

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07214

研究課題名(和文) 次世代中枢創薬のための階層型三次元共培養によるヒト不死化細胞ミニブレイン創成

研究課題名(英文) Development of human multicellular spheroidal blood-brain barrier models for drug development studies

研究代表者

降幡 知巳 (Furihata, Tomomi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80401008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、三種のヒト不死化細胞を組み合わせることで階層スフェロイド型ヒト血液脳関門モデルを構築し、その創薬研究における有用性を検証した。その結果、本モデルはトランスフェリン受容体(TfR)介在性トランスサイトシスを含めた基本的なBBB機能を有しており、さらにTfRを標的とした抗体のBBB透過性を的確に評価できることが明らかとなった。また、本モデルは炎症性サイトカインに応答すること、さらに免疫細胞のBBBへの遊走まで再現しうることが明らかとなった。したがって、本モデルは、BBB突破技術開発に必要な高分子のBBB透過性評価、および炎症性反応に伴うBBB障害の評価に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、3種のヒト不死化細胞を階層的に組み合わせることにより、新たなスフェロイド型BBBモデルを確立した。これまでに全てヒト不死化細胞から成るスフェロイド型BBBモデルの報告はなく、世界でも初めての成果となる。本モデルは、不死化細胞の汎用性と生体模倣による高機能性を兼ね備えており、高分子薬物のBBB透過性評価や種々の薬物に対するBBB障害評価を、迅速・経済的に、かつ高い精度で行うことを可能とすると期待される。本モデルが標準評価系として産・学で広く活用されれば、新たな薬物脳送達技術創出および薬物のヒト中枢毒性の的確な予測評価法の確立につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We report on the development of a human conditionally immortalized cell-based multicellular spheroidal blood brain barrier (hiMCS-BBB) model. After being seeded into non-attachment culture wells, HASTR/ci35 and HBPC/ci37 cells self-assemble to form a spheroid core that is then covered with an outer monolayer of HBMEC/ci18 cells. hiMCS-BBB models exhibit physical, as well as biological, barrier functions. Furthermore, hiMCS-BBB models show receptor-mediated transcytosis functions at the levels enough to evaluate BBB permeability of antibodies. In addition, tumor necrosis factor-alpha treatment elicited an inflammatory response in HBMEC/ci18 cells. Therefore, hiMCS-BBB models can be expected to provide a useful and highly accessible experimental platform for accelerating various drug development studies, including development of brain drug delivery carriers as well as toxicological evaluations.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 中枢創薬 インビトロモデル 脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系疾患は、極めてメディカルニーズの高い疾患領域である。これは中枢神経系疾患治療薬開発が他領域と比べ著しく困難であるためであり、この要因は主に、血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の存在、高い中枢毒性発現率、ヒト脳研究ツールの欠如、にある。

まず、 BBB に関し、 BBB は脳毛細血管内皮細胞やアストロサイト、脳ペリサイトを主な構成細胞とする血管構造を実体とし、その関門機能により、98%以上の合成化合物や高分子の脳移行が制限される。また、 BBB に関し、ヒト中枢は薬物に感受性が高く、中枢毒性発現は薬剤開発中断の大きな要因である。さらに BBB に関し、現在、ヒト中枢創薬研究を汎用的・経済的に実施できる非臨床研究ツールがなく、動物には種差の問題があり、ヒト中枢を対象とした創薬研究自体、遂行困難である。

したがって、中枢薬開発を効果的・効率的に推進するためには、 BBB を突破して薬剤を脳内に送達させる技術の開発および創薬早期にヒトにおける中枢毒性発現を的確に予測する評価を可能とする *in vitro* ヒト脳モデルが必要である。

一方、*in vitro* ヒト脳モデル構成細胞としてヒト初代培養細胞が考えられるが、これには低増殖能や希少性の問題があり、創薬に実装可能なモデルの構築は現実的ではない。したがって、「機能性に優れ、かつ大規模・多様な実験を可能とするヒト脳モデルを如何にして開発するか？」は積年の課題である。

