

Development of New Methodology for the Blood-Brain Barrier (BBB) Research and Its Application to the Analysis of Transport Function

寺崎 哲也 (Tetsuya TERASAKI)

東北大学大学院薬学研究科 (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

血液脳関門研究の歴史は1695年英国人生理学者 H. Ridley に遡ることができる¹⁾。しかし、その解剖学的実体が脳毛細血管内皮細胞であることが証明されたのは、電子顕微鏡と組織固定化技術が開発された後の1970年である。脳毛細血管の単離手法が開発され、血液中のグルコースやアミノ酸を脳内へ輸送する役割を担うことが明らかになった。薬物の脳への移行性が低いのは分子量が大きいことが原因と考えられていた。1992年、培養脳毛細血管内皮細胞を用いて能動的にビンクリスチンを排出することが報告されたことが端緒となり²⁾、血液脳関門は異物を脳から血液方向へ排出する機能的関門としての役割を担うことが明らかになった。血液脳関門は、脳内で産生される神経伝達物質を脳内に保持する静的障壁としての役割を担っていると考えられていた。一方、神経伝達物質の前駆体は血液側から脳内へ輸送されることから、脳内に親水性物質が蓄積されることになる。そこで、脳から血液方向の輸送特性を解析する手法として Brain Efflux Index 法を開発した³⁾。脳毛細血管内皮細胞の容積は脳の0.1%と極めて少ない。脳毛細血管内皮細胞の培養系は有用であるが、*in vivo* の特性を保持した細胞系の開発が必要である。そこで、sv40 large T antigen gene トランスジェニック動物から脳毛細血管内皮細胞、星状膠細胞、周皮細胞などの条件的不死化細胞株を樹立した⁴⁾。L-Asp、GABA、DHEAS、ホモバニリン酸などについて脳から血液方向の輸送を各々 *asct2*、*Gat2/BGT-1*、*oatp2*、*oat3* が担っていることが示された⁵⁾。血液脳関門は、脳内で産生される親水性の神経伝達物質の最終代謝産物や神経伝達物質を脳から除去する「中枢解毒機構」の役割を担っていることが示唆された。さらに、酸化的ストレスによって脳毛細血管内皮細胞に system Xc⁻ が、TNF α や高浸透圧によって Taurine Transporter が誘導されることが示された。これらの結果は、血液脳関門の機能が病態などによって変動することを示唆している。血液脳関門の役割を解明する上で機能を担うタンパク質の発現を示すことは必須である。従来、western blotting 法や組織染色法が用いられ、特異性の高い抗体の調製が研究進展のカギを握っていた。質量分析装置の性能が飛躍的に向上し、比較的微量のタンパク質を検出することが可能になった。タンパク質の酵素処理産物の中から質量分析装置でより強いシグナルが得られるペプチドをアミノ酸組成に基づいて選択する手法を開発した。この手法を Selective Reaction Monitoring (SRM) 法と組み合わせることで、多種類同時高感度絶対定量法を確立した⁶⁾。この方法を用いて単離脳毛細血管に発現する輸送担体、酵素、受容体、チャネルなどのタンパク質量を測定し、マウス、ラット、マーモセット、カニクイザル、ヒトの血液脳関門の類似点と相違点を明らかにした。*Glut1* はほとんど種差がなく、*MDR1*、*BCRP* は3倍以内の差であったが、ヒトの *oat3*、*oatp* は検出限界以下であった。今後の重要課題の一つとして、ヒトの血液脳関門における有機アニオン輸送系の解明が挙げられる⁷⁾。中枢作用薬の開発において、脳への薬物移行性を予測することは非常に重要な課題である。薬物速度論モデルを構築し、脳毛細血管における *mdr1a* のタンパク質量とその *in vitro* 輸送活性を用いて、マウスに薬物投与後の脳内濃度を予測したところ、11種類の薬物について *in vivo* の値とほぼ一致した。*In vivo* における輸送担体タンパク質発現量と、その *in vitro* 活性を数学モデルに基づいて統合することで *in vivo* 輸送機能を再構築できることが証明された⁸⁾。この結果は、病態時のヒトにおける脳内薬物動態の予測の可能性を示すものである。今後は、定量的プロテオミクス的手法を駆使して、タンパク質の複合体形成や修飾化による輸送活性の調節機構を解析し、動的インターフェースとしての血液脳関門の実体を解明する必要がある。

引用文献 1) 細胞工学, 32: 930-934 (2013), 2) *Life Sci.*, 51: 1427-1437 (1992), 3) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277: 1550-1559 (1996), 4) *Drug Disc. Today*, 8: 944-954 (2003), 5) *Pharm. Res.*, 24: 1745-1757 (2007), 6) *Pharm. Res.*, 25: 1469-1483 (2008), 7) *J. Pharm. Sci.*, 100: 3547-3559 (2011), 8) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339: 579-588 (2011).