

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790236

研究課題名（和文） 血液脳関門の防御機構を司る分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） The molecular basis of the Blood-Brain Barrier

研究代表者

菅田 浩司 (KANDA HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60508597

研究成果の概要（和文）：

遺伝子やシグナル伝達機構が進化的に保存された優れたモデル動物であるショウジョウバエを用いて、血液脳関門（Blood-Brain Barrier：BBB）のバリア機能獲得と維持に関わる遺伝子を遺伝学的手法を用いて探索し、その分子機構について生体レベルでの解析を行った。現在までの解析の結果、研究代表者が立案したスクリーニング系は、目的の遺伝子を探索する上で優れた系である事が実証できた。また、複数の該当遺伝子を得る事に成功し、解析を行う事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In order to address the molecular mechanisms for regulating the integrity of Blood-Brain Barrier (BBB), we have utilized the *Drosophila melanogaster*, fruit fly, as a model system. We have performed an RNAi-based screen to identify genes that are involved in the regulation of the integrity of *Drosophila* BBB. BBB-related genes showed the predicted phenotype in our system, indicating that this system is capable of identifying genes whose function is required for BBB.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：血液脳関門、BBB、ショウジョウバエ、遺伝学、グリア

1. 研究開始当初の背景

ヒト脳内の血管内皮細胞は密着結合（Tight junction; TJ）を形成する事で脳実質を血流から遮断すると共に、荷電分子の脳実質への受動拡散を阻止している。また、血管内皮細胞の apical 側（血流側）に局在する一連の膜輸送担体（トランスポーター）は不要物を血流中へ能動的に排出する。この高度に機能分化した生体防御機構は血液脳関門（BBB）と総称される。この機構は周囲

のペリサイトやアストロサイトによってサポートされる事が知られている。このように、BBB は、単一の細胞群が全く異なる2つ(以上)の機構を介して脳を厳密に保護する極めてユニークかつ重要な生体防御システムであるにも関わらず、その細胞内分子メカニズムは未だにほとんど明らかにされていない。これまで多くのモデル系が作出され、BBB を通過し得る物質や新たなトランスポーターの探索がなされた。解析に用いられる主な

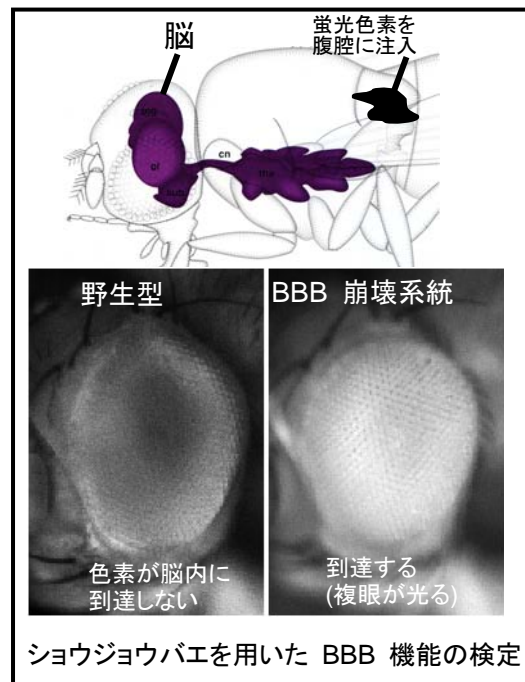
手段は、単離脳毛細血管、初代培養脳毛細血管細胞、不死化細胞株等とアストロサイトとの共培養を基本とする系である。しかし、これらの条件下では、生体環境と比べて各種トランスポーターの機能が著しく低い、若しくは TJ の形成が不十分である等、多くの不都合を有した。また、BBB を破綻させる事が知られている遺伝子変異や病態についてはげっ歯類モデルを用いた解析が行われたが、動物飼育の煩雑さや経費の問題から大規模な解析には不利であった。このように、これまでの解析系から一定の成果は得ているが未だにその分子機構は大部分が不明であり、BBB の機能解析を進める為には根本的なブレークスルーが必要である。特に、BBB 機能の分子機構を解明する上で最も大きな課題の一つは、関連遺伝子及びシグナル伝達経路を生体レベルで大規模に解析する系が確立していない点である。

2. 研究の目的

生体レベルで BBB 関連遺伝子をスクリーニングしうる研究系の確立を行う。さらに、その実験系を用いて、BBB の機能獲得と維持に必要な遺伝子の探索を行う。目的遺伝子が得られた後には、個々の遺伝子について、ショウジョウバエの強力な遺伝学を用いて、生体レベルで分子機構の解析を行う。これにより、BBB による生体防御機構の分子メカニズムの解明に貢献する前衛的な知見を得る事を目的とする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの強力な遺伝学を用いて、アダルト BBB 特異的に単一遺伝子の二本鎖 RNA (dsRNA) を過剰発現させる手法で *in vivo* RNAi を行い、BBB のジャンクション形成に必要な因子及びトランスポーターによる薬剤排出に必要な因子をスクリーニングする。ショウジョウバエの BBB 機能が正常であれば、腹腔に注入した蛍光色素（ハエにとっての異物）は中枢神経系に侵入できないが、BBB の機能が破綻していた場合、脳内に蛍光色素が浸入するため、アウトプットとして複眼から蛍光シグナルが得られる。従って、いかなる遺伝子の発現を抑制すると BBB 機能が破綻するかに関して、動