2. 研究の目的

そこで本課題解決に向け、本研究では、ヒト条件的不死化細胞を構成細胞とし、独自の方法で階層型多細胞スフェロイドを構築することにより、 BBB 突破技術開発・中枢毒性評価を可能とする新規ヒト脳モデル：不死化細胞ミニプレイン (human multicellular spheroidal BBB model, hiMCS-BBB) を創成すること、を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト条件的不死化 BBB 細胞として、これまで当研究室で樹立したヒト条件的不死化 BMEC (HBMEC/ci18)、ヒト条件的不死化ペリサイト (HBPC/ci37) およびヒト条件的不死化アストロサイト (HASTR/ci35) を用いた。hiMCS-BBBモデルは、まず HASTR/ci35 を、続いて HBPC/ci37 を播種し、その2日後に HBMEC/ci18 を播種してさらに2日間培養することで構築した。

hiMCS-BBBモデルにおける各種細胞の局在は細胞を蛍光標識することにより、細胞間隙バリア機能は fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識デキストラン (70 kDa) 透過性試験により、取り込みトランスポーター機能は、2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose) 透過性試験により、排泄トランスポーター機能は rhodamine 123 (R123) 透過性試験により解析した。比較対象として、HBMEC/ci18 を含まない (つまり BBB 機能のない) hiMCSモデル (BMEC -モデル) も構築した。各種 BBB 関連タンパク質の発現は免疫細胞染色法により解析した。ここでは比較として、トランスウェルモデルによる BBB モデルも構築した。さらに、transferrin receptor (TfR) を介した receptor-mediated transcytosis (RMT) 機能はトランスフェリンの蛍光標識体 (Tf-647) を用いた透過性試験により、高分子モデル薬物の BBB 透過性評価能は抗 TfR 抗体 (MEM189 および 13E4) を用いた透過性試験によりそれぞれ解析した。また、hiMCS-BBBモデルの炎症応答は、tumor necrosis factor- α (TNF- α , 20 ng/mL) 曝露時における炎症性マーカーの発現、およびヒト単球由来細胞 THP-1 との相互作用解析により解析した。

4. 研究成果

3. に記載した構築法に則り、hiMCS-BBBモデルを構築し、その形態と細胞局在を解析した (図1)。hiMCS-BBBモデルは直径約 200 - 250 μm の球体状を示した。また、脳側を構成する内部には HASTR/ci35 が、その周囲に HBPC/ci37

