

中川 慎介 論文内容の要旨

主 論 文

A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells,
pericytes and astrocytes

初代培養ラット脳毛細血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを用いた
新規血液脳関門再構成系の構築

中川慎介、Mária A. Deli、川口裕子、清水谷健志、下野貴宣、
Ágnes Kittel、田中邦彦、丹羽正美

Neurochemistry International (in press) 2008

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：丹羽正美 教授)

緒 言

循環血液中物質の脳内移行を制御し脳内の恒常性を維持する血液脳関門 (Blood-Brain Barrier、BBB) は脳毛細血管内皮細胞の機能的特性であるが、構成細胞である内皮細胞、アストロサイトおよびペリサイトの相互の機能的相関 (クロストーク) により BBB 機能の成熟と維持が達成されていると考えられている。BBB 機能解析に有用なツールである BBB *in vitro* 再構成モデルの構築には、これらの細胞間クロストークを可能にする微小環境を再現することが重要となる。脳毛細血管内皮細胞に BBB 機能を誘導するアストロサイトについては多くの知見があるが、内皮細胞と基底膜を共有するペリサイトの BBB 機能制御における役割については十分な検討が行われていない。

そこで、本研究ではラット初代培養脳毛細血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを用いて BBB *in vitro* 再構成モデルの作製を行い、ペリサイトの BBB 機能調節への関与を検討した。更に、我々の新規 BBB *in vitro* 再構成モデルが *in vivo* での BBB 機能を反映していることを確認するために、既存薬物 19 種類の BBB 透過性を検討した。

対象と方法

3 週齢のラットより、密度勾配遠心法を用いて脳毛細血管内皮細胞とペリサイトを単離培養した。アストロサイトは、生後 2 日齢ラット脳より shaking method を用いて分離培養した。得られた 3 種類の細胞を Transwell® (polyester membrane、0.4 μ m pore size) で共培養し、7 種類の BBB モデルを作製した。作製した共培養モデルは、経内皮電気抵抗 (transendothelial electrical resistance、TEER) と sodium fluorescein (Na-F、MW: 376Da) の透過性を用いて tight junctions (TJ) 機能を検定

し、TJ 蛋白質 (claudin-5、ZO-1、occludin) の発現を Western-blotting および蛍光免疫染色により評価した。7 種類のモデルの中で、最も TJ 機能の高いモデル (EPA 型) を用いてトランスポーター (P-gp、MRP1、GLUT-1) の発現を免疫染色で確認し、P-gp 機能を rhodamin 123 の輸送で検討した。更に、EPA 型の BBB モデルを用いた既存薬物 19 種類の透過係数をマウスでの *in vivo* の透過係数と比較した。

結 果

7 種類の BBB モデルの中で、脳毛細血管内皮細胞とアストロサイト、およびペリサイトの 3 種細胞の共培養系 (EPA 型) が最も TJ 機能が亢進していた (TEER の上昇、透過性の減少)。また、この BBB モデルでは TJ 蛋白質である claudin-5、ZO-1 の発現上昇、ならびに細胞間接着部位への集積がみられた。本 BBB モデルでは、トランスポーター (P-gp、MRP1、GLUT-1) も発現しており、P-gp の輸送方向性は脳側から血液側への輸送が有意であった。EPA 型 BBB モデルで得られた既存薬物 19 種類の透過係数と *in vivo* で得られた透過係数の相関係数は $R^2=0.89$ であった。

考 察

ペリサイトやアストロサイトと内皮細胞との共培養により、TJ 機能が亢進したことから BBB 機能維持にはアストロサイトだけではなく、ペリサイトも重要な役割を果たしていることが判明した。7 種類の BBB モデルの中で、脳毛細血管内皮細胞とペリサイトが接触し、アストロサイトからの液性因子の影響を受ける 3 種類の細胞の共培養系が最も TJ 機能が亢進していた。また、この BBB モデルでは TJ 蛋白質の発現上昇と細胞間接着部位への集積がみられ、トランスポーターの機能的な発現も確認できた。内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトからの液性因子がオートクリンおよびパラクリン的に作用することで、BBB 機能亢進が得られたものと考えられる。また、EPA 型の BBB モデルにおける薬物の透過係数は *in vivo* での透過係数と良好な相関を示したことから、実用的な薬物の脳内移行性検定システムとしても利用できる。