

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02590

研究課題名(和文) 血液脳関門のマクロトランスポートソーム解明と脳関門透過・標的キャリアへの応用

研究課題名(英文) Microtransport of the blood-brain barrier and its application to the permeable carrier.

研究代表者

大槻 純男(OHTSUKI, Sumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：60323036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血液脳関門における中・高分子輸送システム群の分子的全容を明らかにし、血液脳関門を透過するDDSキャリア開発することを目的とした。内在化タンパク質を網羅的に解析する技術および高純度に脳毛細血管を単離する技術確立した。ヒト脳毛細血管内皮細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞の内在化プロテオームの比較解析を行い、血液脳関門選択的な内在化分子を同定した。また、血液脳関門透過性環状ペプチドを同定し新たな透過機構の関与を示した。加えて、同定環状ペプチド修飾によりリボソームの脳分布が促進されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳への高分子移行に関わると考えられる脳毛細血管内皮細胞に発現する内在化分子を同定した。また、環状ペプチドの血液脳関門透過性機構としてエクソソーム分泌系の関与を明らかにした。これらの成果は血液脳関門の新たな生理機能の解明につながる事が期待される。また、同定した環状ペプチドは巨大粒子であるファージの脳移行を促進させることが従来のDDSキャリアに対する優位点である。従って、同定環状ペプチドを活用することによってナノ粒子による効率的な脳への薬物送達が可能になり、新たな中枢疾患治療薬開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular mechanisms of medium and macromolecular transport systems at the blood-brain barrier and develop DDS carriers that can facilitate penetration across the blood-brain barrier. We have established methods for comprehensive analysis of internalized proteins and for isolating brain capillaries with high purity. We conducted a comparative analysis of the internalization proteome between human brain capillary endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells, and identified blood-brain barrier-selective internalization molecules. We also identified a blood-brain barrier-permeable cyclic peptide, indicating the involvement of a new permeation mechanism. In addition, we found that the modification of the identified cyclic peptides facilitates the brain distribution of liposomes

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：血液脳関門 脳毛細血管 膜タンパク質 輸送 プロテオミクス 内在化 DDS

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門(BBB)は脳毛細血管内皮細胞が密着結合で接着することで構成される血液と脳実質を隔てる関門組織である。当初は物質移行を妨げる障壁として考えられていたが、血液脳関門研究の発展によって、血液脳関門は様々なトランスポーターを発見し、血液と脳実質間の低分子物質交換を制御することが明らかとなり、「障壁」から中枢維持・防御システムとしての「輸送インターフェース」へ機能概念が転換した。この血液脳関門機能のパラダイムシフトは薬物の脳分布に対するトランスポーターの重要性として中枢創薬に必須の概念となっている。

これまでの血液脳関門研究によって血液脳関門にはインスリン、レプチンのホルモン等の中高分子に対する輸送系が存在することが明らかになっている。このことは、血液脳関門が循環液中の生理活性ペプチド、タンパク質を中枢に供給することによって末梢の情報を中枢に提供している可能性を着想させる。従って、血液脳関門には種々の中高分子の輸送システム(マクロトランスポートソーム)が存在し、中枢と末梢の「情報インターフェース」として機能しているという仮説を構築するに至った(図1)。この仮説を明らかにし新たな血液脳関門機能の概念を提示することは、循環器系疾患と中枢疾患の連関メカニズムと治療標的の同定に発展することが期待される。また、血液脳関門マクロトランスポートソームは、バイオ医薬品の中枢移行のボトルネックを解消する血液脳関門を透過・標的とするDDSキャリア開発に直結する。