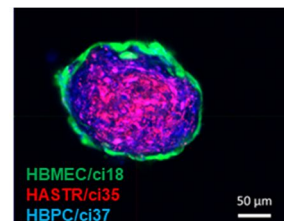


図1. hiMCS-BBBモデルの形態と細胞局在の解析。赤、HASTR/ci35、青、HBPC/ci37、緑、HBMEC/ci18。

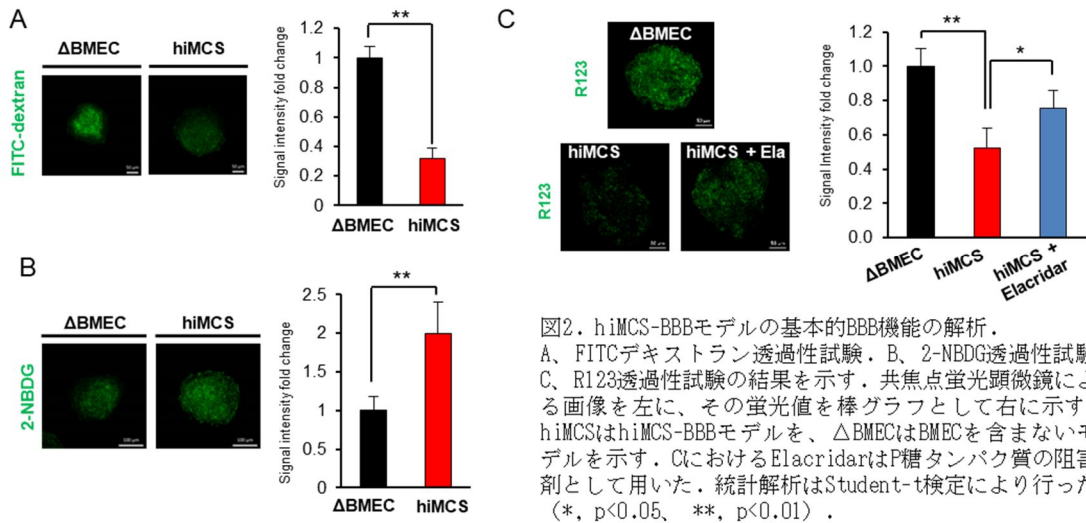


図2. hiMCS-BBBモデルの基本的BBB機能の解析.
A, FITCデキストラン透過性試験, B, 2-NBDG透過性試験,
C, R123透過性試験の結果を示す. 共焦点蛍光顕微鏡による
画像を左に, その蛍光値を棒グラフとして右に示す.
hiMCSはhiMCS-BBBモデルを, ΔBMECはBMECを含まない
モデルを示す. CにおけるElacridarはP糖タンパク質の阻害
剤として用いた. 統計解析はStudent-t検定により行った
(* , p<0.05, ** , p<0.01) .

7が集積しており、さらに最外層をHBMEC/ci18が取り囲むことによりBBBを形成している様子が観察された。

そこで、本モデルが基本的なBBB機能を有しているか明らかとするため、まずFITC-デキストラン透過性試験により細胞間結合能の解析を行った(図2A)。その結果、hiMCS-BBBモデルでは、BBBの無いBMEC-モデルよりも明らかにスフェロイド内部の蛍光値が小さかった。これはデキストランのスフェロイド内部移行がhiMCS-BBBモデルでは制限されていることを示しており、したがって本モデルにおいてBMECが細胞間結合を形成していると考えられる。

次に、代表的なBBB取り込みトランスポーターであるglucose transporter 1 (GLUT1)の機能を明らかとするために、2-NBDG透過性試験を行った(図2B)。その結果、BMEC-モデルと比べ、hiMCS-BBBモデルにおいて、スフェロイド内部の蛍光が高く認められた。本結果は、BBBが存在するhiMCS-BBBモデルでは、GLUT1機能により2-NBDGの取り込みが促進したことを示すと考えられる。

さらに、代表的なBBB排出トランスポーターであるP糖タンパク質(P-gp)の機能を明らかとするために、R123透過性試験を行った(図2C)。その結果、BMEC-モデルと比べ、hiMCS-BBBモデルにおいて、スフェロイド内部の蛍光は低く、その蛍光値はP-gp阻害剤であるelacridarの存在下で上昇した。本結果は、BBBが存在するhiMCS-BBBモデルにおいてP-gp機能によりR123が排出されていることを示すと考えられる。

上記BBB機能に関わるタンパク質の発現を解析するため、hiMCS-BBBモデルを用いた免疫細胞染色をおこなった(図3)。比較として、2次元型BBBモデルであるトランスウェルBBBモデルも用意した。その結果、いずれのモデルにおいても細胞間結合形成に関わるClaudin-5とVascular endothelial-cadherin、ならびに上記2-NBDGとR123の輸送に関わるGLUT1とP-gpの発現が認められた。しかし、これらの発現レベルは、トランスウェルモデルよりも明らかにhiMCS-BBBモデルで高かった。

以上の結果より、hiMCS-BBBモデルは基本的なBBB機能を有しており、さらにそれら機能に関わるタンパク質の発現量は従来のトランスウェル型BBBモデルよりも高いと考えられた。

