

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689005

研究課題名(和文) 血液脳関門ヘミチャネルの病態生理学的役割と分子標的診断・治療

研究課題名(英文) Pathophysiological role of the blood-brain barrier hemichannels and molecular-targeted diagnosis and therapy

研究代表者

立川 正憲 (TACHIKAWA, MASANORI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00401810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円、(間接経費) 5,850,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト血液脳関門(Blood-brain barrier, BBB)のin vitroモデル細胞とタンパク質絶対定量法を用いて、仮説「急性期の虚血病態時におけるBBBの未知の機能変動機構として、特定の環境下でのみ開口するヘミチャネルが関与する」を実証した。本研究結果によって、BBBに発現するヘミチャネルを分子標的とした病態時BBBの輸送機能変動を回避する戦略の分子基盤構築に突破口を開いた。

研究成果の概要(英文)：The present findings have established the new concept that specific subtypes of hemichannels, i.e., pannexin 1 and connexin 43, at the human blood-brain barrier (BBB) make a significant contribution to the dysfunction of the BBB transport system under acute ischemic conditions. This could raise the potential of the BBB hemichannels as a therapeutic target for brain ischemic damage exaggeration.

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：ヘミチャネル 脳毛細血管内皮細胞 パネキシン コネキシン 輸送 血液脳関門

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は、我が国の死因の第3位及び後遺症による要介護原因の第1位を占め、その大部分は脳梗塞によるものである。脳梗塞治療は時間との闘いであり、一刻も早く梗塞部位の血流を再開させなければならない。しかし、脳虚血に続く、血流再開の治療方策は、血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) の機能変化による中枢障害拡大のリスクが常に付きまとう。急性期の脳虚血において血液脳関門の破綻状況を予測することは極めて重要であるが、現状では、CTやMRI等の画像診断に基づく医師の経験に依存しているのが現状であり、それを客観的に診断し回避する方法はない。従って、脳虚血の急性期において「血液脳関門の機能変化を回避する方法」の分子基盤を構築することが急務である。

近年の機能ゲノミクス研究から、BBBは、脳毛細血管内皮細胞が密着結合で連結し、トランスポーターを主体とする多様な輸送系を発現させることによって、中枢支援・防御の役割を担うダイナミックインターフェースであるとの概念が確立された。一方で、脳梗塞など急性期虚血の病態で見られる、急激なBBB輸送機能の変動は、単に密着結合の崩壊やトランスポーターの機能変動だけでは説明することができない。従って、BBB輸送系の未知の変動機構を解明することは、中枢障害拡大の回避方法を確立する上で重要である。そこで、本研究では「特定の条件下において開口する特性を有するヘミチャネルが未知のBBB輸送機能変動因子として寄与している」との作業仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究背景に示した「BBBヘミチャネル開口仮説」を実証し、BBBに発現するヘミチャネル分子を定量的に解明することによって、急性期の虚血病態におけるBBB輸送機能の変動回避法の分子基盤を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

BBB輸送変動機構におけるヘミチャネルの役割を解明するため、*in vitro* BBBモデルとして条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB細胞) 及びヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3細胞) を用い、ヘミチャネルの基質として汎用されている sulforhodamine 101 及び propidium iodide などのアニオン性及びカチオン性蛍光物質をプローブとして、輸送速度論に基づく取り込み解析を行った。急性期の虚血病態では細胞外カルシウム濃度が著しく低下することが報告されていることから、*in vitro* BBB急性病態モデルとして、細胞外カルシウムの非存在下条件で輸送解析を行った。ヘミチャネルサブタイプの mRNA 発現解析は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて行った。ヘミチャネル絶対