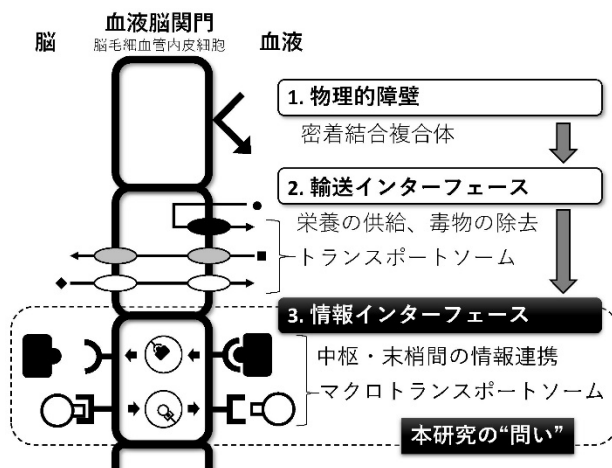


図1 インターフェースとしての血液脳関門機能

2. 研究の目的

本研究は、血液脳関門における中・高分子輸送システム群(マクロトランスポートソーム)の分子的全容を明らかにし、「中枢・末梢連関情報インターフェース」としての血液脳関門機能を明らかにすることを目的とする。さらに、血液脳関門マクロトランスポートソーム情報を活用し、血液脳関門を標的、透過するDDSキャリアの評価を行う。本研究は、血液脳関門を「中枢と末梢の情報インターフェース」として再定義し新機能関門研究領域を開拓するだけでなく、中枢疾患治療に向けた新しい標的やDDSキャリアの提案を目指す。

3. 研究の方法

血液脳関門マクロトランスポートソームはヒト血液脳関門モデル細胞(hCMEC/D3, HBMEC/ciβ)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を独自のダイナミック定量プロテオーム解析を行うことで網羅的に同定、定量し、比較解析を行った(図2)。具体的には、培養細胞の表面タンパク質をビオチンで標識した後、ヒト血清存在下で37°C、5分間処理し内在化を誘導した。細胞表面に残ったビオチンを還元処理で除去した後、細胞を可溶化し、ビオチン標識分子を精製した。精製サンプルをnanoLC-MS/MSを用いた定量プロテオミクスによって解析した。ヒト血液脳関門モデル細胞を透過するペプチドは、ランダムな7アミノ酸から構成される環状ペプチドを提示するファージディスプレイによって同定した。さらに、ペプチドの血液脳関門透過キャリアとしての性能を細胞内取込や脳分布により評価した。

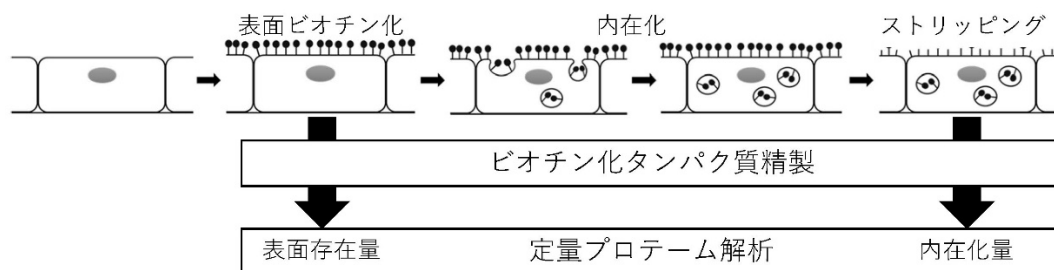


図2 ダイナミック定量プロテオーム解析の概要

4. 研究成果

(1) マクロトランスポートソームの解析技術の構築

血液脳関門マクロトランスポート解明のために表面ビオチン化と定量プロテオミクスを組み合わせて内在化タンパク質を網羅的に同定、定量するプロテオーム解析技術を構築した。構築過程でビオチン標識を可視化した結果、表面ビオチン化では細胞膜表面の標識が検出された。さらに内在化後に表面ビオチン標識を除去した結果、内在化したビオチン標識が検出された。また、銀染色によって細胞膜表面および内在化において異なるバンドパターンが得られた。