そこで次に、hiMCS-BBBモデルを用いてRMTによる高分子薬物のBBB透過性を評価することが可能か明らかとするため、Tf-647および抗TfR抗体を用いた透過性試験をおこなった(図4)。まず、Tf-647のスフェロイド内移行を、RMTが機能する37および機能しない4の条件下にて解析したところ、37において4よりもスフェロイド内部蛍光が高く認められた。さらに、この蛍光値は、過剰量のTfの存在下では低下した(図4A)。したがって、Tf-647はTfRが介在するRMTを介してBBBを

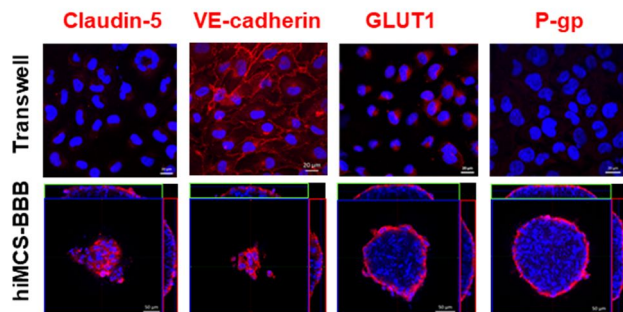


図3. hiMCS-BBBモデルのBBB機能関連タンパク質の発現解析.
細胞間結合に関わるClaudin-5とVE-cadherin、および代表的な
BBBトランスポーターであるGLUT1とP-gpの発現を免疫細胞
染色法により解析した. Transwellは比較として用いたトランス
ウェルBBBモデルを示す. 青はDAPIによる核染色を示す.

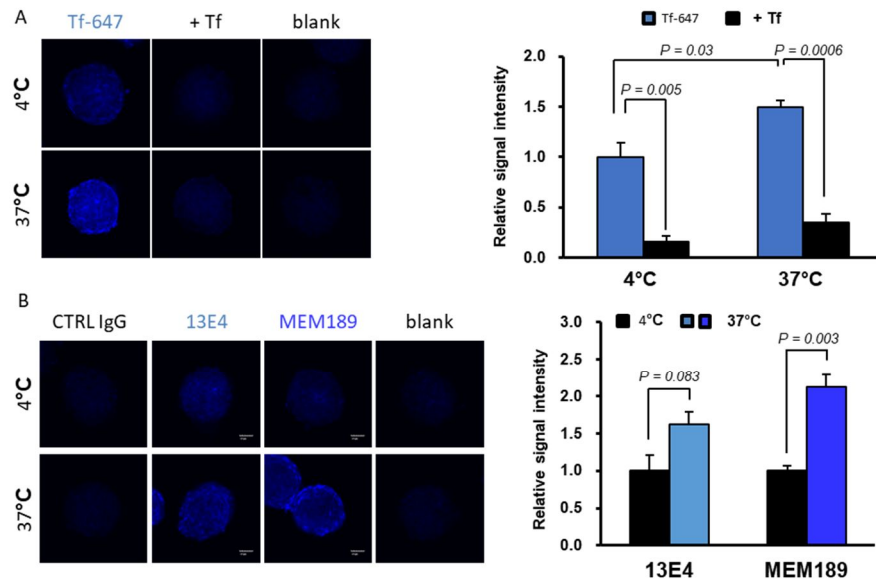


図4. hiMCS-BBBモデルにおけるトランスフェリンおよび抗トランスフェリン受容体抗体の透過性試験。A、蛍光標識トランスフェリン (Tf-647) を用い、37°Cまたは4°C、過剰量Tf(+Tf)存在下・非存在下の条件下にて、その取り込みを評価した。B、蛍光標識抗トランスフェリン受容体抗体 (MEM189、13E4)、およびコントロール IgGを用い、37°Cおよび4°Cの条件下にて、その取り込みを評価した。A、BではBlankはスフェロイドの自家蛍光を示す。スフェロイド内部の蛍光値を測定した結果を右の棒グラフに示す。統計解析は、Student-t検定により行った。

