

博士学位論文

ヒト不死化細胞を用いた血液脳関門モデルの構築と
そのヒト脳内薬物動態予測への応用性検証

東京薬科大学 2022 年度

伊藤 涼

目次

略語.....	5
緒言.....	8
第1章 ヒト不死化アストロサイトの樹立及びその機能解析	
第1節：序論.....	12
第2節：実験材料・方法	
1-2-1 細胞およびその培養方法	
1-2-2 培地添加剤条件および培養温度条件の最適化	
1-2-3 ヒト不死化アストロサイトの作製	
1-2-4 細胞増殖能の解析	
1-2-5 Total RNA 抽出および cDNA 合成	
1-2-6 Reverse transcription-PCR (RT-PCR)	
1-2-7 定量的 real-time PCR	
1-2-8 細胞免疫染色法	
1-2-9 トランスポートアッセイ	
1-2-10 統計解析	
第3節：結果	
1-3-1 ヒト不死化アストロサイトの作製および細胞の単一化	
1-3-2 各クローンにおけるアストロサイトマーカー遺伝子の mRNA 発現解析	
1-3-3 HASTR/ci35 における tsSV40T、hTERT の発現および細胞増殖能解析	
1-3-4 HASTR/ci35 におけるアストロサイトマーカー遺伝子の発現解析	
1-3-5 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する FBS の影響	
1-3-6 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する培養温度の影響	
1-3-7 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する dBcAMP の影響	
1-3-8 各種培養条件下における HASTR/ci35 のアストロサイトマーカー遺伝子の mRNA 発現量解析	
1-3-9 HASTR/ci35 の分化誘導がグルタミン酸トランスポーターの発現および機能に及ぼす影響	
1-3-10 HASTR/ci35 の分化誘導がアデノシントランスポーターの発現および機能に及ぼす影響	

第4節：考察

第2章 *in vitro* ヒト BBB モデルの構築とその機能解析

第1節：序論.....43

第2節：実験材料・方法

2-2-1 細胞およびその培養方法

2-2-2 hiBBB の構築

2-2-3 RNA 抽出、cDNA 合成およびリアルタイム定量 PCR (qPCR)

2-2-4 免疫細胞染色 (Immunocytochemistry, ICC)

