

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670095

研究課題名(和文)モデル生物を用いた血液脳関門の分子機構の解析

研究課題名(英文) A genetic approach for the understanding of the integrity of Blood-Brain Barrier in *Drosophila*.

研究代表者

菅田 浩司 (KANDA, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60508597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子やシグナル伝達経路が進化的に保存された優れたモデル生物であるショウジョウバエを用いて、血液脳関門(Blood-Brain Barrier)の形成や形成後の機能維持に不可欠である遺伝子の解析を行った。過去に申請者が立案・実行した *in vivo*スクリーニングでは複数の目的遺伝子を得ることに成功している。一連の遺伝子のうち、本研究では主に、バリア機能の形成に関して新たな概念を提唱する遺伝子、BBBの機能制御における時間軸の概念を提唱する遺伝子、及び、BBBの新たな生理的意義を提唱する分子に着目して解析を行った。その結果、いずれもこれまでに報告されていない分子機構を見出している。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the molecular mechanisms of genes whose function is required for the establishment and/or the maintenance of the integrity of Blood-Brain Barrier (BBB). *Drosophila melanogaster* (fruit fly) was used as the model organism. We have mainly focused on three different types of genes. Firstly, we analyzed a gene whose function is required for the establishment of the barrier. The knockdown of this gene did not affect the viability of the cells, however, it resulted in the hypoplasia of the BBB. Secondly, we analyzed a gene whose loss-of-function mutant animal emerged from a pupa with an almost intact BBB, however, its integrity decreased age-dependent manner. Finally, the knockdown of a gene resulted in not only the attenuation of the barrier integrity, but it also induced an increase in the proliferation of neural stem cells. This result strongly suggested a novel physiological significance of the BBB.

研究分野：神経科学、神経発生学、遺伝学

キーワード：血液脳関門 遺伝学 ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

脳内毛細血管の血管内皮細胞は密着結合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、血管内皮細胞の血流側に局在する一連の膜輸送担体は脂溶性の基質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 (Blood-Brain Barrier; BBB) と総称される。一般的に前者は物理的なバリア、後者は化学的なバリアと表現される。

BBB の概念そのものは 1695 年には Humphrey Ridley によって既に記述が残されており、一般的に最もよく知られる Paul Ehrlich らによる実験に関する記述からすでに 100 年以上が経過している。従って BBB の概念そのものはよく確立されていると考えられて来た。

「バリア」という名称から BBB は脳を守る障壁と捉えられる傾向にあるが、一方で、近年、例えばアミノ酸やグルコース等は血管内皮細胞に発現するトランスポーターによって取り込まれる事が報告されている。つまり、BBB は単なる障壁ではなく、積極的に脳内環境の維持に関わる重要な生理的意義を有する事が明らかになりつつある。さらに、本研究課題開始後の 2015 年 1 月には MRI (Magnet Resonance Imaging) を用いた研究から、ヒト BBB の物理的なバリア機能が加齢とともに低下していく事が報告された (Montagne *et al. Neuron* 2015)。これによって機能解析に時間軸の概念を取り入れる必要性も見出されている。

これまでに述べた物理・化学的な特性によって、BBB は大半の薬物の脳移行を阻止する。この機能は脳への治療薬の供給を著しく制限するため、脳の薬物療法を極めて困難にしている。この点を克服するために、海外では BBB 機能を人為的に低下させる臨床研究も進められている (Carpentier *et al. Science*

*Translational Med.* 2016)。このように、BBB はその機能が低下した際はもちろんのこと、正常時においてさえも生体にある種の「不利益」を与えていると言える。この両側面に同時にアプローチする意味において、その制御機構を生体レベルで解明することは極めて重要である。

## 2. 研究の目的

*in vivo* スクリーニングで得た候補遺伝子の解析を行う事で、BBB 形成を制御する分子機構を生体レベルで明らかにする。特に、これまでの BBB 研究の主流であった培養細胞を主とした実験系では解析が困難であった、細胞非自律的な機構や時間軸に沿った機能変化を解析し得る分子群に着目して解析することで、ショウジョウバエを用いた解析の優位性を最大限に活かす。さらに、バリア機能にとどまらず、BBB を形成する細胞が内包する新たな生理的意義を見出し、その制御機構に不可欠である分子を同定する。以上によって得られた一連の分子による制御機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

着目する遺伝子の機能欠失型変異体が劣勢致死ではない場合は変異体を用いた解析を進める。しかし大半の遺伝子は劣勢致死であるため、変異体を用いた解析は困難である。この場合、BBB を形成する細胞に特異的に目的遺伝子の RNAi を誘導することで発現をノックダウンする。ショウジョウバエの BBB は胚発生の最後期に形成される。従って、変異体または RNAi によって遺伝子発現をノックダウンした胚の BBB 機能を評価するためには、蛍光標識したトレーサーを顕微鏡下で胚腹腔に微量注入し、蛍光色素の中枢神経系への浸潤を蛍光顕微鏡で観察する。