物が生きた状態でスクリーニングを行う事が可能である。

得られた候補因子について、ショウジョウバエの強力な遺伝学を用いて、①BBB 機能に対する進化的な保存性 ②既知の BBB 関連遺伝子との相互作用の有無 ③目的遺伝子による BBB 制御機構の分子メカニズム に焦点を当て、生体レベルでの解析を行う。

4. 研究成果

まず実験系の妥当性を検証する目的で、本法を用いてショウジョウバエ Claudin を始めとする、進化的に保存された既知の BBB 関連の 5 遺伝子について解析した。その結果、全てのケースにおいて個体は目的の表現型を示した。従って、本スクリーニング系は目的遺伝子を探索する上で適した系である事が実証できた。

上記の結果を受けてゲノムワイドなスクリーニングを行った。目的の表現型を示す複数の候補遺伝子を得た。これまでのスクリーニングで得られた遺伝子のうちで、ヒトホモログが存在する遺伝子について表現型の特徴を解析した結果、以下の 3 グループに大別できる事が分かった。①BBB を構成する細胞の発生、分化、移動、生存には異常が認められないが、BBB 機能が低下している。②SJ が一度は正常に形成されるが、加齢と共にその

機能が低下する。③BBB を構成する細胞の発生、分化、移動のいずれかに異常がある為に SJ が正常に形成されない。

①のグループに属する遺伝子は正に未知の BBB の制御機構を解明し得るものである可能性が高い。また、ヒトの BBB 機能が加齢とともに低下する事からも明らかであるように、②に該当する遺伝子も特に年齢に依存した BBB の機能制御に関わっている可能性が高い。一方で、③に該当する遺伝子は細胞の発生そのものに関わる遺伝子である可能性が高く、BBB の「バリア機能」に着目して解明を行う研究目的とは異なる事から、本研究課題においては解析対象から除いた。

上記の解析によって抽出した遺伝子において、表現型が dsRNA の off target 効果の結果である可能性を否定する為に、候補遺伝子の機能欠失型変異体を用いて表現型の再現性を確認し、目的とする候補遺伝子の絞り込みを行った。

以上の解析から、研究目的を満たす候補遺伝子を複数得る事に成功した。これらの遺伝子のうち、発現パターンやその分子の特性から、進化的に保存された癌関連遺伝子が BBB の制御において極めて重要な役割を担っている可能性を示唆する結果を得ている。今後は、本遺伝子が関与する BBB の制御機構について解析を進める。

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 2 件)

① Kanda H, Nguyen A, Chen L, Okano H and Hariharan I.

“The *Drosophila* ortholog of MLL 3/MLL 4, *trithorax related*, functions as a negative regulator of tissue growth.”

Mol. Cell Biol. 33, 1702-1710 (2013).

・査読有り

・論文内の図が同号の表紙として採用された。

・本論文は、同号内の commentary で紹介された。

② Kanda H, Igaki T, Okano H, Miura M.

“Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced

nonapoptotic cell death.”

Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 18977-82 (2011).

・査読有り

・本論文は Faculty of 1000 に選出された (FFa rating 6; recommended)

[学会発表] (計 7 件)

【国際会議】

① Hiroshi Kanda, Rieko Shimamura, and Hideyuki Okano.

“Identification of genes required for the integrity of Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.”

Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012 : ポスター発表、2012 年 11 月 12-13 日、奈良県新公会堂 (奈良)

② Hiroshi Kanda, Rieko Shimamura, and Hideyuki Okano.

“A genetic approach for the organization and function of the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.”

The 4th Biennial Symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (BMAP 2012): ポスター発表、2012 年 8 月 29-31 日、慶應義塾大学三田キャンパス (東京)

③ Hiroshi Kanda, Rieko Shimamura, and Hideyuki Okano.

“A Genetic Approach for the Organization and Function of the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.”

The 1st Asia Pacific *Drosophila* Research Conference: ポスター発表、2011 年 5 月 22-25 日、Chientan Youth Activity Center (台湾・台北)

【国内学会】

④ Hiroshi Kanda, Alexander Nguyen, Hideyuki Okano and Iswar Hariharan.

“MLL family proteins differently regulate cell growth and proliferation in *Drosophila*.”

第 35 回日本分子生物学会年会 : ポスター発

表、2012年12月11-14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡）

⑤ **Hiroshi Kanda**, Rieko Shimamura, and Hideyuki Okano.

“RNAi-based genetic screen of genes required for the integrity of Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.”

第10回日本ショウジョウバエ研究会、口頭発表、2012年10月13-15日、東京慈恵会医科大学（東京）

⑥ **Hiroshi Kanda**, Tatsuhi Igaki, Hideyuki Okano, and Masayuki Miura.

“Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced non-apoptotic cell death.”

第34回日本分子生物学会年会：ポスター発表、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜（横浜）

⑦ **Hiroshi Kanda**, Rieko Shimamura, and Hideyuki Okano.

“Molecular Basis of the integrity of Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.”

第34回日本神経科学大会、口頭発表、2011年9月14-17日、パシフィコ横浜（横浜）

〔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

慶應義塾大学 医学部 生理学教室

ホームページ：

<http://www.okano-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅田 浩司 (KANDA HIROSHI)

慶應義塾大学医学部・助教

研究者番号：60508597