2-2-5 RNA 配列決定とデータ解析

2-2-6 経内皮電気抵抗 (trans-endothelial electrical resistance, TEER) の測定

2-2-7 *In vitro* BBB 透過性試験

2-2-8 統計解析

第3節：結果

2-3-1 HBMEC/ci18 における網羅的な遺伝子発現プロファイル解析

2-3-2 hiBBB の構築および培養方法の最適化

2-3-3 hiBBB における BBB 機能評価

2-3-4 hiBBB を用いた *in vitro* BBB 透過性試験

第4節：考察

第3章 CNS-PBPK モデルの構築およびヒト IVIVC 解析

第1節：序論.....73

第2節：実験材料・方法

3-2-1 CNS-PBPK モデルの構築

3-2-2 視覚的事後予測性能評価 (Visual Predictive Check, VPC) によるモデルの予測性能評価

3-2-3 診断プロットによるモデルの適格性評価

3-2-4 BBB 透過性パラメータに関するヒト IVIVC 解析

第3節：結果

3-3-1 CNS-PBPK モデルの構築および *in vivo* ヒト BBB 透過パラメータ Q_{ECF} の推定

3-3-2 BBB 透過性パラメータに関するヒト IVIVC 解析

第 4 節：考察

総括.....	88
謝辞.....	89
引用文献.....	90
主論文目録.....	96

略語

ABC	ATP Binding Cassette
ADM	astrocyte differentiation medium
AGM	astrocyte growth medium
AJ	adherence junction
ALDH1L1	aldehyde dehydrogenase 1 family member L1
BBB	blood-brain barrier
BCRP	breast cancer resistance protein
BPM	brain parenchyma medium
CM	cisterna magna
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
CysA	cyclosporin A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EAAT	excitatory amino acid transporter
ECF	extracellular fluid
EGF	epidermal growth factor
ENT	equilibrative nucleoside transporter
ER	efflux ratio
FBS	fetal bovine serum
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FcRn	neonatal Fc receptor
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLUT1	glucose transporter 1
GS	glutamine synthetase
Glu	L-Glutamate
H ⁺ /OC antiporter	proton/organic cation antiporter
HASTR	human astrocytes
HASTR/ci	human astrocyte/conditionally immortalized
HBMEC	human brain microvascular endothelial cells
HBPC	human brain pericytes
HC	hydrocortisone
ICC	immunocytochemistry
INSR	insulin receptor
IVIVC	<i>in vitro-in vivo</i> correlation
IgG	immunoglobulin G
JAM-A	junctional adhesion molecule A
KHB	krebs- henseleit bicarbonate buffer

LAT1	L-type amino acid transporter 1
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry
LV	lateral ventricle
LY	lucifer yellow
MAPK	mitogen-associated protein kinase
MFSD2A	the major facilitator superfamily domain containing 2A
NBMPR	nitrobenzylmercaptapurine riboside
NONMEM	non-linear mixed effect model
NTC	non-template control
Na-F	sodium fluorescein
P-gp	P-glycoprotein
PBPK	physiologically based pharmacokinetics
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PK	pharmacokinetics
PKA	protein kinase A
PM	pericyte medium
PPK	population PK
Pe	permeability coefficient
R123	rhodamine123
RNA	ribonucleic acid
S. D.	standard deviation
SAS	subarachnoid space
SHH	sonic hedgehog
SLC	solute carrier
SR	serine racemase
TEER	trans-endothelial electrical resistance
TFV	third and fourth ventricle
TJ	tight junction
TNF	tumor Necrosis Factor
TfR	transferrin receptor
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vas-V/E free	VEGF- and hEGF-free Vasculife complete medium
Vas-comp	Vasculife complete medium
ZO-1	zonula occludens 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary DNA
dBcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
fu,p	drug unbound fraction in the plasma
hEGF	human epidermal growth factor

hFGF-b	human fibroblast growth factor-basic
hIGF-1	human insulin-like growth factor-1
hTERT	human telomerase catalytic subunit
hiBBB	a human immortalized cell-based BBB model
hprBBB	primary HBMEC-based models
mRNA	messenger RNA
pRb	retinoblastoma gene product
pen/st	penicillin–streptomycin
pr	primary
prHASTR	primary human astrocyte
prHBMEC	primary human BMEC
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
tsSV40T	temperature sensitive simian virus 40 large tumor-antigen

緒言

中枢神経系 (central nervous system, CNS) 疾患治療薬の開発は、上市に至る確率がわずか 7% と他の疾患領域と比較して成功確率が極端に低い¹⁾。その要因の 1 つとして、血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の存在があり、これにより薬物の標的部位であるヒト脳内の薬物濃度予測が困難であることが挙げられる²⁾。

BBB の解剖学的実体は脳微小血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells, BMEC) であるが、その周囲にはペリサイトが BMEC の表面を覆うように存在している。さらに、ペリサイトの外側をアストロサイトの足突起が取り囲むように存在し、これら 3 種の細胞が協調的に機能することにより、脳に特有の血管構造を形成し、BBB として機能している³⁾ (Fig. 1a)。

