

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08973

研究課題名(和文) 血液脳関門保護をターゲットとした中枢神経疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Targeting Blood-Brain Barrier Protection to Develop Therapeutic Agents for Central Nervous System Diseases

研究代表者

出雲 剛 (Izumo, Tsuyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：40343347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血液脳関門(BBB)の基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイトといった、全ての細胞を組み合わせた複数の共培養in vitro BBBモデルを用いて、病態モデル(虚血、炎症、がん脳転移)を作製、また、灌流型の3次元BBBモデルを開発し、neurovascular unitにおける細胞間相互作用を検討した。さらに現在臨床の現場で使用されている薬剤がBBBに与える影響及びその作用機序の解明を行った。このメカニズムを解明することにより中枢神経疾患治療薬の開発、ひいては全く新しい創薬概念である「BBB保護薬」の開発を目的として研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BBBの機能構築には基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイト間のクロストークが不可欠であり、このクロストーク不全が中枢神経疾患の発生に繋がることが明らかとなりつつある。本研究では、転移性脳腫瘍・造影剤脳症そして脳血管攣縮治療薬のBBBにおける作用機序とクロストークについて明らかにしてきた。BBB機能の制御またそのメカニズムを解明することにより、中枢神経疾患全般における、更なる病態解明、治療薬の発見と開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used multiple co-cultured in vitro BBB models combining all cells of the blood-brain barrier (BBB), such as brain capillary endothelial cells, pericytes, and astrocytes, to create pathological models (ischemia, inflammation, cancer brain metastasis), and developed a perfusion-type 3D BBB model to investigate cell-cell interactions in the neurovascular unit. We also developed a perfused 3D BBB model and investigated cell-cell interactions in the neurovascular unit. In addition, we investigated the effects of drugs currently used in clinical practice on the BBB and their mechanisms of action. By elucidating these mechanisms, we have been conducting research with the aim of developing therapeutic agents for central nervous system diseases and, ultimately, a completely new concept of drug discovery, "BBB-protective drugs".

研究分野：脳科学

キーワード：血液脳関門 脳梗塞 転移性脳腫瘍 ドラッグリポジショニング

## 1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (BBB) は単に末梢 (血液) と中枢 (脳) を境界し、物質の移動を制限する関門として機能しているだけでなく、機能的な neurovascular unit を形成し、今まで考えられている以上に、ニューロン機能と一体化していることが理解され始めている。BBB の機能構築には基本構成単位である脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイト間のクロストークが不可欠である。このクロストーク不全が中枢神経系疾患の発症と進展に関与する。事実、BBB の機能破綻が脳卒中やアルツハイマー病などの中枢神経疾患の発症と病状進展に関与していることが明らかにされている (Zlokovic BV: *Physiol Rev*, 2019)。さらに近年では、転移性脳腫瘍から放出される microRNA や細胞外小胞体が BBB 機能を障害すること (Tominaga M: *Nature communications*, 2015, Moses MA: *ACS Nano*, 2019) やアストロサイトやペリサイトが転移性脳腫瘍細胞の増殖をサポートしていること (Xing F: *EMBO Mol Med*, 2013, Morofuji Y, Izumo T: *Cellular and molecular neurobiology*, 2020) など転移性脳腫瘍においても neurovascular unit が重要な役割を担っていることが明らかとなっている。

「BBB 機能の制御またそのメカニズムを解明することにより、中枢神経疾患全般における病態解明、治療薬の発見と開発につながるのではないかと考え、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬剤もしくはがん細胞が BBB に与える影響及びそのメカニズムを解明することにより全く新しい創薬概念である「中枢神経保護薬」の開発につなげることを目的とした。ひいては、脳梗塞治療・認知症予防といった目的だけでなく、がん脳転移抑制効果なども含む中枢神経系疾患全体にインパクトをもつ薬剤の発見・開発につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究においては、以下のステップにて研究を推進してきた。

### (1) 2次元 in vitro 血液脳関門モデルの作成から灌流型 3次元血液脳関門モデルの作製

多孔質 (0.4  $\mu\text{m}$ , 3.0  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  pore size) の半透膜をもつ立体培養皿 (Transwell®) を用い共培養モデルを作製した。作製したモデルは、液性因子のみの影響を受けるモデルと、内皮細胞とペリサイトまたはアストロサイトが接触できるモデルを作製し、更に 3 種類の細胞を同時に共培養したモデルも含め 7 種類のモデルを作製した。

直径 30  $\mu\text{m}$  のコラーゲンチューブに内皮細胞を培養し、灌流下に内皮細胞をおき、さらにコラーゲンマトリックス内にペリサイト、アストロサイトを培養することで灌流型血液脳関門モデルとした。内皮細胞はコラーゲンチューブ内に 24 時間静置することで円柱状に培養、ペリサイト及びアストロサイトはデバイス作製時、コラーゲンジェル内に混入することで培養した。

### (2) 薬剤およびがん細胞が BBB 機能に与える影響の検討

作製した複数の BBB モデル及び以下の病態モデルから細胞を回収し、immunoblot 法や immunostaining にて解析をすすめている。また培養液を血管腔側と脳側よりそれぞれ別に回収しサイトカインアッセイを行っている。

### (3) 2次元/3次元モデルの比較検討、分子生物学的機序の解明

病態モデルにおける BBB 機能を以下の方法を用いて検討を行った。また BBB 保護薬として考え

られる薬剤を添加し BBB 機能に与える影響を評価、そのメカニズムの解明にも着手した。 EVOM 抵抗計 (Volt-Ohm resistance meter) を用いた経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance, TEER) sodium fluorescein 法 (小分子 (376Da) の paracellular transport) Evans' blue-albumin 法 (大分子 (67kDa) の transendothelial transport) P-糖タンパクの機能検定 (rhodamine123 法による) Immunoblot 法にてタイトジャンクション蛋白 (claudin-5, occludin, ZO-1) とトランスポーター (P-gp, MRP, BCRP, GLUT1) の発現を確認した。