発現量の一斉決定には、液体クロマトグラフィー-質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた標的定量プロテオミクスの手法 (Uchida and Tachikawa et al., *Fluids Barriers CNS*, 10(1):21, 2013) を応用し、定量標的ペプチドを連結して人工合成したりコンビナントタンパク質又は個々に化学合成したペプチドを内部標準として用いて、ヒト及びマウスヘミチャネルタンパク質 (パネキシン Px、コネキシン Cx) の一斉定量系を独自に構築した。Px 及び Cx ファミリーの各分子について、新たに構築した標的定量プロテオミクスを用いて、組織細胞の粗膜画分または細胞膜画分における検出及び定量を行った。ヘミチャネル輸送評価系の構築には、HEK293細胞に各ヘミチャネルサブタイプ及びチャネル開口スイッチとなる分子の cDNA 発現ベクターをトランスフェクションし、発現量の高い安定発現株を標的絶対定量プロテオミクスを用いて選択した。

### 4. 研究成果

(1) げっ歯類脳毛細血管内皮細胞におけるヘミチャネルサブタイプの mRNA 発現プロファイルの解明と機能的関与

ヘミチャネルは、ホモ又はヘテロ多量体を形成して機能することから、脳毛細血管内皮細胞に発現するヘミチャネルのサブタイプを明らかにする必要がある。高純度で調整したマウス脳毛細血管及び条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB細胞) を用いた RT-PCR 解析の結果、パネキシン 1、パネキシン 2、コネキシン 26、コネキシン 30、コネキシン 43、コネキシン 45 の各サブタイプ mRNA が検出された。さらに、95% 窒素を通気させたグルコース枯渇バッファーを用いて、ヘミチャネル開口の指標である蛍光色素 sulforhodamine-101 の、ラット脳毛細血管内皮細胞株への取り込みを解析した結果、通常条件と比較して、蛍光色素の取り込みが増強され、ヘミチャネル阻害剤によって、その増強は阻害された。以上の結果から、脳血管内皮細胞には多様なヘミチャネルサブタイプが少なくとも mRNA レベルで発現し、急性病態時の BBB 輸送変動機構として、ヘミチャネル開口が関与していることが示唆された。

(2) 脳血管内皮細胞の輸送体系変化におけるヘミチャネル開口制御因子の解明

ヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3細胞) におけるアニオン性及びカチオン性蛍光プローブ (sulforhodamine 101、propidium iodide など) の取り込み輸送は、急性期の脳虚血環境を模擬した、細胞外カルシウムイオンの非存在条件において、コントロールと比較して、時間依存的に有意に増加した。その取り込みは、細胞外カルシウム濃度の低下とともに増加し、基質濃度に対して飽和性が示された。Sulforhodamine 101 の取り込みの増加は、内因性情報伝達物質や種々のアミノ酸

及び、ヘミチャネルの阻害剤であるカルベノキソロン及び 2-aminoethoxy-diphenyl borate によって有意に阻害された。蛍光プローブの排出輸送についても、細胞外カルシウム非存在下において有意な増加が示され、ヘミチャネル阻害剤で阻害が示された。RT-PCR 解析の結果、hCMEC/D3 細胞においてパネキシン 1 及びコネキシン 43 の mRNA 発現が検出された。以上の結果から、脳血管内皮細胞におけるヘミチャネル開口制御因子として、カルシウムイオンが関与することが示唆された。さらに、脳虚血時におけるイオンホメオスタシスの破綻に伴って、脳毛細血管内皮細胞のヘミチャネルが開口し、情報伝達物質を含めたさまざまな物質の輸送体系を急激に変化させている可能性が示された。

### (3) ヒト脳毛細血管内皮細胞の輸送機能変動機構におけるヘミチャネルサブタイプの寄与

ヘミチャネル多量体のストイキオメトリを定量的に解明するため、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)解析を実施し、ヒト脳毛細血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)におけるヘミチャネルタンパク質のサブタイプ発現量を決定した。その結果、hCMEC/D3 細胞の細胞膜には、パネキシン 1 及びコネキシン 43 がタンパク質レベルで発現することが示された。これらのサブタイプに特異的な siRNA を用いて特異的にノックダウンした hCMEC/D3 細胞へのヘミチャネル蛍光基質プローブの取り込みは、細胞外のカルシウムイオン非存在下のヘミチャネル開口条件において、ネガティブコントロールと比較して有意に低下した。従って、QTAP で同定したヘミチャネルサブタイプが、ヒト血液脳関門輸送系の変動機構として寄与することが示された。さらに、ヘミチャネルサブタイプの部分配列の化学合成したペプチドの中から、hCMEC/D3 細胞においてヘミチャネル開口を抑制するペプチドを同定した。以上の結果から、脳血管内皮細胞ヘミチャネルの機能阻害が、急性病態時における血液脳関門輸送系の変動を回避するための分子標的薬として有用である可能性が提示された。