BBB は、末梢組織と中枢神経系を隔てる関門組織であり、血中成分の脳内への移行を厳密に制限することにより、脳内の恒常性維持に重要な役割を担っている。このような制限を受ける物質には数多くの医薬品も含まれており、Table 1 にその代表例を示す。BBB における物質透過は、細胞間接合 (tight junction [TJ] および adherence junction [AJ]) による物理的バリアと、トランスポーターや受容体による選択的な輸送により厳密に制御されている⁴⁻⁶⁾ (Fig. 1b)。例えば、隣り合う BMEC 同士は、claudin-5、occludin および zonula occludens 1 (ZO-1) などの TJ 蛋白質や、vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) および junctional adhesion molecule A (JAM-A) などの AJ 蛋白質からなる細胞間結合により強固なバリアを形成する。このバリア機能により、細胞間隙を介した物質の脳内移行は限りなく最小限に制限されており、実際に合成低分子の約 98%、高分子薬物のほぼ 100% は BMEC 間の細胞間隙を透過しないことが報告されている^{7, 8)}。そのため、BBB における物質移行においては経細胞輸送が主要な経路となる。この経細胞輸送経路として、薬物の脂溶性に依存する受動拡散経路や、トランスポーターや受容体などの膜輸送蛋白質を介した能動輸送経路が知られている。

特に、BMEC に発現する種々の輸送体は、脳内への選択的な物質移行に重要な役割を担っている。例として、脳に必須の栄養素であるグルコース、アミノ酸および脂肪酸の取り込みには、solute carrier (SLC) 型の取り込みトランスポーターが関与し、その代表例としてグルコーストランスポーター1 (glucose transporter 1, GLUT1)、L型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) およびリゾリン脂質トランスポーター (the major facilitator superfamily domain containing 2A, MFSD2A) が知られている。また近年、その分子実体は未同定ではあるものの、ある種のカチオン性薬物の脳内取り込みを担うトランスポーターとして、H⁺プロトン/有機カチオンアンチポーター (proton/organic cation antiporter, H⁺/OC antiporter) が報告されている⁹⁾。さらに、インスリンやトランスフェリンなど生体内に存在する高分子の脳内輸送には、インスリン受容体 (insulin receptor,

INSR) やトランスフェリン受容体 (transferrin receptor, TfR) などの受容体介在性トランスサイトシスが関与する。一方で、BMEC の頂端膜側には P-糖蛋白質 (P-glycoprotein, P-gp) および乳癌耐性蛋白質 (breast cancer resistance protein, BCRP) などといった ATP-binding cassette (ABC) 型のトランスポーターが存在し、脳内への異物の侵入を防ぐ役割を担っていることが知られている³⁾。

このように、BBB は薬物の脳内移行を厳密に規定することから、医薬品の研究開発過程において候補化合物の BBB 透過性を評価することは、ヒト薬物動態予測の観点から中枢創薬に必須の項目である。しかしながら、上述のような複雑な BBB 透過機構を、薬物が持つ単純な物理化学的性質のみから *in silico* で予測することは極めて困難である。一方で、ヒト脳内の薬物濃度を直接測定することは侵襲的であり、倫理的な問題に加えて技術的な複雑さにも課題がある。したがって、これらの課題を解決する新たな方法として、ヒト脳内薬物濃度をより簡便かつ精度良く *in vitro* で予測する方法の確立が望まれており、そのような方法の 1 つとして、*in vitro* BBB モデルと生理学的薬物速度論 (physiologically based pharmacokinetic, PBPK) モデルを組み合わせたアプローチが提唱されている。

PBPK モデルは、ヒトにおける薬物の体内動態予測に汎用されるコンピューター解析を用いた薬物動態シミュレーションであり、生体情報 (組織重量、組織容積、血流速度等) と薬物動態基本情報 (物性、代謝、排泄等) を組み合わせて数式に落とし込むことにより構築できる。これを用いることで、脳を含めヒトで直接測定が困難な組織でもその組織中の薬物濃度予測が可能となる。PBPK モデルの中でも、脳内薬物濃度予測に適したモデルとして、CNS-PBPK モデルが考案されている¹⁰⁾。CNS-PBPK モデルは、末梢組織と脳組織のコンパートメントから構成され、末梢部分は簡便なコンパートメントで記述するのに対し、脳内は生体情報に基づく複数のコンパートメントで記述することで、汎用性と高い予測精度を兼ね備える特徴を持つ。したがって、この CNS-PBPK モデルに末梢と脳に関わる生体情報と脳薬物動態に特有の基本情報を入力してシミュレーションを行うことで、ヒト脳内薬物濃度の予測が可能となる。

