

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670072

研究課題名(和文) ヒト血液脳関門機能診断を可能とするエクソソームバイオマーカー確立への挑戦

研究課題名(英文) Study on the exosomes as a biomarker to estimate in vivo function of human blood-brain barrier

研究代表者

千葉 寛 (Chiba, Kan)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40159033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳毛細血管内皮細胞から分泌されるエクソソームが、その細胞機能を予測するツールとなるか、検証をおこなった。正常血液脳関門モデルおよびコリン欠乏血液脳関門障害モデルから分泌されるエクソソームを単離し、そこに内包されるmRNA量を解析したところ、それぞれのエクソソームは由来細胞のmRNA発現プロファイルを反映していることが明らかとなった。したがって、ヒト脳毛細血管内皮細胞内の遺伝子発現量情報を内包するエクソソームを解析することにより、血液脳関門機能の状態を把握できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The blood-brain barrier (BBB) is composed of brain microvascular endothelial cells, astrocytes, and pericytes, and plays important roles in restricting penetration of various drugs into the brain. Therefore, it is important to develop a biomarker that allows us to estimate in vivo BBB functions. In this study, we aimed to clarify whether exosomes (Ex) derived from human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) contains similar mRNA cargo to that of the parental cells. We developed a normal BBB model, as well as an impaired BBB model, where VE-cadherin mRNA level was significantly decreased. The Ex derived from each model were collected and their mRNA patterns were examined. The results show that the VE-cadherin mRNA expression level in the Ex derived from the impaired BBB model cells was clearly lower than that from the normal BBB model cells. Thus, our results suggest that the Ex derived from HBMEC may have a potential to be a biomarker for estimating in vivo BBB functions.

研究分野：薬学

キーワード：バイオマーカー エクソソーム 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

BBB は、循環血液と脳間の非特異的な物質透過を強力に制限しており、これにより薬物の脳移行も著しく制限される。BBB の形態学的実体は脳毛細血管内皮細胞 (Brain microvascular endothelial cells, BMEC) であり、その細胞に存在する密着結合および薬剤排出トランスポーターが BBB 機能を担う主な分子実体であると考えられている (次項図 1)。BMEC 間の密着結合は生体内で最も強固な細胞間結合であるとされ、これにより細胞間隙を介する薬物透過はほぼ完全に遮断される。また、最も主要な薬物排出トランスポーターは P 糖タンパク質 (Pgp) と breast cancer resistance protein (BCRP) であり、多くの薬物の経細胞内透過を制限している。

上述の BBB 機能は、中枢・末梢疾患、薬物投与、加齢および遺伝子多型など様々な要因によりダイナミックに変動することが報告されている。例えば、てんかん患者ではてんかん発作により BMEC における Pgp の発現が誘導されることが報告されており、これは抗てんかん薬に対する耐性発現機序の一つである可能性が示唆されている。また、*in vitro* において抗 HIV 治療薬が BMEC における Pgp の発現を誘導することや、免疫抑制薬であるシクロスポリンがラット初代培養 BMEC の密着結合機能を有意に減弱させることも報告されている。

BBB は薬物の脳移行を規定する重要な因子であることから、上記のような BBB 機能の変動・個人差は、中枢治療薬の脳内移行量の差異と薬効発現の個人差につながると考えられる。したがって、脳疾患における薬物治療時に個々の患者の BBB 機能を診断することができれば、中枢疾患治療薬の最適な投与設計をおこなうことが可能となる。

エクソソームは細胞から分泌される膜小胞であり、分泌細胞由来の RNA (mRNA、microRNA [miR]、long non-coding RNA [lncRNA]) やタンパク質を内包している。また、これらのエクソソーム内容物プロファイルは、分泌細胞の状態を反映し変化することも明らかとなっている。したがって、ヒト脳毛細血管内皮細胞由来エクソソームに含まれる BBB 機能を反映するエクソソーム因子を同定し、HBMEC-Ex を血液から単離分取する方法を確立できれば、中枢疾患患者の BBB 機能を、簡便かつ低侵襲性にリアルタイムで診断できる有望なバイオマーカーとなりえると考え、今回の申請内容を発想するに至った。