### (4) ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるヘミチャネル開口抑制機構の解明

ヒト脳毛細血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)を用いて、細胞外カルシウム非存在条件下のヘミチャネル開口に対して阻害活性を有する、低分子量の臨床承認薬及び古典的ヘミチャネル阻害剤と構造が類似する内因性物質の探索を行った。化合物スクリーニングの結果、イオンチャネルを薬効分子標的とする複数の臨床承認薬及びステロイドホルモンを、ヘミチャネル開口抑制化合物として同定した。同定した臨床承認薬及びステロイドホルモンは、*in vivo* 虚血動物モデルにおい

て脳梗塞障害部位の縮小効果が報告されていた。さらに、パネキシンヘミチャネル Px1/Px2 遺伝子欠損マウスでは、虚血後の脳機能障害を軽減したことが報告された(*Channels* 6:453-456, 2012)ことから、脳保護効果の分子機構の一つとして BBB ヘミチャネルの開口阻害が有効であることが支持された。本研究成果から、急性の虚血性脳障害に対する脳保護戦略の一つとして、BBB のヘミチャネル開口活性の抑制機構が提示された。

### (5) ヘミチャネルを介した物質輸送評価系の構築と輸送機能解明

hCMEC/D3 細胞に発現するヘミチャネルサブタイプごとの物質輸送機構を解明するため、HEK293 安定発現株を構築した。各ヘミチャネル分子の単独発現株では蛍光基質プローブの透過が検出されないことが示され、開口刺激スイッチの共発現によってはじめて、ヘミチャネルを介した物質透過の制御機構が解明された。さらに、構築したヘミチャネル介在型輸送評価系を用いて、ヘミチャネルサブタイプの基質認識性を解明した。従来のヘミチャネル研究は、ヘミチャネルが非特異的 pore であるという固定概念のもと、イメージングの手法を用いた蛍光物質の定性的な細胞間伝播機構の解析や電気生理学的解析が中心であった。基質特異性や輸送速度を解明し、ヒト薬物動態の定量的予測を目標として発展してきたトランスポーター研究とは対照的であった。本研究成果から、物質輸送担体としてのヘミチャネルの位置付けが提唱された。

### (6) BBB ヘミチャネルの病態生理学的役割と分子標的診断・治療への応用性

ヒト脳毛細血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)を用いた輸送解析から、急性期の脳虚血病態で見られる細胞外カルシウムの低下に伴う BBB 輸送機能変動の分子機構として、2 つのヘミチャネル Px1 及び Cx43 の寄与が示唆された。従って、ヘミチャネルは、急性病態時におけるヒト BBB 輸送機能変動因子の一つとして位置付けられると考えられる。以上から、ヒト BBB に発現する Px1 及び Cx43 の阻害を標的とした、虚血性脳障害の回避法は、従来とは全く異なる概念であり本研究で見出された知見に基づく新しい創薬研究開発戦略を提示するものである。

## 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 18 件)

Ohtsuki S, Hirayama M, Ito S, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T, Quantitative targeted proteomics for understanding the blood-brain barrier: towards

pharmacoproteomics. *Expert Rev Proteomics*, 査読有, *in press*, 2014

DOI: 10.1586/14789450.2014.893830

Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T, A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS*, 査読有, 10(1):21, 2013

Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Inoue T, Ohtsuki S, Terasaki T, Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors and tight junction proteins in rats and common marmoset. *J Pharm Sci*, 査読有, 102:3343-55, 2013