CNS-PBPK モデル構築において、生体情報は既に古くからの生理学的研究から明らかとされており、文献情報から入手可能である。一方で、ヒト脳内濃度の実測値は通常入手できないことから、薬物のヒト脳内移行速度情報を入手することは極めて難しい。そこで *in vitro* で薬物のヒト脳内移行速度情報を取得する実験ツールとして、ヒト BBB モデルの開発が進められている。BBB モデルは、生体の BBB を *in vitro* で再現した細胞モデルであり、本モデルから得られる薬物の脳移行性パラメータと既知の生体情報に基づき CNS-PBPK モデルを構築することで、ヒト *in vivo* における脳内薬物濃度を予測することが可能となると期待されている (以降、本アプローチを BBB/PBPK 法と称する)。BBB/PBPK 法が確立すれば、効果的かつ効率的な中枢神経系疾患治療薬の開発が促進すると期待される。しかしながら、近年様々

なヒト BBB モデルの開発が試みられているものの、これまでに BBB/PBPK 法の妥当性や実現可能性について検討された報告は存在しない。これを明らかとするためには、まずヒト BBB を的確に再現する *in vitro* ヒト BBB モデルを確立すること、さらにはそのモデルから得られた薬物の脳移行性パラメータが、どの程度ヒト *in vivo* を反映しているか (IVIVC, *in vitro*–*in vivo* correlation) を明らかとすることが必要である。

以上を踏まえ本研究では、新たな *in vitro* ヒト BBB モデルの確立およびそのモデルを用いて薬物の脳移行性パラメータに関する IVIVC を明らかとすることにより、BBB/PBPK 法を用いた新たなヒト脳内薬物濃度予測法構築の基盤を確立することを目的とした。これまでに、汎用性に優れたヒト不死化 BBB モデルの構築に向けて、BBB を構成する 3 種のヒト不死化 BBB 細胞のうち、BMEC 及びペリサイトのヒト不死化細胞が樹立されている^{11, 12)}。しかし、我々の知る限り、ヒト BBB モデル構築に有用なアストロサイト由来ヒト不死化細胞については、報告がない。

そこでまず第 1 章では、ヒト初代培養アストロサイトに二種類の不死化遺伝子を導入することにより、ヒト不死化アストロサイトを樹立し、その細胞機能解析をおこなった。

続いて、第 2 章ではこれらの細胞を組み合わせた 3 種共培養ヒト BBB モデル (a human immortalized cell-based BBB model, hiBBB) を構築した。また、構築した hiBBB の機能的特徴を明らかとするために、ヒト初代培養 BMEC (primary human BMEC, prHBMEC) を用いたヒト初代 BBB モデル (primary HBMEC-based models, hprBBB) との比較検証をおこなった。さらに、複数の BBB 透過性/非透過性薬物を用いた *in vitro* 透過性試験をおこない、hiBBB の薬物中枢移行性評価への応用性について検証した。

最後に第 3 章では、第 2 章で構築した hiBBB を代表的なヒト BBB モデルとして用い、BBB/PBPK 法構築に向けた薬物脳移行性パラメータに関する IVIVC 解析をおこなった。ヒト臨床データを用いたトップダウンアプローチに基づき、CNS-PBPK モデルから推定した *in vivo* ヒト脳移行性透過性パラメータと hiBBB から得られた *in vitro* ヒト脳移行性透過性パラメータの相関を解析し、BBB/PBPK 法の妥当性および実現可能性について検証した。