(2) 血液脳関門マクロトランスポートソームの解明

構築したプロテオミクス解析によりヒト脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3) とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を解析した。その結果、hCMEC/D3 および HUVEC でそれぞれ 563 分子と 399 分子を同定、定量した。同定タンパク質には混入した細胞質タンパク質等が含まれるため、同定分子から細胞表面タンパク質および内在化タンパク質を抽出することを目的に画分間の濃縮比率や **gene ontology** 情報を用いて抽出するクライテリアを設定した。クライテリアによって抽出した結果、細胞表面タンパク質として hCMEC/D3 および HUVEC においてそれぞれ 378 分子と 225 分子を同定し、内在化タンパク質としてそれぞれ 125 分子と 113 分子を同定した。hCMEC/D3 において最も内在化量が高いタンパク質としてトランスフェリン受容体が同定された。トランスフェリン受容体は血液脳関門においてトランスサイトシスされる分子であり、脳への DDS の標的分子である。トランスフェリン受容体が同定された事は、本プロテオーム解析系が適切に内在化分子を濃縮し、同定していることを示している(1)。

(3) 血液脳関門選択内在化タンパク質の同定

上記の通り取得したプロテオームデータをさらに hCMEC/D3 細胞と HUVEC 間で比較し、血液脳関門選択的に内在化する分子の同定を試みた。血液脳関門選択的に内在化分子として TFRC が同定された。さらに高い内在化効率を示す分子として podocalyxin や ICAM1, integrin subunit が同定された。これら分子の内、血液脳関門についての機能の報告がほとんど無い podocalyxin について解析を進めた。免疫染色の結果、podocalyxin は hCMEC/D3 細胞の細胞膜所に局在が検出された。さらに、anti-podocalyxin 抗体を用いた内在化を解析した結果、抗体は hCMEC/D3 細胞内に内在化された。マウス脳切片の免疫染色の結果、podocalyxin は脳毛細血管内皮細胞に発現しており、内皮細胞の血液側膜に局在していることが示唆された。以上の結果から、podocalyxin は脳 DDS の新規ターゲット分子として有用である。

(4) 高純度脳毛細血管単離法の確立

ヒト脳毛細血管内皮細胞から得られた内在化プロテオーム情報から分子を絞り込むため単離脳毛細血管での発現量の情報を用いる事を考えた。従来の単離法は複数匹のマウスの脳から脳毛細血管を単離しているため、利用が限られていた。本研究においてはビーズ式ホモジナイザー等を用いる事によってマウス 1 匹の脳から従来法より高純度かつ高回収率で脳毛細血管を単離する技術を確立した(2)。

(5) 血液脳関門透過環状ペプチドの同定

血液脳関門モデル細胞(hCMEC/D3)を透過する環状ペプチドを同定するために、ランダムな7アミノ酸から構成される環状ペプチドを提示するファージライブラリと hCMEC/D3 細胞のトランスウェル培養系を用い透過するファージを回収し、3 回繰り返すことによって血液脳関門透過環状ペプチドが濃縮されていると考えられるフラクションを回収した。回収フラクション内のペプチドに相当する cDNA をシークエンスによって同定し、候補環状ペプチドを複数同定した。血液脳関門透過能を確認するために候補環状ペプチドを提示するファージをクローン化し、hCMEC/D3 細胞の透過実験を実施した結果、時間依存的なファージの透過が確認できた。したがって、ヒト脳関門モデルである hCMEC/D3 細胞のファージ透過を促進する環状ペプチドを同定した。さらに、環状ペプチドを提示するファージは共培養系によるサル、ラット脳関門モデル細胞を時間依的に透過した。これらの結果からすべての系で最も透過性の高かった環状ペプチドを今後の解析対象として決定した。同定環状ペプチドは脳関門モデル細胞の細胞生存率と密着結合を変化させなかった(3)。

(6) 血液脳関門透過環状ペプチドの透過機構の解析

環状ペプチドの蛍光標識体のヒト脳毛細血管内皮細胞株である hCMEC/D3 細胞への取込を確認した。そこで、hCMEC/D3 細胞を用いて輸送機構の解析を行った。hCMEC/D3 細胞への取込は温度依存性があり、マクロピノサイトシス阻害剤によって阻害された。また、環状ペプチドを提示するファージをマウスに静注した結果、脳への分布が検出された。環状ペプチドへの細胞内取込はペプチドのアミノ酸配列類似性から抽出されたタンパク質の阻害剤によって阻害された。さらに、特定の分子やペプチドの添加によって促進されることが明らかになった。これらの結果からエクソソーム分泌系が細胞透過に関わっている事が示唆された。

