

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670067

研究課題名(和文)血液脳関門輸送機能賦活化による認知症予防

研究課題名(英文) Retrieval of blood-brain barrier transport function towards dementia prevention

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)を介した認知症防御物質の供給輸送機構及び病態によって質的量的に変化するBBB機能の分子機構を解明することによって、認知症予防に向けた学術的な基盤を構築することを目的とした。具体的には、認知症防御物質として多価不飽和脂肪酸のヒトBBB輸送特性を解明し、その輸送活性化因子を同定した。さらに脳血管障害を伴う病態モデルにおいて、ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるチャネルの関与する局在依存的な輸送機能特性を解明するとともに、モデルマウスのBBB輸送タンパク質の発現量の変動プロファイルを構築した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present research was to clarify the blood-brain barrier (BBB) transport system for dementia-preventing substances and the changes in transport functions and transporter expression levels under brain vascular disease conditions. A transport protein of docosahexaenoic acid (DHA) was identified in the human brain endothelial cells (hCMEC/D3 cells). The DHA uptake by hCMEC/D3 cells was enhanced by an activating factor. In vitro study with the transwell culture of hCMEC/D3 cells indicated that ischemia-related changes in the BBB transport involved the basal channel opening. Quantitative targeted absolute proteomics revealed the changes in the expression profiles of transporter proteins at the BBB in mouse models of brain vascular disorders. These results could provide the basis of dementia prevention by the retrieval of blood-brain barrier transport function.

研究分野：神経薬理学、定量プロテオミクス

キーワード：血液脳関門 認知症 トランスポーター 輸送タンパク質 定量プロテオミクス チャネル

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴う、認知症罹患率の増加と、要介護者の急増は社会的問題となっている。認知症発症の要因として、虚血・炎症性疾患、糖尿病などの慢性疾患や神経変性疾患で引き起こされる脳血管障害が知られている。特に脳毛細血管は、血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) の解剖学的実体であり、主に輸送タンパク質を介して循環血液と脳実質間の厳密な物質輸送を担う動的インターフェースとして脳内物質環境を制御している (図 1)。従って、BBB 輸送機能の変動は、認知症発症の重大なリスクといえる。

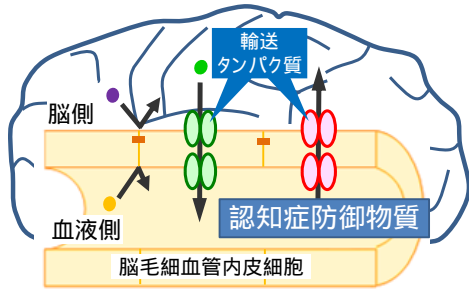


図1 血液脳関門における輸送機能

そこで、BBB を介した認知症防御物質の供給輸送 (図 1) の活性化や、病態によって質的量的に変動する BBB 機能を正常化可能な標的分子の同定によって、認知症の予防や進行を遅らせることが可能になると考えられる。そのためには、認知症予防に向けた BBB 輸送機能の変動機構に関する学術的な基盤を構築する必要がある。

(1) 認知症防御物質の BBB 輸送

これまでに報告されている脳内の物質環境の変動と中枢疾患との関連性として、脂肪酸プロファイルの変化が、認知症やアルツハイマー病などの中枢性疾患の罹患リスクを増大させることが報告されている。現在では、認知症に効く、脳に良いとの謳い文句で、数々のサプリメントが販売されている。しかし、過剰量のサプリメントを摂取すればよいと判断は、正しいとは言い難く、科学的根拠に基づいた適切な投与計画を、確立する必要がある。そこで、認知症防御物質の BBB 輸送特性を解明し、神経活動に依存して供給輸送が活性化する機構を解明することによって、認知症防御物質の効率的な投与方法を確立することが可能なのではないかとこの着想に至った。本研究は、「認知症の予防を目的とした、疾病予防のための健康科学」を新たに創設し、「BBB 輸送メカニズム」の概念を導入する、という特色がある。最終的には、本研究から得られたデータに基づき、認知症防御物質として抗酸化物質や多価不飽和脂肪酸のどれだけの量を、どんなタイミングで投与すれば、脳が必要とする認知症防御物質を効率的に供給できるかという、認知症防御物質の投与设计を提唱できるという点で、社会的意義も大きい。