2. 研究の目的

臨床における BBB 機能診断を可能にする、*in vivo* バイオマーカーの確立を目的とする。具体的には、脳毛細血管内皮細胞から分泌されるエクソソームに着目し、そこに内包され、BBB 機能を反映する因子を同定し、血中から

BBB 由来のエクソソームを単離分取する手法を確立する。

3. 研究の方法

不死化ヒト脳毛細血管内皮細胞培養法

ヒト脳毛細血管内皮モデル細胞として、不死化ヒト脳毛細血管内皮細胞 HBMEC/ci β を使用した。HBMEC/ci β の培養には、VascuLife® Basal Medium (Lifeline Cell Technology) に 4 μ g/mL Blasticidin S Hydrochloride, HEPES Solution (和光、大阪)、5% Penicillin-Streptomycin Solution (和光)、5% 200 mmol/l L-Alanyl-L-Glutamine Solution (和光)、10% Fetal Bovine Serum (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加した培地 (以下 “Vas” と記す) を使用した。細胞は、5% CO₂/95% air を気相とした 33°C の CO₂ インキュベーターにて培養した。培養ディッシュは Cellmatrix type-I-C (新田ゼラチン、大阪) でコートしたものを使用した。

Choline transporter like 1 (CTL1) 阻害による BBB 障害モデルの構築

CTL1 の阻害剤としてヘミコリニウム-3 (Hemicholinium-3, HC-3, Sigma) を用いた。最終濃度 1 mM の HC-3、最終濃度 200 nM の hydrocortisone (HC, MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) を Vas に添加した培地で培養した細胞を HBMEC/ci β (HC-3)、HC-3 非添加培地で培養した細胞を HBMEC/ci β (Ctrl) とした。HBMEC/ci β を播種し、その 3 日後に培地を HC-3 添加・非添加培地に交換した。以降の培地交換は 1 日おきにおこない、培養期間は 10 日間とした。

HBMEC/ci β 由来エクソソームの単離

HBMEC/ci β (HC-3) および HBMEC/ci β (Ctrl) の培養 11 日目に、培地をエクソソームフリー-FBS を含む Vas に交換し、その 3 日後に培地を回収した。回収した培地からのエクソソームの単離は、Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen) を用いて、プロトコールとおりにおこなった。エクソソームのタンパク質濃度は、DC protein assay kit II (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

HBMEC/ci β 由来エクソソームの形態観察および粒径測定

HBMEC/ci β 由来エクソソームの形態観察は H-7650 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM, 日立、東京) を用いておこなった。粒径測定はゼータ電位・

粒径測定システム ELSZ-1000ZSCK(大塚電子、大阪)を用いて解析した。

低分子透過性バリア機能解析

Sodium Fluorescein (Na-F, Sigma)および Lucifer Yellow(LY)透過性はトランスウェルシステムにより解析した。HBMEC/ci β (HC-3) および HBMEC/ci β (Ctrl) をインサートに播種し、10日間培養した。Na-Fは最終濃度 150 ng/insert、LYは最終濃度 50 μ Mとした。添加時を0分(T=0)とし、T=30においてインサートの下部から培地を回収した。The apparent permeability (P_{app} 値)は以下の計算式を用いて求めた。

$$P_{app} \text{ (cm/min)} = \frac{[\text{下側の培地の容積 (cm}^3\text{)}] \times [\text{下側の Na-F} \cdot \text{LY 濃度 (ng/\mu L)}]}{[\text{上側の細胞培養有効面積 (cm}^2\text{)}] \times [\text{上側の Na-F} \cdot \text{LY 濃度 (ng/\mu L)}] \times 30 \text{ (min)}}$$

Total RNA 抽出、cDNA 合成

HBMEC/ci β からの total RNA 抽出は、ISOGEN II with Spin Column (ニッポンジーン, 東京)を用いてプロトコールどおりにおこなった。cDNAの合成は、抽出した total RNA 500 ng をテンプレートとし、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA)を用いてプロトコールどおりにおこなった。

定量的 real-time PCR

上記の方法に従い合成した HBMEC/ci β cDNAを鋳型とし、zonula occludens-1(ZO-1)、Vascular Endothelial-cadherin (VE-cadherin)、 β -catenin mRNAのプライマーと KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, Ma, USA)を用いて定量的 real-time PCRをおこなった。