#### 4 . 研究成果

肺がんの初代培養細胞と我々の血液脳関門モデルを用いた研究では、以下の知見を得た。ペリサイトが BBB 機能の向上やがん細胞の増殖抑制など、BBB 関連細胞とがん細胞のクロストークに重要な役割を担っていることを裏付けた。肺がんの脳転移に対する BBB の抵抗性を制御しているのは、ペリサイトであることを明らかにした。また、その作用機序が液性因子によることを示唆する知見を得た。ペリサイトは抗転移効果を発揮するため、脳転移の予防治療への応用が期待できる。(Cellular and Molecular Neurobiology (2020) 40:113-121)

また、各種 BBB モデルの妥当性について行った研究では、以下の知見を得た。初代培養細胞で継代を重ねることで 内皮細胞は、細胞由来にかかわらず、BBB バリア機能の制限を示すことはなかった。バリア機能は、細胞源に関係なくペリサイトやアストロサイトと一緒に培養しても内皮細胞は、ペリサイトやアストロサイトと一緒に培養しても、細胞源にかかわらず BBB バリア機能を制限することはなかった。試験した培養モデルの中で培養モデルの中で、BBB の機能解析に適していたのは、P1 細胞を用いたモデルのみであった。BBB の機能解析に適していた。ヒト iPSC 由来内皮細胞は、初代培養内皮細胞の代替となる可能性がある。ヒト iPSC 由来内皮細胞は、初代培養内皮細胞の代替となり得るが、その特性から、使用には注意が必要であることを明らかとしてきた。(Journal of Neural Transmission <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02202-1>)

造影剤脳症にかかる研究では以下の知見を得た。造影剤であるイオパミドールを BBB モデルに対して短期間曝露すると、一時的な BBB 機能不全が引き起こされる。また、脳実質 (abluminal side) に低濃度のイオパミドールが存在すると、持続的な BBB 機能障害が生じる。本研究では、イオパミドールが MAP キナーゼ経路 (ERK 経路のダウンレギュレーションと p38 経路の活性化) を介して BBB 機能を悪化させることを明らかにした。また、イオパミドールは、周皮細胞やアストロサイトにも作用して BBB の障害を引き起こす。イオパミドールによる BBB 障害は、CIE の病態に関連している可能性がある。CIE に関連している可能性がある。造影剤の溢出は、患者の臨床転帰に悪影響を及ぼす可能性があることを明らかとしてきた。(Pharmaceutics 2021, 13, 1272. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081272>)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsunaga Yuki, Nakagawa Shinsuke, Morofuji Yoichi, Dohgu Shinya, Watanabe Daisuke, Horie Nobutaka, Izumo Tsuyoshi, Niwa Masami, Walter Fruzsina R., Santa-Maria Ana Raquel, Deli Maria A., Matsuo Takayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 MAP Kinase Pathways in Brain Endothelial Cells and Crosstalk with Pericytes and Astrocytes Mediate Contrast-Induced Blood-Brain Barrier Disruption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081272	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 Takashi Fujimoto, Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Andrej Kovac, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Masami Niwa, Takayuki Matsuo, William A. Banks	4. 巻 127
2. 論文標題 Comparison of the rate of dedifferentiation with increasing passages among cell sources for an in vitro model of the blood-brain barrier.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1117-1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00702-020-02202-1.	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 Fujimoto T, Nakagawa S, Morofuji Y, Watanabe D, Ujifuku K, Horie N, Izumo T, Niwa M, Banks WA, Deli MA, Matsuo T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Pericytes Suppress Brain Metastasis from Lung Cancer In Vitro.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Mol Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 113-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10571-019-00725-0	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takashi Fujimoto
2. 発表標題 Interaction between Pericytes and brain metastasis
3. 学会等名 3rd Mini symposium on the blood brain barrier From basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoichi Morofuji
2. 発表標題 Intraarterial therapy of Rho-kinase inhibitor for acute ischemic stroke
3. 学会等名 3rd Mini symposium on the blood brain barrier From basic to clinical research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諸藤陽一
2. 発表標題 灌流型in vitro血液脳関門モデル及び中枢神経疾患治療薬の開発
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fujimoto, Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Takeo Anda, Takayuki Matsuo
2. 発表標題 Role of pericytes in brain metastasis formation
3. 学会等名 1st Mini-symposium on the Blood Brain Barrier from Basic to Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei Sato, Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Takashi Fujimoto, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Takeo Anda, Takayuki Matsuo
2. 発表標題 The current trends in the treatment for brain metastasis
3. 学会等名 1st Mini-symposium on the Blood Brain Barrier from Basic to Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Matsunaga, Yoichi Morofuji, Shinsuke Nakagawa, Takashi Fujimoto, Nobutaka Horie, Tsuyoshi Izumo, Takeo Anda, Takayuki Matsuo
2. 発表標題 Rho-kinase inhibitor fasudil protcts blood brain barrier from ischemia/prefusion injury
3. 学会等名 1st Mini-symposium on the Blood Brain Barrier from Basic to Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	諸藤 陽一 (Morofuji Yoichi)  (40437869)	長崎大学・病院(医学系)・講師  (17301)	
研究分担者	藤本 隆史 (Fujimoto Takashi)  (00712085)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  (17301)	

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1件

国際研究集会 1st Mini-symposium on the Blood Brain Barrier from Basic to research	開催年 2019年～2019年
--	--------------------

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
---------	---------