(2) 神経活動依存的な BBB 輸送活性化機構の解明は、認知症予防・治療への突破口

神経活動依存的に BBB の認知症防御物質輸送系が肺活化することを証明し、サプリメントを用いて BBB 輸送を活性化しようとする試みは前例が見られない。100 年以上前に、Sherrington らによって、酸素やグルコースなどの栄養素は、脳内局所の血流量が増大することで、脳活動が活性化した部位に多く運ばれると予言された (J Physiol, 11:85-158, 1890)。この原理を基に、脳血管性認知症の治療薬として「脳循環 (脳血流) 改善薬」が開発されたが、過去に承認された医薬品の多くが、その後の再審査によって取り消されている。このことは、認知症予防や治療として、脳血流量を改善するだけでは十分な効果がないことを、強く示唆しており、創薬戦略の見直しが必要と考えられる。本研究によって解明を目指す「神経活動依存的な、BBB の認知症防御物質輸送系の活性化機構」は、脳血流改善薬に代わる、認知症予防や治療の革新的な分子標的となり得るものである。

(3) 「加齢とともに脳機能は低下することが知られているが、頭をよく使うと認知症が防げるのはなぜか？」という応用健康科学領域の課題に、新しい説を提示する可能性
本研究から、「神経活動を活性化させ続けると、BBB の認知症防御物質輸送システムが活性化し続けるため、認知症防御物質は脳内に十分に供給され、神経細胞死を防いでいる。」という説を提示することができる。これまで、認知症の発症リスクについては、中年期の高血圧、高コレステロール血症、糖尿病を回避することで、軽減されるという極めてあいまいなとらえ方であった。本研究は、認知症の発症リスクを、「BBB を介した認知症防御物質の脳への供給不足による」と明確にとらえ、BBB 輸送を活性化/正常化因子を同定して、認知症防御物質を脳内に適正に摂取させることによって、認知症の発症の予防につなげようとするものである。

2. 研究の目的

本研究は、仮説「認知症発症のリスクは、加齢や脳疾患による神経活動の低下に伴う BBB (脳毛細血管内皮細胞) の輸送機能変化により高まる。そこで、BBB を介した認知症防御物質の供給活性化や、病態によって輸送タンパク質が質的量的に変動する BBB 機能を改善可能な標的分子の同定によって、認知症の予防や進行を遅らせることが可能になる。」を証明するために、以下に示す課題を解決し、認知症予防に向けた学術的な基盤を構築することを目的とした。

(1) 認知症防御物質として、認知症予防や進行を遅らせることに有用とされる物質のうち、脳内で合成されないか、生産量が極め

て低い多価不飽和脂肪酸(ドコサヘキサエン酸, DHA)のヒト BBB 輸送タンパク質を同定し、輸送特性を解明する。

- (2) BBB における認知症防御物質輸送系の活性化機構/因子を解明する。
- (3) 認知症発症の要因となる虚血・炎症性疾患、糖尿病などの慢性疾患や神経変性疾患における BBB の輸送機能変化の分子機構を解明する。具体的には、正常群及び疾患群の BBB におけるトランスポーターや受容体などの輸送タンパク質の発現量の変動プロファイルを構築する。脳血管障害を伴う病態において、輸送タンパク質の発現量が変動する分子は、BBB 賦活化又は正常化の分子標的となる可能性が高い。