Western blotting 法

HBMEC/ci β 播種から10日後、細胞を回収し、全細胞溶解液を調製した。タンパク質濃度は、DC protein assay kit II (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて測定した。

全細胞溶解液 30 μ g を 8 % SDS-Poly-Acylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)により分離した後、PVDF膜に転写し、3%BSA/0.05% Tween20含有PBS (PBS/t)を用いてブロッキングした。一次抗体は ZO-1 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、VE-cadherin rabbit monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA,

USA)、 β -Catenin rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を用い、二次抗体には各一次抗体に適合するものを用いた。蛍光試薬は Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare, Giles, UK)を使用し、蛍光検出は LAS-4000 (FUJIFILM, Tokyo)でおこなった。

細胞免疫染色法

ZO-1、VE-cadherin及び β -cateninの細胞内局在解析は細胞免疫染色法によりおこなった。HBMEC/ci β 播種から10日後に培地を除去し、PBS (+)でリンスした後、BD Cytotfix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences)を用いて固定処理を、BD Perm/Wash Bufferを用いて、浸透処理をおこなった。その後、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル)を用いてブロッキングをおこなった。一次抗体には、ZO-1 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、VE-cadherin goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)または β -Catenin rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を用いた。二次抗体には各一次抗体に適合するものを用いた。各染色には propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) または TO-PRO-3 (Invivogen, San Diego, CA, USA)を用いた。蛍光検出は、LSM 700 (ZEISS, Oberkochen, Germany)でおこなった。

4. 研究成果

HBMEC/ci β (HC-3)の密着結合能を Na-F と LY 透過性実験により解析した(Fig. 1)。その結果、HBMEC/ci β (Ctrl)の Na-F 透過性 ($P_{app} = 1.44 \pm 0.35 \times 10^{-3} \pm 0.35$ cm/min)と比較し、HBMEC/ci β (HC-3)の Na-F 透過性 ($P_{app} = 2.12 \pm 0.41 \times 10^{-3}$ cm/min)は 1.49 \pm 0.17 倍と有意に上昇した ($P < 0.01$)。また、HBMEC/ci β (Ctrl)の LY 透過性 ($P_{app} = 1.60 \pm 0.23 \times 10^{-3}$ cm/min)と比較し、HBMEC/ci β (HC-3)の LY 透

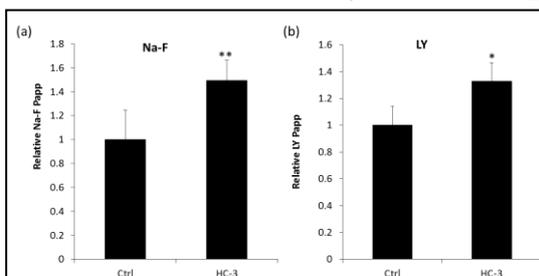


Fig. 1 Effects of HC-3 on BBB permeability
Permeability assay using (a) Na-F (0.5 ng/insert) or (b) LY (50 μ M) was performed. P_{app} value was calculated from Na-F or LY permeability. The bars represent the mean \pm S.D. of the P_{app} values obtained from three independent experiments. **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

過性 ($P_{app} = 2.14 \pm 0.50 \times 10^{-3}$ cm/min) は 1.32 ± 0.14 倍と有意に上昇した ($P < 0.05$)。

HC-3 曝露による接着結合タンパク質の mRNA 発現量変動を明らかにするために、HBMEC/ci β (HC-3) と HBMEC/ci β (Ctrl) における VE-Cadherin、 β -catenin、ZO-1 の mRNA 発現量をそれぞれ定量的 real-time PCR により解析した (Fig. 2)。その結果、

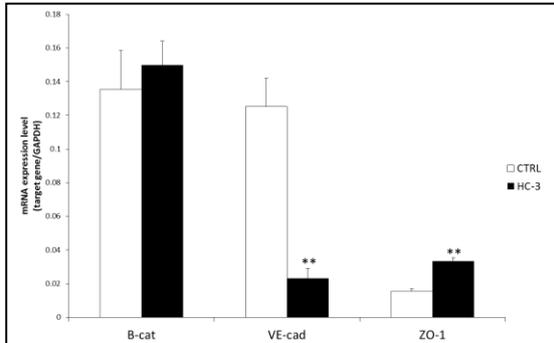


Fig. 2. Effects of HC-3 on mRNA expression level of Adherence Junction proteins in HBMEC/ci β .

