミノ酸配列に基づいた *in silico* で選択できるようになったことである。この手法を用いて、マウスの脳毛細血管内皮細胞（血液脳関門）の輸送担体蛋白質の発現量を解明した。さらに、ヒトの血液脳関門における輸送担体蛋白質の発現量も明らかにした。ヒト血液脳関門について、11種類の未知の輸送担体候補蛋白質を見出すことができた。本研究は今後の血液脳関門研究、特に、病態効果を解明する上で非常に有用である。

研究成果の概要（英文）： We have developed a highly sensitive and simultaneous method to quantify membrane protein on the basis of separation and identification of protein digests by liquid chromatography-linked tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with multiplexed multiple/selective reaction monitoring (MRM) mode. The most significant result is that we succeeded to develop an *in silico* selection criteria to find appropriate peptide fragment to be quantified which will give high intensity by LC-MS/MS analysis. By using this method, we have quantified transporter proteins in the brain capillary endothelial cells, i.e., blood-brain barrier, in mouse. Moreover, we succeeded to clarify quantitative transporter protein expression in the human blood-brain barrier. We identified 11 membrane proteins which may act as transporter in the human blood-brain barrier. These findings will give strong impact for the future blood-brain barrier research, especially for the understanding of effects on the blood-brain barrier function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2007年度	18,400,000	5,520,000	23,920,000
2008年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2009年度	20,200,000	6,060,000	26,260,000
2010年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
総計	85,500,000	25,650,000	111,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：血液脳関門、脳毛細血管内皮細胞、プロテオミクス、トランスポーター、ABC transporter, 質量分析、pharmacoproteomics、標的絶対プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞膜の輸送担体の定量化を

中心としたプロテオミクス研究は、国内外で報告されていない。特に、血液脳関門輸送研究に質量分析法を応用する試みは世界的に例がなかった。プロテオミクス研究は、二次元電気泳動サンプルを個別に解析する手法が中心であり、この手法では定量的な情報が得られない。さらに、疎水性アミノ酸を多く含む生体膜蛋白質の質量分析は、極めて困難であり、サンプル調整法に画期的手法を導入しない限り、不可能である。

質量分析技術の進歩はめざましく、本研究に用いる装置は300マルチチャンネル型で「質量3,000以下の未知の多検体混合物を同時に定量定性分析」が可能である。この性能を最大限に利用し、肝臓や腎臓などに比べ、遅れている血液脳関門輸送の研究を飛躍的に進展させる。

現在の血液脳関門研究はfunctional genomicsが主流であると共に、輸送担体蛋白質の存在は、抗体を用いた免疫組織化学的手法に頼っている。一方、プロテオミクスの最大の長所は、このボトルネックを根本的に解決することができる点である。

私達の研究室は、これまでの基盤研究で得られた成果の一つとして「脳関門の条件的不死化細胞株の樹立」がある。現在、世界10カ国60箇所の大学研究機関の研究者に供与し、共同研究を行っており、血液脳関門研究のCenter of Excellence (COE)としての役割を果たしている。今回の提案課題を推進することで、in vitro系で得られつつあるこれらの成果をin vivoへと統合させることが可能になり、波及効果も大きい。血液脳関門のプロテオミクスを世界に先駆けて推進することで、世界をリードし、より多くの世界の研究者との共同研究へ発展させる基盤整備が実現する点が特色である。

2. 研究の目的

一般に膜蛋白は疎水性アミノ酸を多く含む質量分析が極めて困難であり、輸送担体プロテオミクスのボトムネックであった。本研究は、ショットガン法を用いて「輸送担体蛋白の細胞膜局在性を定量的に解明する新規質量分析法」を開発することを目的とする。

さらに、nano-LC/MS/MSを用いた超高感度微量質量分析法を開発することで、少量の脳サンプルで膜蛋白研究を可能し、病態時の機能解明研究への道を開く。

なお、この超微量分析法は、ヒトでの研究を実現する鍵を握る重要な技術であり、本プロジェクト終了後、「ヒト血液脳関門機能解明」という究極の目的へ発展させる予定である。

すなわち、当初の目的として、マウスの脳毛細血管内皮細胞での発現量解析することとするが、超高感度定量法の開発に成功した場合、研究計画を前倒しして、ヒトの脳毛細血管内皮細胞での発現量の解明に取り組むこととする。

本研究では、さらに、未知の血液脳関門の機能を解明することを目的とする。このために、輸送担体候補及び機能未知の細胞膜蛋白質について定性・定量解析を行い、発現量の比較的多い蛋白質について遺伝子導入細胞を作成し、輸送基質を同定し、血液脳関門の未知の生理機能を解明する。