透過すると考えられた。

そこで次にBBB透過性の異なる2種類の抗TfR抗体 (BBB透過性: MEM189、BBB非透過性: 13E4) を用いて、それらのBBB透過性を評価した (図4B)。その結果、MEM189は13E4や対照として用いたControl IgGよりも高いBBB透過性を示した。

以上の結果から、hiMCS-BBBモデルでは少なくともTfRを介したRMTが機能しており、さらにTfRを標的とした高分子薬物のBBB透過性を評価出来ることが明らかとなった。

一方、創薬においては薬物の中枢毒性を評価するヒトモデルも必要とされている。中枢毒性評価における従来の主な対象細胞は神経細胞であるが、神経障害時にはBBB障害も観察されており、BBB機能障害に起因する中枢毒性にも注目しなくてはならない。そこで、hiMCS-BBBモデルが、BBB障害を再現することができるか、まず代表的な炎症性刺激を用いて解析した (図5)。その結果、炎症性サイトカインであるTNF- α の曝露下において、hiMCS-BBBモデルでは種々の炎症性因子の発現誘導が認められた (図5A)。さらに、同条件下においてヒト単球由来THP-1細胞を共存させると、THP-1のhiMCS-BBBモデルへのリクルートが観察された (図5B)。したがって、hiMCS-BBBモデルはBBB炎症を再現しうるということが明らかとなった。

以上、本研究では、生体BBBを高度に模倣する階層型スフェロイドBBBモデル (hiMCS-BBB) を構築した。本モデルは、細胞間結合能、取込みトランスポーター能、薬物排出トランスポーター能といった基本的なBBB機能を有していることが明らかとなった。さらにh

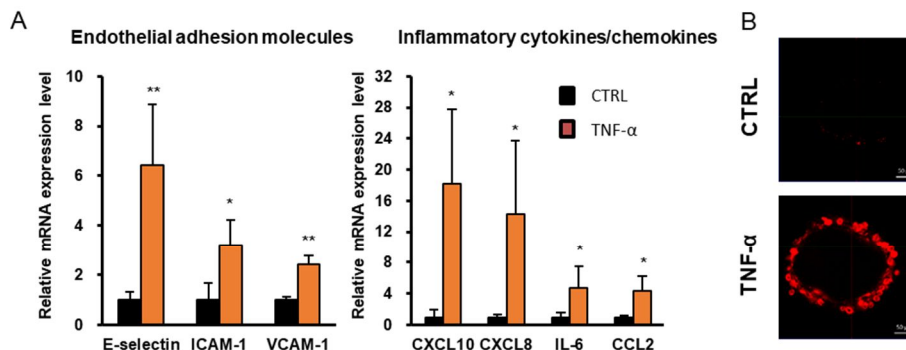


図5. hiMCS-BBBモデルの炎症応答。A、TNF- α (20 ng/mL)曝露下hiMCS-BBBモデルにおける炎症性因子のmRNA発現誘導をqPCRにより解析した。B、TNF- α 曝露下における、ヒト単球細胞THP-1のhiMCS-BBBモデルへのリクルートを解析した。赤はTHP-1を示す。

i M C S - B B BモデルにおけるB B B関連タンパク質の発現は従来B B Bモデルよりも高かったことから、h i M C S - B B Bモデルは、より高度なB B B研究に応用することが可能となると期待される。

その一環として、本研究ではh i M C S - B B Bモデルの高分子B B B透過性評価能の検証を行い、h i M C S - B B BモデルにおいてT f R介在性R M Tが機能し、T f Rを標的とした抗体のB B B透過性を的確に評価できることを明らかとした。一方、本研究では、h i M C S - B B Bモデルが炎症性サイトカインに応答すること、さらに免疫細胞存在下ではそれら細胞のB B Bへの遊走まで再現できることを明らかとした。