(7) 血液脳関門透過環状ペプチド修飾リポソームの脳への移行性
 同定した血液脳関門透過環状ペプチドを提示するファージの体内動態を解析した結果、脳への分布が促進されるのに対し、肝臓、腎臓、脾臓への分布は認められるものの促進は認められなかった。そこで、脳分布促進キャリアとして実用性を検証するために血液脳関門透過環状ペプチドで修飾されたりポソームを作成し、マウスに静注後、脳への移行性を検討した。その結果、血液脳関門透過環状ペプチドを提示するリポソームの脳移行性が上昇した (図 3)。以上の結果は、同定した血液脳関門透過環状ペプチドは中枢への DDS キャリアとして有用である可能性を示している。

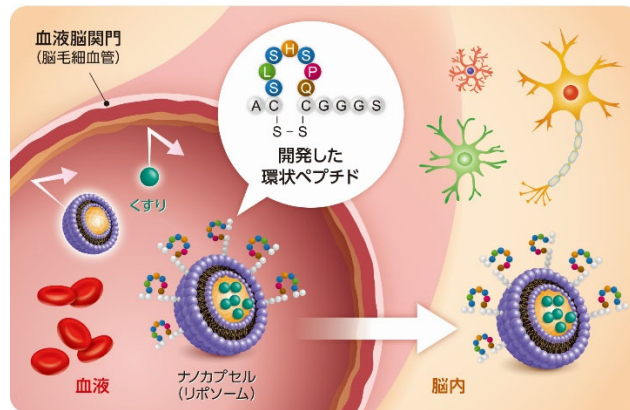


図 3 血液脳関門透過環状ペプチド修飾リポソームの脳への移行への移行促進

<引用文献>

- (1) S. Ito, M. Oishi, S. Ogata, T. Uemura, P.O. Couraud, T. Masuda, S. Ohtsuki: Identification of cell-surface proteins endocytosed by human brain microvascular endothelial cells *in vitro*. *Pharmaceutics*. 12:579 (2020)
- (2) S. Ogata, S. Ito, T. Masuda, S. Ohtsuki: Efficient isolation of brain capillary from a single frozen mouse brain for protein expression analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 41:1026-1038 (2021)
- (3) S. Yamaguchi, S. Ito, T. Masuda, P.O. Couraud, S. Ohtsuki: Novel cyclic peptides facilitating transcellular blood-brain barrier transport of macromolecules *in vitro* and *in vivo*. *J Control Release*. 321:744-755 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Shunsuke, Ito Shingo, Masuda Takeshi, Couraud Pierre-Olivier, Ohtsuki Sumio	4. 巻 321
2. 論文標題 Novel cyclic peptides facilitating transcellular blood-brain barrier transport of macromolecules in vitro and in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 744 ~ 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Shingo, Oishi Mariko, Ogata Seiryu, Uemura Tatsuki, Couraud Pierre-Olivier, Masuda Takeshi, Ohtsuki Sumio	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of cell-surface proteins endocytosed by human brain microvascular endothelial cells in vitro.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 579 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12060579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ogata Seiryu, Ito Shingo, Masuda Takeshi, Ohtsuki Sumio	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficient isolation of brain capillary from a single frozen mouse brain for protein expression analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X20941449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuda Takeshi, Hoshiyama Toshiki, Uemura Tatsuki, Hirayama-Kurogi Mio, Ogata Seiryu, Furukawa Arisu, Couraud Pierre-Olivier, Furihata Tomomi, Ito Shingo, Ohtsuki Sumio	4. 巻 16
2. 論文標題 Large-scale quantitative comparison of plasma transmembrane proteins between two Human blood-brain barrier model cell lines, hCMEC/D3 and HBMEC/ci .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2162 ~ 2171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogata Seiryō, Ito Shingo, Masuda Takeshi, Ohtsuki Sumio	4. 巻 36
2. 論文標題 Changes of blood-brain barrier and brain parenchymal protein expression levels of mice under different insulin-resistance conditions induced by high-fat diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-019-2674-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計18件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 伊藤慎悟
2. 発表標題 環状ペプチドを用いた組織閉門透過技術の開発
3. 学会等名 薬物動態談話会第43年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Cyclic peptides facilitating BBB permeability of macromolecules.
3. 学会等名 1st Mini-Symposium on the Blood Brain Barrier (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤慎悟
2. 発表標題 環状ペプチドを用いた組織閉門透過技術の開発
3. 学会等名 第 32 回 ケミカルバイオロジー研究所セミナー 第 104 回 生物科学フロンティアセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤慎悟
2. 発表標題 バイオ医薬品の脳内送達を目指した血液脳関門における高分子物質輸送機構の解明