3. 研究の方法

脳毛細血管内皮細胞の高純度分離方法を開発する。

定量対象蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、質量分析装置によって強力なシグナルが得られるペプチドを選択する。天然型と安定同位体標識型アミノ酸を用いて当該配列のペプチドを合成(委託)する。このペプチドを用いて、LC-MS/MS(高速液体クロマトグラフィー質量分析装置)を用いて検量線を引く。脳毛細血管内皮細胞から細胞膜を調整し、可溶化し、トリプシン消化する。安定同位体標識アミノ酸を含有したペプチドを内部標準物質として、試料に加え、LC-MS/MSで天然型と同位体標識型の両ペプチドのシグナルを検出する。ただし、質量分析の際、定量対象のペプチドから発生する娘イオンについて、3~4種類を選択し、Multiplexed MRM modeで定量し、各娘イオンから測定される定量値に優位差がない場合、マトリクス効果が無視できるものと評価して、定量値として用いる。さらに、nano-LCを導入して超高感度化を図る。

新規輸送担体蛋白質の探索は、候補蛋白質をリストアップして各蛋白質のアミノ酸配列に基づいて質量分析装置で強いシグナルが得られるペプチドを選択し、各ペプチドが検出できるかを検討する。検出された中から、発現量が比較的多い候補蛋白質の遺伝子発現系を構築し、基質探

索を行う。

4. 研究成果

定量の材料となる脳毛細血管内皮細胞の磁気細胞分離による高純度分離法の確立を行った。破碎条件、酵素条件、表面抗原等を検討し、分離の最適化を行った。その結果、ラット、マウスからの高純度分離法を確立した。脳毛細血管内皮細胞のマーカー分子の mRNA 発現レベルは、脳と比較して分離画分に濃縮された。さらに、神経細胞やアストロ細胞などのマーカー分子の mRNA 発現レベルは従来の分離法と比較して低かった。従って、確立した手法を用いることで、より高純度の脳毛細血管内皮細胞を回収できる。分離したラット脳毛細血管内皮細胞を用い、MRP1 から MRP6 のサブタイプの mRNA 発現を解析した結果、MRP1 および MRP4 の高い発現が認められた。従って、これらサブタイプが血液脳関門で重要な機能をしていると考えられる (論文 9)。高純度マウス脳毛細血管内皮細胞を用いて密着結合に重要な膜蛋白質である Claudin のサブタイプ 1-24 の mRNA を解析した結果、Claudin-5 が極めて高い発現であることを明らかにした (論文 7)。

さらに、Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode を用いた多検体同時の細胞膜タンパク質の絶対量法を開発した。細胞膜サンプルの可溶性化条件、還元、アルキル化条件などの検討を行い、ABC トランスポーターの ABCB, ABCC, ABCG サブファミリーの定量法を確立した。膜タンパク質のトリプシン消化に関しても、最適条件の検討を行い、タンパク質断片をほぼ 100% の調製できることが検証できた (論文 6)。

開発した方法を用いて、マウス脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体タンパク質の絶対定量し、下記のような輸送担体蛋白質の絶対発現量プロファイルを明らかにした。下記、数値いずれも単位は、(fmol/ μ g protein)。

Glut1	90.0	Mct1	23.7	Asct2	1.58
Mdr1a	14.1	Bcrp	4.41	Taut	3.81
Lat1	2.19	Oatpf	2.41	Oatp2	2.11
Oat3	1.97	Mrp4	1.59		

脳毛細血管の血液側、脳側の細胞膜における局在量を明らかにするためには、それぞれの膜画分の純度が問題となる。そこで、上記の定量法によって得られる絶対量を用い、各膜のマーカー蛋白質の絶対量によって純度を補正することによって、高純度に膜画分を精製しなくても局在量を求めることができる方法論を構築した。(論文未発表)

輸送担体蛋白質の基質同定についても、複数基質候補のカクテルを用いて、質量分析装置によって一斉定量を行うことによって、評者標識化合物を用いずに効率よく多くの化合物をスクリーニングする系を開発した。本系

で脳関門に発現する MRP4 の基質の探索を行い、新規薬物基質を多く同定した (論文 8)。

4000QTRAP-Nano-LC system を導入し、超高感度蛋白質定量を開発した。サンプル前処理の基本的操作は同じであるが、特に、蛋白質の可溶化とトリプシン消化の操作方法を工夫して、カラムの分離のトラブルの発生を抑えることで比較的再現性のいい定量方法を開発した。API5000-regular LC に比べて、約 60 倍の高感度化を実現した。マウスの脳毛細血管内皮細胞の蛋白質解析の実験では約 100 匹のマウス大脳を使用する必要があったが、超高感度化に成功したことから 1g の大脳から調製した毛細血管を用いて定量が可能になった。なお、nano LC で分析するサンプル量は、5 μ g 蛋白質で十分である。