蛍光トレーサーを用いた今回のスクリーニングで得られる分子は、トランスポーター

を主体とする化学的なバリアに関連する分子ではなく、細胞間ジャンクションを介した物理的なバリア機能に関与すると考えられる。従って、解析においてはジャンクションの構造を透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy; TEM) で解析する必要がある。複数の遺伝子の各解析過程において TEM 解析を実施することは困難であるため、ジャンクションで発現する主要な分子の蛍光レポーターを用いて、蛍光顕微鏡下でバリア機能の評価を行う実験系を立ち上げ、解析に取り入れる。解析においては既知の BBB 関連遺伝子の機能欠失型変異体との遺伝学的な相互作用を解析し、シグナル伝達における上下関係を明らかにする。さらに、関連シグナルを活性化/抑制する系統を用いてシグナル伝達機構の全容を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

本研究においては主に下記の分子に関する知見を得ることに成功した。

(1)バリア機能の形成に関して新たな概念を提唱する分子

本分子は進化的に保存されており、ヒト血管内皮細胞にも発現が認められているが、ヒトにおいて BBB の形成に関する機能は全く報告されていない。本実験系を用いた解析から、本分子の機能を介して、脳以外の環境が BBB 形成に不可欠な役割を担っている事を強く示唆する結果を得た。

(2) BBB の機能制御における時間軸の概念を提唱する分子

本分子の機能欠失型変異体においては、成虫の羽化直後は BBB 機能はほぼ正常であったが、経時的に低下することを見出した。この結果は、BBB 機能は生理的・病的環境下において経時的に変化しうることを強く示唆しており、ヒトの BBB 機能が加齢と共に漸減する事と良く相関する。

(3) BBB の新たな生理的意義を提唱する分

子

本分子の発現をノックダウンすると BBB 機能の低下が認められた。興味深いことに、この時神経幹細胞の増殖が有意に亢進した。一連の BBB 関連遺伝子の発現をノックダウンしても同様の表現型は認められないことから、この結果は以下の三点の可能性を強く示唆していると考えられる。この分子はバリア機能の維持以外にも BBB を形成する細胞において別の生理的意義を有する

正常発生においては、神経幹細胞の増殖を抑制する分子機構が存在している。それに関するシグナル伝達機構や分子は、本分子による制御下において BBB を形成する細胞から供給されている

#### 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 )

‘Musashi mediates translational repression of the Hypoxia Inducible Factor.’ Bertolin AP, Katz MJ, Acevedo J, Pozzi B, Blanco-Obregón D, Yano M, Gandara L, Kanda H, Okano H, Srebrow A and Wappner P. *Nucl. Acid Res.* **44**, 7555-67 (2016) 査読あり.  
doi: 10.1093/nar/gkw372.

「4D 蛍光イメージングのためのライトシート顕微鏡」菅田浩司、岡野栄之 *Medical Science Digest* **41**, 278-279 (2015) 査読なし.

[ 学会発表 ] ( 計 9 件 )

Hiroshi Kanda, Rieko Shimamura, Taro Yamaguchi, Michiko Koizumi-Kitajima, and Hideyuki Okano. “A genetic approach for the

understanding of the brain microenvironment that regulates the plasticity of neural stem cells.”

12<sup>th</sup> Japanese Drosophila Research Conference、ポスター発表、2016年9月9-11日、立教大学（東京都・豊島区）

**Hiroshi Kanda**, Rieko Shimamura, Taro Yamaguchi, Michiko Kitajima, and Hideyuki Okano. “A genetic approach for the understanding of the brain microenvironment that regulates the plasticity of neural stem cells.”  
第39回日本神経科学大会、ポスター発表、2016年7月20-22日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

**菅田浩司**「血液脳関門」  
JST グローバルサイエンスキャンパス事業、口頭発表（招待講演）、2016年5月4日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県・横浜市）

**菅田浩司**”Evolutionarily conserved function of Blood-Brain Barrier.”  
Chronological Change in Brain Function、口頭発表（招待講演）、2016年3月8日、千葉大学（千葉県・千葉市）

**菅田浩司**、島村理恵子、岡野栄之。「神経幹細胞の可塑性を制御する分子機構」  
第11回成体脳のニューロン新生懇談会、ポスター発表、2015年11月14日、名古屋市立大学（愛知県・名古屋市）

**Hiroshi Kanda**, Rieko Shimamura, Michiko O. Inouye, and Hideyuki Okano. “A genetic approach for understanding the plasticity of neural stem cells in Drosophila.”  
第38回日本神経科学大会、ポスター発表、2015年7月28-31日、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）

**菅田浩司**、島村理恵子、山口太郎、井上通子、岡野栄之。「モデル生物を用いた神経幹細胞の可塑性を規定する分子基盤の解析」  
第14回日本再生医療学会総会、ポスター発表、2015年3月19-21日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

**Kanda H**, Shimamura R, and Okano H.  
“Evolutionarily conserved molecules regulate the integrity of Blood-Brain Barrier in Drosophila.”  
International symposium of neurovascular wiring. ポスター発表、2015年1月28-30日、関西セミナーハウス（京都府・京都市）

**Kanda H**, Shimamura R, and Okano H.  
“Evolutionarily conserved molecules regulate the integrity of Blood-Brain Barrier in Drosophila.”  
18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), ポスター発表、2014年4月14-17日、京都国際会議場（京都府・京都市）

〔図書〕(計2件)

**菅田浩司**「神経幹細胞」**脳内環境辞典** 54-55（全160ページ）メディカルドゥ（2017）

岡野栄之ら監訳、赤松和土、**菅田浩司**ら共訳 **オックスフォード 生理学 原著4版**（Chapter 2、14-27ページ 担当（全874ページ））丸善出版（2016）

〔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

<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・講師

研究者番号：60508597