Ohtsuki S, Ikeda C, Uchida Y, Sakamoto Y, Miller F, Glacial F, Decleves X, Schermann JM, Couraud PO, Kubo Y, Tachikawa M, Terasaki T, Quantitative Targeted Absolute Proteomic Analysis of Transporters, Receptors and Junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-Brain Barrier Model. *Mol Pharm*, 査読有, 10:289-296, 2013

内田康雄、立川正憲、星裕太郎、寺崎哲也、血液脳関門トランスポートソームの定量的絶対発現プロファイル：動物種間，系統間，野生型-遺伝子欠損マウス間の相違性と類似性、*脳 21*、査読無、16:46-52、2013

立川正憲、内田康雄、寺崎哲也、動的インターフェースとしての脳関門輸送システムと脳関門生理学・創薬研究、*BRAIN and NERVE*、査読無、65:121-137、2013

立川正憲、内田康雄、寺崎哲也、標的絶対定量プロテオミクスが拓くヒト血液脳関門輸送機能研究、*Drug Delivery System*、査読無、28:270-278、2013

Tachikawa M, Ozeki G, Higuchi T, Akanuma S, Tsuji K, Hosoya K, Role of the blood-cerebrospinal fluid barrier transporter as a cerebral clearance system for prostaglandin E<sub>2</sub> produced in the brain. *J Neurochem*, 査読有, 12:750-760, 2012

Tachikawa M, Tsuji K, Yokoyama R, Higuchi T, Ozeki G, Yashiki A, Akanuma S, Hayashi K, Nishiura A, Hosoya K, A clearance system for prostaglandin D<sub>2</sub>, a sleep-promoting factor, in the cerebrospinal fluid: role of the blood-cerebrospinal barrier transporters. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 343: 608-616, 2012

Hosoya K, Tomi M, Tachikawa M, Strategies for therapy of retinal diseases

using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Deliv*, 査読有, 8:1571-1587, 2011

Hosoya K, Tachikawa M, Roles of organic anion/cation transporters at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers involving uremic toxins. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 15:478-485, 2011

Tachikawa M, Murakami K, Martin P, Hosoya K, Ganapathy V, Retinal transfer of nicotinate by H<sup>+</sup>-monocarboxylate transporter at the inner blood-retinal barrier. *Microvas Res*, 査読有, 82:385-390, 2011

Fujiyoshi M, Tachikawa M, Ohtsuki S, Ito S, Uchida Y, Akanuma S, Kamiie J, Hashimoto T, Hosoya K, Iwatsubo T, Terasaki T, Amyloid- $\beta$  peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neurochem*, 査読有, 118:407-415, 2011

Tachikawa M, Okamoto M, Hirose S, Yoneyama D, Akanuma S, Terasaki T, Hosoya K, The Inner Blood-Retinal Barrier Mediates L-Isomer-Predominant Transport of Serine. *J Pharm Sci*, 査読有, 100:3892-903, 2011

立川正憲、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也、定量的絶対標的プロテオミクスに基づくヒト血液脳関門におけるトランスポートの発現と生理機能、*脳 21*、査読無、14:42-48、2011

Hosoya K, Yamamoto A, Akanuma S, Tachikawa M, Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. *Pharm Res*, 査読有, 27:2715-2724, 2010

Tachikawa M, Hosoya K, Transport characteristics of guanidino compounds at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier: relevance to neural disorders. *Fluids Barriers CNS*, 査読有, 8:13, 2011

Yahara T, Tachikawa M, Akanuma S, Hosoya K, Hypertonicity Enhances GABA Uptake by Cultured Rat Retinal Capillary Endothelial Cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, 査読有, 25:611-615, 2011

〔学会発表〕(計19件)

立川正憲、金子洋介、赤荻諒、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也、血液脳関門へミチャネルの病態生理学的役割と中枢疾患治療標的としての可能性、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本

Tachikawa M, Pharmacological impact of the brain barrier prostaglandin transport.