したがって、本研究で構築したh i M C S - B B Bモデルは、B B B突破技術開発に必要な高分子のB B B透過性評価、および炎症性反応に伴うB B B障害の評価に有用であると考えられる。本モデルは、創薬非臨床試験におけるこれら評価での活用を通じて、中枢薬開発の効果的・効率的な推進に資すると期待される。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitamura K, Umehara K, Ito R, Yamaura Y, Komori T, Morio H, Akita H, Furihata T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Development, Characterization and Potential Applications of a Multicellular Spheroidal Human Blood-Brain Barrier Model Integrating Three Conditionally Immortalized Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 984-991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00218.	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 Ito R, Morio H, Baba T, Sakaguchi Y, Wakayama N, Isogai R, Yamaura Y, Komori T, Furihata T.	4. 巻 -
2. 論文標題 In Vitro-In Vivo Correlation of Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs: A Feasibility Study Towards Development of Prediction Methods for Brain Drug Concentration in Humans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharm Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-022-03189-y.	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 Isogai R, Morio H, Okamoto A, Kitamura K, Furihata T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of a Human Conditionally Immortalized Cell-based Multicellular Spheroidal Blood-Brain Barrier Model for Permeability Evaluation of Macromolecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-Protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南部礼美、北村啓太、梅原健太、伊藤涼、山浦由之、小森高文、秋田英万、降幡知巳
2. 発表標題 血液脳関門の生理学的・病態生理学的分子機序解析を可能とする階層スフェロイド型ヒト血液脳関門モデル
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 降幡知巳
2. 発表標題 中枢作用薬開発を促進する条件的不死化細胞と生体模倣によるヒト血液脳関門モデル
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅原健太、和泉沙希、若山直美、小森高文、伊藤涼、布谷憲一、山浦由之、今若治夫、秋田英万、降幡知巳
2. 発表標題 ヒト血液脳関門機能解析に有用な新規ヒト不死化細胞血液脳関門スフェロイドモデル
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Umehara K, Izumi S, Wakayama N, Komori T, Ito R, Nunoya K, Yamaura Y, Imawaka H, Anzai N, Akita H, Furihata T
2. 発表標題 Development of a human immortalized cell-based multicellular spheroidal blood-brain barrier model: A promising platform for evaluation of permeability of various drugs.
3. 学会等名 13th Cerebral Vascular Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitamura K, Okamoto A, Ito R, Yamaura Y, Komori T, Morio H, Furihata T.
2. 発表標題 ヒト不死化血液脳関門スフェロイドモデルは受容体介在性トランスサイトーシスによる高分子医薬品の脳移行性評価に有用である
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 彩花、北村 啓太、森尾 花恵、伊藤 涼、山浦 由之、小森 高文、大槻 純男、伊藤 慎悟、降幡 知巳
2. 発表標題 高分子医薬品の脳移行性評価に有用なヒト不死化血液脳関門スフェロイド モデルの開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森尾花恵、北村啓太、岡本彩花、伊藤涼、若山直美、山浦由之、小森高文、降幡知巳
2. 発表標題 新たな中枢薬開発基盤技術としてのヒト階層型血液脳関門スフェロイド
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヒト条件的不死化細胞を用いた血液脳関門モデルおよびその製造方法	発明者 降幡知巳、梅原健太、北村啓太、秋田英万、安西尚彦	権利者 東京薬科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-065670	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ヒト不死化細胞を用いた階層型スフェロイド血液脳関門モデルおよびその製造方法	発明者 降幡知巳、梅原健太、北村啓太、秋田英万、安西尚彦	権利者 学校法人 東京薬科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-7041	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>人工的にヒトを創る！？薬の開発を変えるミニ臓器 https://www.toyaku.ac.jp/research/advanced/20200611-3845.html 東京薬科大学 薬学部 個別化薬物治療学教室 https://www.ps.toyaku.ac.jp/rinshoyakugaku/</p>

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	小島 伸彦 (Kojima Nobuhiko) (90342956)	横浜市立大学・理学部・准教授 (22701)	

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			
ドイツ	Saarland University			
米国	SBP Medical Discovery Institute			
ポーランド	Medical University of Gdańsk			