The β -catenin, VE-cadherin and ZO-1 mRNA expression levels in HBMEC/ci β (HC-3) and HBMEC/ci β (Ctrl) were determined by real-time PCR analysis. The mRNA expression level of each gene was normalized by expression level of GAPDH mRNA. Data are shown as the mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in duplicate.

HBMEC/ci β (HC-3) における VE-Cadherin の mRNA 発現量は、HBMEC/ci β (Ctrl) のそれ (100%) と比較して 18.5 ± 25.2 (%) に低下し、ZO-1 の mRNA 発現量は 226 ± 6.19 (%) に増加し、 β -catenin の mRNA 発現量は変わらなかった。

次に、HC-3 曝露による接着タンパク質の発現量の変動を明らかにするために、HBMEC/ci β (HC-3) と HBMEC/ci β (Ctrl) における VE-cadherin、ZO-1、 β -catenin のタンパク質発現量をそれぞれ Western blotting により解析した。その結果、VE-cadherin のタンパク質発現量は低下し、ZO-1 のタンパク質発現量は増加し、 β -catenin のタンパク質発現量は変わらず、それぞれの mRNA 発現量の変化と同じ傾向が認められた。

また、HC-3 曝露による接着タンパク質の局在変動を明らかにするために、HBMEC/ci β (HC-3) と HBMEC/ci β (Ctrl) における VE-cadherin、ZO-1、 β -catenin の細胞内局在を免疫染色法により観察した (Fig. 3)。その結果、HBMEC/ci β (HC-3) における VE-Cadherin および ZO-1 では、HBMEC/ci β (Ctrl) と比較して、膜への局在が減弱した。一方、 β -catenin の局在については、両細胞間で変化は認められなかった。

以上の結果から、CTL1 機能を阻害することにより、コリン欠乏性 BBB 機能障害が生じることが明らかとなった。本モデルは病態時や薬物治療時における BBB の CTL1 機能低下時 (阻害下) や血中コリン濃度低下時に認められる脳血管障害モデルとなると考えられる。

そこで次に、コリン欠乏性 BBB 障害時における HBMEC/ci β 由来エクソソームの形態や内包物変化を明らかにするために、HBMEC/ci β

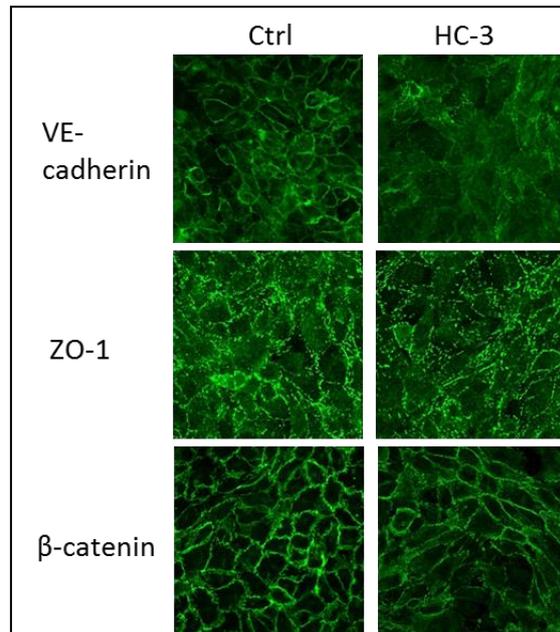


Fig. 3. Effects of HC-3 on subcellular localization of adherens junction protein.

Subcellular expression of β -catenin, VE-cadherin and ZO-1 in HBMEC/ci β with vehicle and HC-3 (1 mM) were examined by immunocytochemistry analysis. The assays were performed three times independently, and the representative results are shown.

