

平成 21 年 4 月 24 日現在

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 (TETSUYA TERASAKI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60155463

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、プロテオミクス、トランスポーター、質量分析

1. 研究計画の概要

本研究は、高感度定量定性質量分析装置を用い脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体蛋白量を網羅的に定量化し、「血液脳関門輸送機構の定量的マップ」を完成させ、さらに、定量的マップから機能未知の輸送担体を同定し、輸送機能の解明によって、脳関門プロテオミクスによる「血液脳関門の新しい生理機能の解明」を実現する。

2. 研究の進捗状況

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視細胞を用い、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 5)。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 3)。

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 2)。

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、	Mct1	24、	Asct2	16
Mdr1a	16、	Bcrp	4.0、	Taut	3.8
Lat1	2.2、	Oatpf	2.4、	Oatp2	2.1
Oat3	2.0	Mrp4	1.6		

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。

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 4)。

当初計画していた技術的課題を全て解決することができた。そこで、研究申請書に明

記したように、本研究課題終了後に開始することを目標としてきた「ヒト血液脳関門の輸送機構の解明」を前倒しで予備的に検討することとした。

少数例で、予備的ではあるが、ヒト凍結大脳から毛細血管内皮細胞を単離し、ABC トランスポーター、SLC トランスポーターの発現解析を行った。その結果、A)マウスより発現量の多いヒト輸送担体、B)マウスより発現量の少ないヒト輸送担体、C)マウスで発現していたがヒトでは定量限界以下の発現量の輸送担体、D)マウスで発現が未知であったがヒトで発現していた輸送担体候補、のグループに分けることができた。この結果は、ヒトの血液脳関門の輸送機能はマウスと大きな異なる可能性を示唆するものである。今後は、ヒトの血液脳関門の輸送担体解析が重要である。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

理由： 当初の目的は、「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を絶対定量解析し、未知の輸送機能を解明すること」であった。マウスで名前の知られる abc トランスポーター、slc トランスポーターについて解析したが、これまでマウス脳毛細血管で報告されていない新規のトランスポーターを見出すことができなかった。

研究期間が5年間認められていたことから、本格的な実験手法開発に取り組むことができた。1)タンパク質のトリプシン消化物の中から質量分析装置で高感度に検出するペプチド断片をアミノ酸配列情報に基づいて選択する方法を確立した、2) Nano-LC の導入によって regular LC に比べて約 10 倍の定量限界の改善が見られ、1 fmol/assay の絶対定量を実現した、3) 予備的であるが、ヒト脳毛細血管内皮細胞を単離し、タンパク質の絶対定量解析を行ったところ、ヒト血液脳関門には上記の A)~D) のグループに分けられる輸送担体とその候補が発現していることが示唆された。特に、ヒトの血液脳関門で未知の輸送担体候補が複数見つかったことは知られていない

血液脳関門輸送担体に顕著な動物種差が見られたことは、これまでの中枢作用薬の開発戦略を根本的に見直す必要があることを示している。また、臨床で用いられている薬物の中枢移行性とその作用・副作用の理解に大きな影響を与えるものと考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

本研究の目的は D)グループの輸送担体候補について、その輸送機能を解明し、血液脳関門の未知の役割を解明することである。2009 年度は、ヒト脳毛細血管内皮細胞に発現する輸送担体タンパク質の本格的解析を実施するとともに、D)グループの中から 2 つの候補について遺伝子導入細胞を用いて、そ

の基質を探索する。研究目的を当初のマウスからヒト血液脳関門に前倒して、その輸送機能を解明する予定である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 11 件)

1. 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.*, 52: 669-674 (2008). 査読有り
2. 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.*, 25:1469-1483 (2008) 査読有り
3. 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.*, 104:147-154 (2008) 査読有り
4. 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.*, 24:2281-2296 (2007) 査読有り
5. 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.*, 24 : 588-694 (2007) 査読有り
6. 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.*, 24:1745-1758 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 82 件)

海外招待講演 15 件、国内招待講演 26 件
国際会議発表 21 件、国内学会発表 20 件

[図書] (計 2 件) 著書 2 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件) 日本を含めて 8 カ国
○取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等

<http://>

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