

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590153

研究課題名（和文）ミクログリアを利用した脳内特異的 DDS の開発

研究課題名（英文）Development of brain specific drug delivery system with microglia

研究代表者

前田 智司 (MAEDA TOMOJI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60303294

研究成果の概要(和文):本研究はミクログリアの脳への選択的移行特性機構の解明を目的とし、ミクログリアの血液脳関門移行における走化性因子の影響を検討した。ミクログリアの走化性因子の1つとして報告されている ATP について構築したアッセイ系での最適濃度および時間について検討を行った。この条件をもとに、ATP 以外のヌクレオチドについても検討を行い、TTP および CTP がミクログリアの走化性に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): In this study, we investigated the possibility whether microglia can be used for brain-targeting drug delivery system, since it was reported that microglia is able to enter the brain from blood flow. At first, we studied the effect of nucleotides on the migration of microglia in our assay system. We found that adenosine triphosphate (ATP), thymidine triphosphate (TTP) and cytidine triphosphate (CTP) induced the migration of microglia.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：ミクログリア、ドラッグデリバリーシステム、トランスポーター

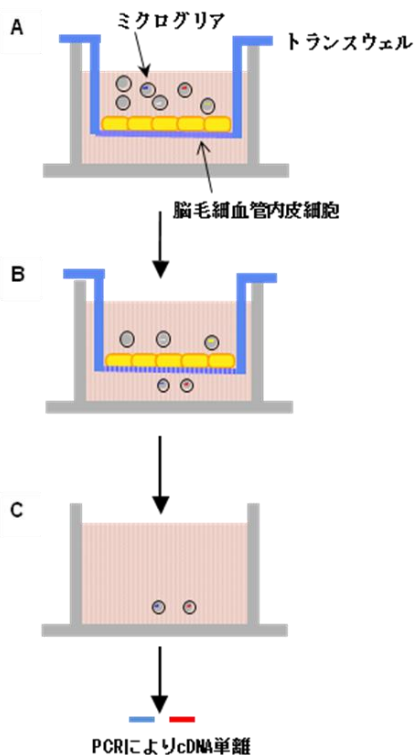
## 1. 研究開始当初の背景

脳には血液脳関門 (BBB: blood-brain barrier) があるため、末梢からの物質や細胞の浸潤がほとんどなく、脳への薬物や遺伝子導入は容易ではない。脳疾患を治療する為には有効な薬物や生理活性物質を導入する必要があるが、脳に特異的な物質移送システム

の開発には国内外多くの研究者が取り組んでいるにもかかわらず成功していない。近年、末梢血管に注入されたミクログリアは、末梢から BBB を通過して脳へ選択的に移行することが報告され、ミクログリアを利用した脳内特異的ドラッグデリバリーシステムの開発が試みられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞やリボソームを使った脳内への有効なドラッグデリバリーシステム開発への応用を目指し、ミクログリアが持つ血液脳関門(BBB: blood-brain barrier)移行に関わる分子の同定および解析を行う。ミクログリアはマクロファージ様の性質を持つ中枢神経系細胞で、脳内の免疫担当細胞として知られている。興味深いことに、末梢血管に注入されたミクログリアは BBB を通過し、脳内に選択的に移行することが明らかとなっている。マクロファージやリンパ球には、このような脳選択的な移行を認められていない。したがって、ミクログリアは、特異的に BBB を通過するための分子機構を持っていると思われるが、その機構は、現在、全く不明である。本研究では、BBB を構成している内皮細胞層を *in vitro* でミクログリアが通過する系を用いた独自の方法により、これに関与する分子の同定および解析を行う。この研究成果は、脳内への細胞移行の分子機構がはじめて明らかになるばかりでなく、同定した分子を組み込んだリボソームやこの分子を高発現させた細胞を用いて、必要な薬物や神経栄養因子を脳内に選択的に効率よく導入する脳内特異的ドラッグデリバリーシステムの開発という先端医療への応用が期待されるものである。