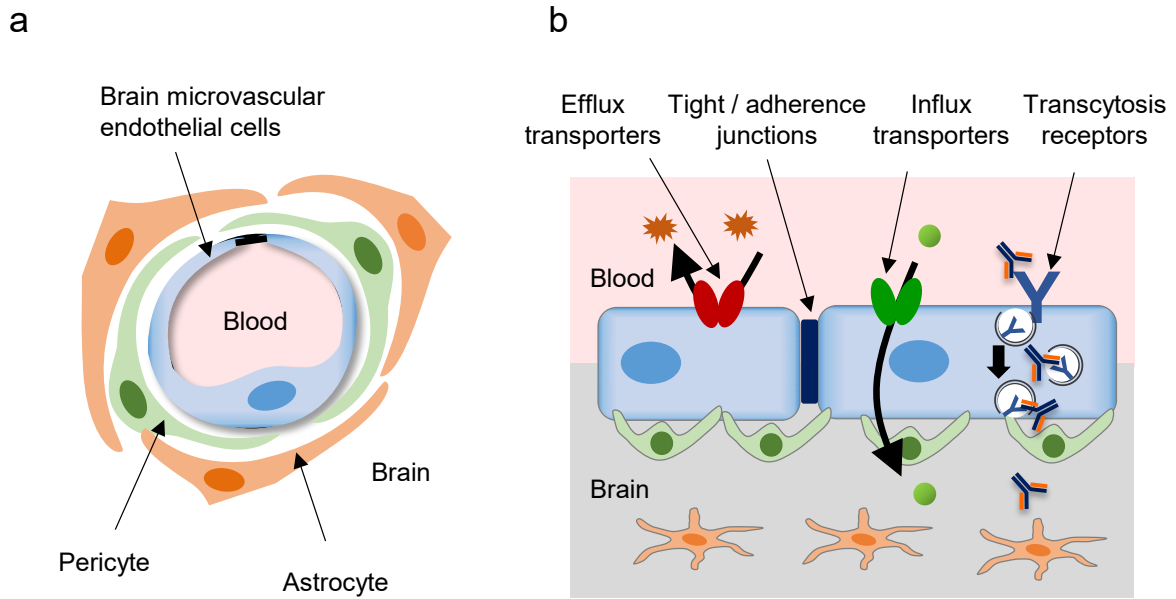


Fig. 1 Structure and functions of the BBB

(a) The structure and cell associations at the BBB. (b) Routes of transport across the BBB.

Table 1. Representative drugs and mechanisms responsible for their BBB permeability

Mechanisms	Drugs
High passive permeability	Propranolol
P-gp	Phenytoin, Quinidine, Risperidone, Gabapentin, Desloratadine
BCRP	Dantrolene, Methotrexate
LAT1	Gabapentin
H ⁺ /OC ⁺ antiporter	Pyrilamine, Memantine, Diphenhydramine
Low passive permeability	Atenolol, Cefotaxime, Vancomycin

第1章

ヒト不死化アストロサイトの樹立とその機能解析

第1節：序論

アストロサイトは、脳内に存在するグリア細胞の一種であり、星型の細胞形態を示すことから星状膠細胞と呼ばれている。中枢神経系において、アストロサイトは最も数の多い脳細胞とされ、その生理学的役割は多岐に渡る。例えば、アストロサイトに発現する種々の神経伝達物質トランスポーターは、グルタミン酸やアデノシンなどの神経伝達物質を細胞内に取り込むことにより、これらの細胞外濃度調節を担うことが知られている¹³⁻¹⁵⁾。さらに、アストロサイトは液性因子を介したシグナル伝達により、**BMEC** における密着結合の形成やトランスポーターの機能を調節することにより、**BBB** 機能の形成と維持に必須の役割を果たしており、*in vitro* **BBB** モデル構築においても、アストロサイトと共培養することにより、**BBB** モデルの機能が向上することが知られている^{16, 17)}。したがって、アストロサイトは *in vitro* **BBB** モデルが生体本来の **BBB** 機能を発揮するために極めて重要な細胞であることから、**BBB** モデル構築に有用なヒトアストロサイトの樹立が求められている。