ヒト血液脳関門におけるトランスポーターを解析するために、凍結ヒト大脳からメッシュ法を用いて脳毛細血管内皮細胞を単離する方法を開発した。16 歳から 77 歳のヒト大脳 (7 人のドナー) から脳毛細血管を単離した。114 種類の候補蛋白質について開発した設計方法を用いてアミノ酸配列に基づいて、定量ペプチドを設計して、定量条件を決定した。ヒト脳毛細血管内皮細胞を可溶化トリプシン消化し、質量分析装置を用いて蛋白質の定量を行った。詳細な結果は、論文 1 に発表した通りであるが、MDR1, BCRP, MRP4, ABCA2 などの ABC transporter や CAT1, LAT1, MCT1, EAAT1, GLUT1 などの SLC transporter が発現していた。興味深いことに OAT3 は定量限界以下であり、ヒトにおける有機アニオン輸送系はマウスと異なることが示唆された。マウスの発現量 (fmol/ μ g protein) に比べてヒト (6.06 fmol/ μ g protein) の MDR1 は 0.43 倍、BCRP (8.14 fmol/ μ g protein) は 1.85 倍であったことから、ヒトの血液脳関門における MDR1 の働きはマウスよりも低い、BCRP の寄与は無視できないことが示唆された。また、MRP4 の発現量もマウスに比べてヒト (0.195 fmol/ μ g protein) では 0.123 倍と顕著な動物種差のあることが分かった。MRP4 は血液側細胞膜に局在して、Prostaglandin E2 を脳及び脳毛細血管内皮細胞から血液側へ排出することから、ヒトでの発現量が少ない結果は、げっ歯類よりも排出機能が低い可能性を示唆していることになる。今後、この結果について詳細に検討する必要がある。

ヒト単離脳毛細血管を用いて、さらに、仮想 MRM 法を用いて解析を行ったところ、これまでマウスやヒトで発現が報告されていない 2 種類の輸送担体の発現が示唆された。ヒト in vitro BBB モデルとして有用なヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 (D3) を用いて、仮想 MRM 法を用いて全ての SLC transporter の発現解析を行ったところ、11 種類の機能未知

の輸送担体の発現が示唆された。これらの中から、発現量の多い2種類について遺伝子発現系を構築した。両候補について、質量分析装置を用いて基質候補分子探索を行ったところ、一方は、Docosahexaenoic acid (DHA) を輸送することが示唆された。さらに、DHA はヒト血液脳関門培養細胞 D3 細胞に取り込まれ oleic acid で阻害されたことから、DHA のヒト大脳への移行性にこの輸送担体が寄与していることが示唆された。もう一方については、基質探索の結果、脳内で合成されないが脳内に存在する内因性の有機アニオン性物質を輸送することが明らかになった。(未発表) 今後は、血液脳関門におけるこの輸送能の低下と中枢疾患や脳の発達障害との関連を解明することが重要であると考えられる。

脳毛細血管内皮細胞の脳側膜と血液側膜における輸送担体タンパク質の発現量の解析を詳細に行い、マーカータンパク質の存在量を用いた補正式に基づいて各細胞膜に発現する輸送担体の分別定量法を確立することができた。今後、この分別定量法を用いて膜局在性情報を含んだヒト血液脳関門の実体を解明する予定である。

以上、当初の研究目標「マウス脳毛細血管内皮細胞膜に発現する輸送担体タンパク質の絶対発現量解明」だけでなく、ヒトについても解明することができ、2種類の新規輸送系を見出すことができた。これらの成果は、創薬科学へ大きな波及効果が期待される。今後は、この手法を病態時における血液脳関門の輸送担体発現量変動とその機能変動の解析に応用し、ダイナミックインターフェースとしての脳の恒常性維持における脳関門の働きの実体解明に取り組む計画である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Y. Uchida, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, T. Terasaki, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.*, 査読有, 117(2):333-345 (2011).
2. S. Ito, S. Ohtsuki, Y. Katsukura, M. Funaki, Y. Koitabashi, A. Sugino, S. Murata, T. Terasaki, Atrial natriuretic peptide is eliminated from the brain by natriuretic peptide receptor-C-mediated brain-to-blood efflux transport at the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 査読有, 31:457-466 (2010).
3. 大槻純男, 上家潤一, 寺崎哲也: Targeted Absolute Proteomics を用いたトランスポーターの新しい研究展開、

遺伝子医学 MOOK12、査読無、48-54 (2009)