## 3. 研究の方法

### 1) ミクログリアの持つ BBB 通過機能に関する分子実体の解明

① 効率よく BBB を透過するラット由来株化ミクログリア細胞 Ra2 の mRNA より、cDNA ライブラリーは作成済みである。この cDNA ライブラリーを BBB 透過性の低い市販されているミクログリア細胞内にレトロウイルスによる感染により短時間で安定に導入する。レトロウイルスベクターには、ピューロマシリン耐性遺伝子を付加したものを使用する。

② 感染したミクログリア細胞から、*in vitro* trans-migration アッセイ (図参照) により、BBB の構成細胞である脳毛際血管内皮細胞 (株化したものを使用) を通過する細胞を同定する。図に示したように、脳毛際血管内皮細胞を、あらかじめトランスウエルの上部チャンバーのメンブレン上に confluent に増殖させておき、この上部チャンバーに①の細胞を共培養する (各ウェルのミクログリア細胞数は、 $10^3$  以下になるよう調製する。詳細な根拠は省略)。下部チャンバーの培養液には、細胞移動を容易にするため、必要に応じて、ミクログリアの化学走化物質である ATP を添加する。12-24 時間培養後 (*in vitro* の系で、Ra2 細胞の transmigration に要する時間)、上部チャンバーを取り除く (図 A, B)。

③ 下部チャンバーをピューロマシリンで二日処理し、cDNA を持った細胞だけをセクションする。次に移動したミクログリア細胞中にある cDNA を、ベクター由来のプライマーを使い PCR で単離する (図 C)。

④ ①で用いた親株の細胞に、再度、単離 cDNA を導入し、*in vitro* の transmigration 系で活性の確認をする。また、実際に cDNA を導入した細胞をマウスの血管内に注射して、脳選択的に移行する活性が促進されているかを確認する。細胞は追跡できるよう蛍光蛋白 GFP を発現しておく。

⑤ 活性が確認された cDNA の塩基配列を決定し、どのような蛋白をコードしているかを解析する。また、蛋白の発現する細胞、組織および細胞内での局在を明らかにし、いつ、どのように脳選択的な細胞移行に関与する分子であるのか詳細な解析を行う。

### 2) トランスポーターの発現プロファイリング

キャリアー候補のミクログリアについてはどのような (薬物を含めた) 物質の取り込み機構および排出機構が存在しているかにつ

いての情報はほとんどない。そこで、脳でのエネルギー源であるグルコースや神経伝達物質等の取り込み機構や排出機構についてトランスポーターを中心に解析を行う。具体的には、低分子物質、アミノ酸、核酸、ビタミン等はそのもの自信が治療薬や栄養剤となり、また、核酸(ATP や UDP)はミクログリアの化学走性物質であり、ミクログリアの増殖・分化には必須と考えられる。そこで、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築を考えた場合、まずこれら低分子物質のDDSの開発が基盤となると考えているので、これら低分子物質に関わるトランスポーターの発現プロファイリングを中心に行う。さらに、排出側に関与するトランスポーターについて網羅的に発現プロファイリングを行う。トランスポーター発現プロファイリングには効率化と発展性を考慮し、DNAチップによるアプローチで行う。

### 3)トランスポーターの機能解析

上記2で発現が確認された低分子物質の細胞内輸送に関わるトランスポーターおよび排出に関わるトランスポーター活性をそれぞれのトランスポーターに特異的な基質や阻害剤を用いて膜輸送活性測定によって検討する。

### 4)ミクログリア以外の骨髄由来の BBB 通過機能を保持する細胞の探索および構築

ミクログリアのほとんどが脳内にいるため、実際に DDS にミクログリアを使用する場合はミクログリアを骨髄幹細胞から誘導するか、脳内から回収するしかない。そこで、骨髄由来で BBB 通過能を有する細胞を探索および、上記1で同定された分子を利用し BBB 通過機能を保持する細胞の構築を検討する。最終的にはミクログリアの BBB 通過機能および物質の取り込み機構および排出機構の2つの解析結果をもとに脳内特異的 DDS の開発を行う。