3. 学会等名 NanoBio第12回若手ネットワーキングシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunsuke Yamaguchi, Shingo Ito, Takeshi Masuda, Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Identification of cyclic peptide facilitating permeability of M13 phage across the blood-brain barrier,
3. 学会等名 2019 Cerebral Vascular Biology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Ito, Mariko Oishi, Tatsuki Uemura, Takeshi Masuda, Tomomi Furihata, Pierre-Olivier Couraud, Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Identification of cell-surface proteins internalized into in vitro human brain microvascular endothelial cells by SWATH-based quantitative proteomics.
3. 学会等名 BBB signaling 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Oishi, Shingo Ito, Takeshi Masuda, Tomomi Furihata, Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Identification of internalized plasma membrane proteins in human brain capillary endothelial cells.
3. 学会等名 Mass Spec and Proteomics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Oishi, Shingo Ito, Takeshi Masuda, Tomomi Furihata, Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Comprehensive identification of internalized membrane proteins in human brain capillary endothelial cells.
3. 学会等名 The 2nd Workshop for Korea-Japan Young Scientists on Pharmaceutics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Membrane enrichment for targeted proteomics of enzymes and transporters in different tissues and cell lines.
3. 学会等名 ISSX Workshop on LC-MS Proteomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shingo Ito, Mariko Oishi, Takeshi Masuda, Tomomi Furihata, Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Identification of novel internalized cell surface proteins in human brain capillary endothelial cells by SWATH-MS
3. 学会等名 SFN2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sumio Ohtsuki
2. 発表標題 Cyclic peptides facilitating BBB permeability of macromolecules.
3. 学会等名 1st Mini-Symposium on the Blood Brain Barrier (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤慎悟
2. 発表標題 生体関門輸送機能を基盤とした疾患メカニズムの解明と治療への展開
3. 学会等名 第5回分子薬剤学東北セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口駿介、伊藤慎悟、増田豪、大槻純男
2. 発表標題 高分子医薬品の脳内送達に資する血液脳関門透過性環状ペプチドの同定
3. 学会等名 第1回超分子薬剤学FGシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口駿介、伊藤慎悟、増田豪、大槻純男
2. 発表標題 脳内への高分子送達に資する新規BBB透過性環状ペプチドの同定
3. 学会等名 第12回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緒方星陵、伊藤慎悟、増田豪、大槻純男
2. 発表標題 インスリン抵抗性マウスにおける脳関門および脳実質のタンパク質発現および機能変動の解明
3. 学会等名 創剤フォーラム第24回若手研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大槻純男
2. 発表標題 定量プロテオミクスを活用した脳血管研究
3. 学会等名 第2回九州血管の会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大槻純男
2. 発表標題 オミクスの網羅的・定量的解析によって拓かれる創薬・動態研究
3. 学会等名 薬物動態談話会 1月例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口駿介、伊藤慎悟、増田豪、大槻純男
2. 発表標題 高分子を脳実質へ送達する血液脳関門透過性環状ペプチドの同定
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血液脳関門透過性ペプチド	発明者 伊藤慎悟、大槻純男、山口駿介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/ 27907	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 血液脳関門透過性ペプチド	発明者 伊藤慎悟、大槻純男、山口駿介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-134042	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部微生物薬学分野
<http://ohtsuki-lab.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	伊藤 慎悟 (ITO Shigo) (20466535)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授 (17401)	
研究 分 担 者	増田 豪 (MASUDA Takeshi) (70383940)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	コシャン研究所	パリ大学	