4. 大槻純男: 中枢への薬物分布におけるトランスポーターの機能と役割、日本薬理学雑誌、査読無、134:83-86 (2009)
5. S. Akanuma, S. Hori, S. Ohtsuki, M. Fujiyoshi, T. Terasaki: Expression of nuclear receptor mRNA and liver X receptor-mediated regulation of ABC transporter A1 at rat blood-brain barrier. *Neurochem. Int.*, 査読有, 52: 669-674 (2008).
6. J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki: Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm. Res.*, 査読有, 25:1469-1483 (2008)
7. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, T. Terasaki: mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.*, 査読有, 104:147-154 (2008)
8. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm. Res.*, 査読有, 24:2281-2296 (2007)
9. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, T. Asashima, T. Terasaki: Establishing a method to isolate rat brain capillary endothelial cells by magnetic cell sorting and dominant mRNA expression of multidrug resistance-associated protein 1 and 4 in highly purified rat brain capillary endothelial cells. *Pharm. Res.*, 査読有, 24 : 588-694 (2007)
10. S. Ohtsuki, T. Terasaki: Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.*, 査読有, 24:1745-1758 (2007)

[学会発表] (計 111 件)

1. T. Terasaki. Quantitative Targeted Absolute Proteomics of BBB Transporters: Changes with Species and Disease, SESSION 10: DRUG TRANSPORTERS AND CNS

- PENETRATION, American Association of Pharmaceutical Scientist, Workshop, Bethesda, Maryland, USA, March 16, (2011)
2. T. Terasaki, Blood-Brain Barrier Pharmacoproteomics: Quantitative Transporter Protein Analysis for In Vitro-In Vivo, Interspecies and Diseased State Differences. Transporter Proteins III: Clinical Relevance and Applications, Session 392, Convention Center, New Orleans, 24th Annual Meeting of American Association of Pharmaceutical Scientists, New Orleans, USA, Nov. 18, (2010)
 3. T. Terasaki, S. Ohtsuki, Quantification of Transporter/Enzyme Protein in Human Tissue by Mass Spectrometry: A New Path to Pharmacoproteomics (PPx), 9th International ISSX meeting, Symposium 3: Clinical Pharmacology of Drug Transport: From Bench to Bedside, Istanbul, Turkey, Sep. 5, (2010).
 4. T. Terasaki, M. Nakada, C. Ikeda, Y. Hayashi, J. Hamada, Y. Sonoda, T. Kumabe, T. Tominaga, S. Ohtsuki, Quantitative protein analysis of human glioblastoma, Neoangiogenesis in Brain Tumours, International meeting of Signal Transduction of the Blood-Brain Barrier, Zurich 2010, Symposium 9, Zurich, Switzerland, Sep 4 (2010).
 5. T. Terasaki, S. Ohtsuki, Development of highly sensitive simultaneous protein quantification by LC-MS/MS and its application for the research of human disease, 28th The Japan Endocrine Society (JES) Summer Seminar on Endocrinology & Metabolism (Toward the Progress and Development of Endocrinology, Session 1: Advancement of Research Technologies), Huis Ten Bosch, Nagasaki, July 8, (2010)
 6. T. Terasaki: Prediction of In Vivo ADME Based on the Transporter Protein Quantification . 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, CA, USA, Nov 8-12 (2009)
 7. S. Ohtsuki, R. Iwase, J. Kamiie, K. Ohmine, H. Harigae, T. Terasaki: Pharmacoproteomics in Cancer Research. 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, CA, USA, Nov 8-12 (2009)
 8. T. Terasaki, J. Kamiie, S. Ohtsuki: Transporter protein quantification for the future of transporter science. Advanced Technologies for the Future of Transporter Sciences, The 36th Congress of the International Union of Physiological

Sciences (IUPS2009), Kyoto, Japan, July 28- August 1 (2009)

9. T. Terasaki: Quantitative transporter protein analysis of human brain capillary endothelial. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference (CVB2009), Sendai, June 28-July 2 (2009)
10. S. Ohtsuki: New approach to drug design by quantitative membrane proteomics. Special lecture in Seoul National University, Seoul, Korea, May 20 (2009)

〔図書〕 (計 2 件)

寺崎哲也、京都廣川書店、トランスポーター科学最前線、2008 年、23

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：06822538

出願年月日：2008 年 6 月 17 日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：2006313253

出願年月日：2008 年 5 月 22 日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：4197/DELNP/2008

出願年月日：2008 年 5 月 16 日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：200680041752.6

出願年月日：2008 年 5 月 8 日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の

定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：12/093,133

出願年月日：2008年5月8日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の
定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許出願

番号：2,628,708

出願年月日：2008年5月6日

国内外の別：国外

○取得状況（計3件）

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の
定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許

番号：7,901,942号

取得年月日：2011年3月8日

国内外の別：国外

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の
定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許

番号：4670060号

取得年月日：2011年1月28日

国内外の別：国内

名称：質量分析計を使った膜タンパク質の
定量方法

発明者：上家潤一、大槻純男、寺崎哲也

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許

番号：2006313253号

取得年月日：2010年10月7日

国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

<http://>

www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺崎 哲也 (TERASAKI TETSUYA)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60155463

(2) 研究分担者

大槻 純男 (OHTSUKI SUMIO)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：60323036

(3) 連携研究者