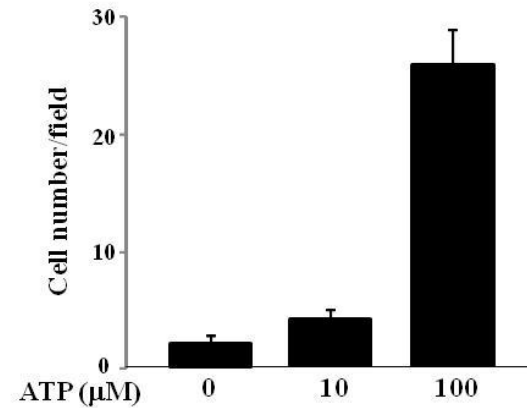
## 4. 研究成果

### 1)ミクログリアの持つ BBB 通過機能に関与する分子実体の解明

構築したアッセイ系を用いて BBB 通過機能に関与する分子のクローニングを数回行った。しかしながら、予想より BBB の構成細胞である脳毛際血管内皮細胞を通過する細胞が少なかった。そこで、ミクログリアの化学走性物質である ATP の添加濃度の検討を行った。0, 10, 100  $\mu\text{M}$  の ATP を下部チャンバーに加え、上部から下部に移動したミクログリア数を測定した。その結果、濃度依存的に脳毛際血管内皮細胞を通過するミクログリア数が増加した(図1)。また、ATP 以外のヌクレオチドについても検討を行い、TTP および

CTP がミクログリアの走化性に影響を与える可能性が示唆された。今後、TTP および CTP についても濃度依存性の検討を行う予定である。

図1 ミクログリアの遊走性に対する ATP の影響



さらに、Green Fluorescent Protein (GFP) をミクログリアに導入し、ミクログリアが脳毛際血管内皮細胞を通過観察できる系を確立した。今後、この系を用いてミクログリアが脳毛際血管内皮細胞を通過する際に transcellular ルートまたは paracellular ルートのどちらを主な移動経路として用いているかなどの解析を行っていく予定である。

### 2)トランスポーターの発現プロファイリング

ミクログリア(Ra2 細胞)、および脳毛際血管内皮細胞(MBEC 細胞)を用いて DNA マイクロアレイを行った。その結果、物質の取り込みに関わるトランスポーターの種類としては Ra2 細胞と MBEC 細胞で共通してミトコンドリアで ATP 産生に関与するトランスポーターファミリーが高い発現量であった。さらに、糖ヌクレオチドトランスポーター、アミノ酸トランスポーターおよび亜鉛トランスポーターファミリーも高い発現量であった。排出に関わるトランスポーターについても Ra2 細胞と MBEC 細胞で共通して、Abcb, Abcc, Abcd, Abcf および Abcf ファミリーが高い発現量であった。さらに、ATP を Ra2 細胞および MBEC 細胞に添加し、発現量の変動するトランスポーターの探索を行った。その結果、Ra2 細胞では、核酸塩基トランスポーター、ナトリウム依存性クエン酸トランスポーター、小胞膜モノアミノトランスポーターおよび  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体の発現量が ATP の添加により2倍以上に上昇し、モノカルボン酸トランスポーターおよびナトリウム依存性リン酸トランスポーターの発現量は0.5倍以下に減少した(表1, 2)。

**表 1 ATP 添加により発現が 2 倍以上増加したトランスポーター (Ra2 細胞)**

Gene Name	Protein Name	Ratio (ATP(-)/ATP(+))
Slc9a3	NHE3	2.21
Slc13a5	NACT	2.12
Slc18a2	SVMT	2.23
Slc23a3	SVCT3	2.88