3. 研究の方法

- (1) ヒト BBB における物質輸送特性の解明

ヒト BBB におけるドコサヘキサエン酸(DHA)の輸送タンパク質の同定及び病態時 BBB 輸送変動機構におけるチャンネルの役割を解明するため、*in vitro* ヒト BBB モデルとしてヒト脳毛細血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)を用いた。輸送特性の評価には、放射性元素標識 [¹⁴C]DHA またはチャンネルの蛍光プローブを用い、細胞内への取り込み量を算出した。hCMEC/D3 細胞における DHA 輸送タンパク質の関与の実証には、siRNA ノックダウン法を用いた。同定した DHA 輸送タンパク質及びチャンネルを介した物質輸送特性解析は、HEK293 安定発現株を作成して行った。hCMEC/D3 細胞における DHA 輸送タンパク質の局在性解析には、特異抗体を用いた免疫組織化学的手法及び、液体クロマトグラフィー(nano LC)を連結した質量分析装置を用いた標的絶対定量プロテオミクス(Quantitative targeted absolute proteomics/QTAP, Pharm Res 25:1469-83, 2008)を用いた。hCMEC/D3 細胞における DHA 輸送を活性化する因子の探索には、活性化候補因子と細胞をインキュベーションした後、 [¹⁴C]DHA の細胞内取り込み量の増加率を算出した。

- (2) 認知症発症要因となる脳血管障害を伴う病態における BBB の輸送機能変化の分子機構解明

脳血管障害を伴う病態として、LPS 投与炎症モデル及び高血糖誘発モデルマウスを作成後、脳毛細血管を高純度で精製し whole cell lysate を調製した。さらに、標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)の手法を用いて、トランスポーターや受容体などの膜輸送タンパク質の発現量を算出し、正常マウス血管と比較解析を行った。

4. 研究成果

- (1) ヒト脳毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 細胞におけるドコサヘキサエン酸(DHA)の輸送タンパク質の同定

記憶の形成に重要な役割を果たす DHA の脳内量の低下は、中枢疾患の発症リスクを高めることが報告されている。先行研究における標的タンパク質絶対定量解析から、ヒト単離脳毛細血管において Fatty acid transport protein 1(FATP1)/SLC27A1 の発現(J Neurochem 117:333-45, 2011)が報告されていることから、DHA 輸送タンパク質として FATP1 の関与に焦点を絞った。FATP1/HEK293 安定発現株における [¹⁴C]DHA の輸送活性は、Mock/HEK293 細胞に比較し有意に高かった。hCMEC/D3 細胞に対する [¹⁴C]DHA の取り込みは濃度依存性を示し、FATP1 基質である長鎖脂肪酸であるオレイン酸によって阻害された。FATP1 siRNA 処理によって hCMEC/D3 細胞の FATP1 発現を抑制した場合、コントロールと比較して [¹⁴C]DHA の取り込み量は有意に減少した。以上の結果から、ヒト BBB において DHA 供給輸送には、FATP1 が関与することが示唆された。

- (2) ヒト脳毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 細胞におけるドコサヘキサエン酸(DHA)の輸送活性化因子の解明

BBB におけるドコサヘキサエン酸(DHA)の輸送活性化因子を同定することを目的とした。hCMEC/D3 細胞における [¹⁴C]DHA 取り込み輸送は、細胞外刺激因子の濃度の増加に従って増大した。hCMEC/D3 細胞における Fatty acid transport protein 1(FATP1)/SLC27A1 発現量の変動解析から、刺激因子処理によって細胞膜画分での発現が増加した。細胞免疫染色においても同様に、刺激因子処理によって細胞表面部位のシグナルが増強する傾向が示された。以上の結果から、ヒト脳血管内皮細胞は、刺激因子によって FATP1 の細胞膜局在量を増加させ、DHA 輸送機能を増加させていることが示唆された。従って、BBB における DHA 輸送の賦活化には、脳毛細血管内皮細胞における細胞内情報伝達経路の活性化が方策の一つである可能性が示された。脳毛細血管内皮細胞における FATP1 輸送機能の賦活化が、認知症防御物質 DHA の脳への供給不足を回避するための分子機構となる可能性が示された。