(HC-3) および HBMEC/ci β (Ctrl) よりエクソソームを回収し、TEM によりその形状を観察した (Fig. 4a)。また、HBMEC/ci β 由来エクソソームの粒径に及ぼす HC-3 曝露の影響を明らかにするために、ゼータ電位・粒径測定システムによりエクソソームの粒径を測定した (Fig. 4b)。その結果、HBMEC/ci β (HC-3) 由来のエクソソームと HBMEC/ci β (Ctrl) 由来のエクソソームとの間で、形態上および粒径に大きな差異は認められなかった。

続いて、上記エクソソームに内包される mRNA がそれぞれの細胞内の mRNA 発現量を反映するか検討をおこなった。その結果、HBMEC/ci β (Ctrl) と HBMEC/ci β (HC-3) の間で細胞内の発現量に差異が認められた VE-cadherin mRNA においては、エクソソーム内においても同様の傾向が認められた (Fig. 5)。したがって、HBMEC/ci β から分泌されるエクソソームには、その細胞における遺伝子の発現情報を反映しうる mRNA が内包され

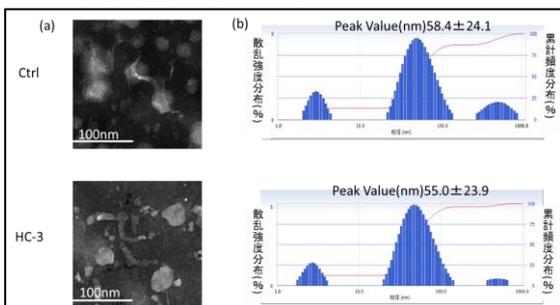


Fig. 4. Effects of HC-3 on morphology and size of exosomes secreted by HBMEC/ci β

a, The identity and the morphologies of exosomes collected from HBMEC/ci β cultured with vehicle and HC-3 (1 mM) were examined by transmission electron microscopy (TEM) analysis. Representative micrograph was shown. b, The size of exosomes collected from HBMEC/ci β cultured with vehicle or HC-3 (1 mM) were examined by Zeta-potential and Particle size Analyzer.

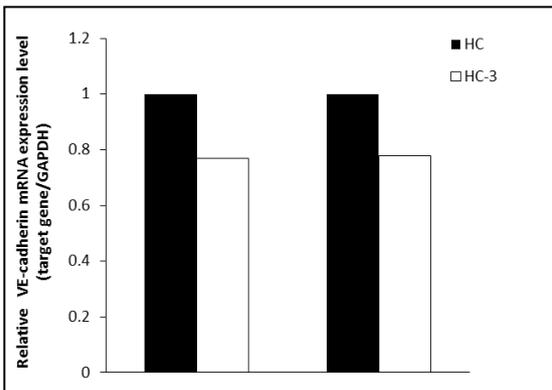


Fig. 5. Effects of HC-3 on mRNA expression level of Adherence Junction proteins in HBMEC/ci β .

The β -catenin, VE-cadherin and ZO-1 mRNA expression levels in HBMEC/ci β (HC-3) and HBMEC/ci β (Cntrl) were determined by real-time PCR analysis. The mRNA expression level of each gene was normalized by expression level of GAPDH mRNA. Data are shown as the mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in duplicate.

ることが明らかとなった。

以上、本研究ではコリン欠乏性 BBB 機能障害モデルを新たに構築し、さらにコリン欠乏性 BBB 機能障害時の BMEC から分泌されるエクソソームには、その細胞内を反映する mRNA 発現情報が内包されることを明らかとした。今後、さらなる解析が必要であるが、BMEC から分泌されるエクソソームを読み解くことにより、中枢疾患患者の BBB 機能を、簡便かつ低侵襲性にリアルタイムで診断できる可能性があると考えられる。一方、これまで BMEC から分泌されるエクソソームについてはほとんど解析されていないことから、BMEC からエクソソームが放出されることを実証した本研究結果は、新たな BBB 研究の先駆けとなるものとも考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Ito R, Furihata T, Suzuki S, Chiba K. Identification and functional characterization of human blood-brain barrier choline transporter in HBMEC/ci β , an immortalized human brain microvascular endothelial cell line. 11th Cerebrovascular biology (Paris, France) July 7, 2015.
2. 鈴木翔太、降幡知巳、伊藤涼、周徐嘉、稲津正人、千葉寛。ヒト血液脳関門コリントランスポーターの同定とその血液脳関門機能における役割の解明。第 10 回トランスポーター研究会 (東京) 2015 年 6 月 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakubutu/framepage4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 寛 (CHIBA, Kan)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40159033

(2) 研究分担者

降幡 知巳 (FURIHATA, Tomomi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80401008

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

B functions.