20th Annual Blood-Brain Barrier Consortium Meeting, 2014年3月21日, Sunriver, USA

立川正憲、血液脳関門輸送機能変動因子としてのヘミチャネル、第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2013年11月22日、東京

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Pathophysiological impact and characteristics of pannexin and connexin hemichannels-mediated transport at the blood-brain barrier. 日本薬物動態学会第28年会, 2013年10月11日, 東京

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Role of pannexin and connexin hemichannels in the pathological human blood-brain barrier transport. 10th International ISSX Meeting, 2013年9月30日, Toronto, Canada

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Application of quantitative targeted proteomics to the human blood-brain barrier hemichannel research. International Gap Junction Conference 2013, 2013年7月16日, Charleston, USA

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Impact of pannexin and connexin hemichannels on the human blood-brain barrier transport: An application of quantitative targeted proteomics. 10th international conference on Cerebral Vascular Biology, 2013年6月18-21日, Montreal, Canada

立川正憲、金子洋介、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也、標的プロテオミクスに基づくヘミチャネルファミリーの生体内定量的分布と機能、日本薬剤学会第28年会、2013年05月25日、名古屋

立川正憲、金子洋介、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也、標的プロテオミクスに基づく組織細胞特異的ヘミチャネル発現プロファイルの構築、日本薬学会第133年会、2013年3月28日、横浜

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Ohtsuki S, Couraud PO, Terasaki T, Functional expression of pannexin and connexin hemichannels at the human blood-brain barrier. 日本薬物動態学会第27年会, 2012年11月20日, 千葉

Akanuma S, Murakami K, Tachikawa M, Kubo Y, Hosoya K, Profile of hemichannels mRNA expression at the blood-brain and inner blood-retinal barriers in mice. 日本薬物動態学会第27年会, 2012年11月20日, 千葉

立川正憲、金子洋介、内田康雄、寺崎哲也、ヘミチャネルファミリーを標的とした定量プロテオミクス、日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森

Tachikawa M, Kaneko Y, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Pathophysiological impact of hemichannels on the blood-brain barrier transport. Fifteenth International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, 2012年9月15日, Potsdam-Sanssouci, Germany

Tachikawa M, Proteomics-based technology as a new path to toxicological evaluation. 2012 International Symposium on Green Toxicology & Technology: Prediction of Kidney Toxicity, 2012年9月7日, Seoul, South Korea

村上晃路、立川正憲、赤沼伸乙、久保義行、細谷健一、脳及び網膜毛細血管内皮細胞におけるヘミチャネル分子のmRNA発現解析、2012年3月30日、札幌

金子洋介、立川正憲、寺崎哲也、Targeted proteomics for pannexin and connexin hemichannels in human brain capillary endothelial cells、第2回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2012年3月3-4日、新潟

立川正憲、村上晃路、赤沼伸乙、細谷健一、Functional expression of pannexin and connexin hemichannels at the blood-brain barrier and inner blood-retinal barrier in rodents、第2回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2012年3月3-4日、新潟

立川正憲、グアニジノ化合物のトランスポーターと脳関門輸送、第32回グアニジノ化合物研究会、2011年10月29日、酒田

立川正憲、細谷健一、「脳関門-神経-グリア」機能的ネットワークにおけるトランスポーターの役割、第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010年11月30日、富山

〔図書〕(計3件)

Tachikawa M, Uchida Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Recent progress in the blood-brain barrier and the blood-CSF barrier transport research: Pharmaceutical relevance of drug delivery to the brain. Drug Delivery to the Brain-Physiological Concepts, Methodologies and Approaches, Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, and Thorne R (Ed), Springer, New York, 2014, pp23-62

Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T, Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: a new research field opened up by quantitative targeted absolute proteomics (QTAP). Drug Delivery to the Brain-Physiological Concepts, Methodologies and Approaches, Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, and Thorne R (Ed), Springer, New York, 2014, pp63-100

Tachikawa M, Ganapathy V, Hosoya K, Systemic route for retinal drug delivery: role of the blood-retinal barrier transporters. Drug Product Development for the Back of the Eye, Kompella U. B. and Edelhauser H. F. (Ed), American Association of Pharmaceutical Scientists, Press-Springer, New York, 2011, pp 85-109

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立川 正憲 (TACHIKAWA, MASANORI)  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：00401810

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：