- (3) 認知症発症要因となる疾患モデルを用いた BBB 輸送機能変化の分子機構解明

認知症発症要因となる脳血管障害を伴う病態における BBB の機能的低下のメカニズムを分子的に解明することは、BBB の賦活化又は正常化による認知症予防法の開発に不可欠である。そこで、標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)及び輸送機能解析を基盤として、虚血・炎症性病態や糖尿病における BBB の機能変化の分子機構を解明した。虚血環境における BBB 輸送機能変化を解析するため、ヒト脳血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)をトランスウエル上で培養し、虚血病態の脳内環境モデルとして basal 側のみをカルシウムゼロの

緩衝液で蛍光プローブの取り込み量を計測した。同環境では、basal 側から細胞内方向の取り込みが増大し、basal 側のチャネルが開口活性化したことが示された。チャネルサブタイプの輸送機能解析系を用いて、内因性基質及び薬物の基質認識性を解析した。従って、虚血病態では脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜で、選択的にチャネルが開口活性化し、BBB 輸送機能変化を担う分子機構であることが示唆された。さらに、in vivo LPS 投与炎症モデル及び高血糖モデルマウスから脳血管を単離し、受容体などの輸送タンパク質の発現量の変動プロファイルを構築した。以上の結果から、脳血管障害を伴う病態において、BBB の輸送機能が活性化されたり、輸送タンパク質の発現量の変動したりする分子は、BBB 賦活化又は正常化の分子標的となる可能性が示された。本研究では、BBB 輸送機能の観点から、認知症の予防や進行を遅らせるための科学的基盤を構築する上で重要な知見を得ることができた。

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 6 件)

1. Tachikawa M, Hosoya K, Terasaki T, Pharmacological significance of prostaglandin E₂ and D₂ transport at the brain barriers. Thematic Issue edited by Thomas P. Davis "The pharmacological implications of the recent discoveries made concerning the structure and function of the blood-brain barrier" Adv Pharmacol 71:337-360 (2014). DOI: 10.1016/bs.apha.2014.06.006. (査読有)
2. 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 102: 3343-3355 (2013). DOI: 10.1002/jps.23575. (査読有)
3. 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 10:21 (2013). DOI: 10.1186/2045-8118-10-21. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. Tachikawa T, Pathological impact of hemichannels-mediated gateway on the brain barrier transport dynamics.

Pharmaceutical Science Symposium 2015, November 16-17, 2015, Sendai

2. Tachikawa M, Kaneko Y, Akaogi R, Uchida Y, Couraud PO, Terasaki T, Impact of pannexin 1 and connexin 43 hemichannels on extracellular calcium-dependent transport dynamics in human brain capillary endothelial cells. Barcelona BioMed Conference, Blood Brain Barrier, November 2-4, 2015, Barcelona, Spain
3. 立川正憲、内田康雄、大槻純男、寺崎哲也：血液脳関門ファーマコプロテオミクスに立脚した中枢疾患創薬の提言、日本薬学会第135年会、2015年3月28日、神戸
4. Tachikawa M, Plasticity and robustness of the blood-brain-barrier transporters, channels, and receptors: a study of advanced quantitative targeted proteomics, Symposium 7: New Strategies in the Human CNS Barriers Research: The Development of New CNS Drugs and Therapies for the CNS Disorders, 19th North American ISSX/29th JSSX Meeting, October 21, 2014, San Francisco, USA
5. Sato K, Tachikawa M, Uchida Y, Ohtsuki S, Terasaki T. Dynamic plasticity of "Cluster of differentiation antigen" expressions at the inflammatory blood-brain barrier. 19th North American ISSX/29th JSSX Meeting, October 19-23, 2014, San Francisco, USA
6. Tachikawa M, Channels at the Barriers: A Non-Transporter-Mediated Gateway, Gordon Research Conference, Barriers of the CNS, June 19, 2014, Colby-Sawyer College, New London, USA

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