**表 2 ATP 添加により発現が半分以下に減少したトランスポーター (Ra2 細胞)**

Gene Name	Protein Name	Ratio (ATP(-)/ATP(+))
Slc16a14	MCT14	0.48
Slc17a1	NPT1	0.30
Slc34a1	NPT2	0.23

また、MBEC 細胞では、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体の発現量が ATP の添加により 2 倍以上上昇し、カリウム依存性 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体、グルタミン酸トランスポーター、ナトリウム依存性 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体および尿素トランスポーターの発現量は 0.5 倍以下に減少した (表 3, 4)。一方、ATP の添加により排出に関わるトランスポーターの発現量が 2 倍以上変動するものは観察されなかった。

**表 3 ATP 添加により発現が 2 倍以上増加したトランスポーター (MBEC 細胞)**

Gene Name	Protein Name	Ratio (ATP(-)/ATP(+))
Slc8a2	NCX2	2.38

**表 4 ATP 添加により発現が半分以下に減少したトランスポーター (MBEC 細胞)**

Gene Name	Protein Name	Ratio (ATP(-)/ATP(+))
Slc1a3	EAAT1	0.46
Slc9a4	NHE4	0.37
Slc14a1	UT1	0.48
Slc17a6	DNPI	0.37
Slc24a1	NCKX1	0.47
Slc25a18	GC2	0.47

また、DNA マイクロアレイの結果をもとにパスウェイ解析を行った。その結果、Ra2 細胞に ATP を添加した場合は、アクチンフィラメント形成に関わる遺伝子の発現量が増加しており、一方、脳毛際血管内皮細胞である MBEC 細胞では、アクチンフィラメント形成に関わる遺伝子の発現量が減少していた。これらの結果は、ATP 添加によりミクログリアおよび脳毛際血管内皮細胞の両細胞内で変化が生じミクログリアの移行性が増加したと予想された。今後、アクチンフィラメント形成と関連付けながらミクログリアの移行性について解析を行っていく予定である。

### 3) トランスポーターの機能解析

2 の発現プロファイルの結果から、糖ヌクレオチドトランスポーター、アミノ酸トランスポーターおよびリン酸トランスポーターに着目して、今後機能解析を行っていく予定である。

### 4) ミクログリア以外の骨髄由来の BBB 通過機能を保持する細胞の探索および構築

DNA マイクロアレイの実験結果から ATP 添加により Ra2 および MBEC 細胞でアクチンフィラメント形成に関わる遺伝子の発現変動が生じることが観察された。興味深い事に、Ra2 細胞では、ATP 添加によりアクチンフィラメント形成に関わる遺伝子の発現が上昇していた。一方、MBEC 細胞では発現が抑制されていた。今後、アクチンフィラメント形成とミクログリアの走化性について詳細に検討を行っていく予定である。さらに、骨髄由来の他の細胞においても同様の変化が生じているのか解析を行う予定である。

### 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 1 件)

Tomoji Maeda, Masanori Irokawa, Hiroshi Arakawa, Erika Kuraoka, Takashi Nozawa, Ryoko Tateoka, Yoshiharu Itoh, Takeo Nakaishi, Ikumi Tamai, Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122: 180-185, 2010. 査読 有

〔学会発表〕 (計 1 件)

Takeo Nakaishi, Tomoji Maeda, Masanori Irokawa, Hiroshi Arakawa, Erika Kuraoka, Takashi Nozawa, Ryoko Tateoka, Yoshiharu Itoh, Ikumi Tamai, Uptake transporter organic anion transporting polypeptide

1B3 contributes to the growth of  
estrogen-dependent breast cancer, 第6回  
国際ホルモン依存性癌シンポジウム  
2010年9月14日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 智司 (Maeda Tomoji)  
岩手医科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60303294

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

駒野 宏人 (Komano Hiroto )  
岩手医科大学・薬学部・教授  
研究者番号：40170378