BBB モデル構築に用いられる細胞として、しばしば動物由来の **BBB** 細胞が使用されているが、**BBB** の構造や機能、特にトランスポーターの発現量にはヒトと齧歯類で種差が知られており¹⁸⁻²⁰⁾、ヒトへの外挿性を高めるためには、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* **BBB** モデルを構築する必要がある。アストロサイトについても、齧歯類とヒトには形態学的、機能的な種差が報告されており²¹⁾、ヒトのアストロサイトは齧歯類よりも複雑かつ多彩な機能を有すると考えられている。

一般に、ヒト **BBB** モデルの構築には、ヒト初代培養細胞が用いられることが多い^{17, 22-24)}。ヒト初代培養細胞は、優れた細胞機能を示す一方で、入手が困難であり、増殖能が低く長期継代培養が不可能である点で汎用性に乏しい。またロット間差による実験間誤差のほか、高コストなどの課題も抱えている。そのため、ヒト初代培養細胞を用いたヒト **BBB** モデルの創薬応用は現実的ではない。

このヒト初代培養細胞が抱える汎用性の課題を克服する手段として、ヒト不死化細胞の利用が考えられる²⁵⁻²⁷⁾。細胞の不死化方法の1つとして、初代培養細胞に2種の不死化遺伝子 **temperature-sensitive simian virus 40 large tumor-antigen (tsSV40T)** 遺伝子および **human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit (hTERT)** を導入する方法が知られている²⁸⁾。**tsSV40T** は細胞周期を抑制する **p53** や **retinoblastoma gene product (pRb)** に結合し、それらの機能を抑制することで、細胞に温度条件感受性の不死化特性を付与する。具体的には、**tsSV40T** は培養温度 **33°C** 条件下では安定に発現して細胞周期を促進するが、一方で **37°C** 以上では急速に分解され、それに伴い不死化シグナルが解除され再分化が可能になる^{29, 30)}。

hTERT は、テロメア配列を伸長し、細胞分裂に伴うテロメア短縮による細胞増殖停止および遺伝子損傷を防ぐ役割を担う。したがって、これら 2 つの不死化遺伝子を導入して作製された条件的不死化細胞は、一般的に増殖能に優れ、長期継代培養が可能であることに加え、不死化の解除により親細胞である初代培養細胞の機能を発揮すると考えられる。

このような不死化細胞の利点を踏まえ、これまでにヒト初代培養細胞に 2 種類の不死化遺伝子 (tsSV40T および hTERT) を導入することにより、ヒト条件的不死化 BMEC (human brain microvascular endothelial cells/conditionally immortalized clone 18, HBMEC/ci18)、およびヒト条件的不死化ペリサイト (human brain pericyte/conditionally immortalized clone 37, HBPC/ci37) の 2 種類のヒト不死化 BBB 細胞の開発が行われてきた^{11, 12)}。しかしながら、未だ BBB モデル構築に有用なヒト不死化アストロサイトは樹立されていない。

そこで第 1 章では、ヒト不死化 BBB モデル構築に向け、細胞不死化技術を用いて汎用性および機能性に優れたヒト不死化アストロサイトを樹立すること、さらにその分化形質を明らかとすることを目的とした。

第2節：実験材料・方法

1-2-1 細胞およびその培養方法

正常ヒトアストロサイト (primary human astrocytes, prHASTR, lot number 802268 または 1140858) は Life Technologies 社 (Carlsbad, CA, USA) より購入した。培地は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies) に 1×N2 サプリメント (Life Technologies) および 100 units/mL penicillin G – 100 µg/mL streptomycin (pen/st) (Life Technologies) を加えたもの (以後 Complete Astrocyte Medium, CAM とする) に 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies) および 20 µg/mL human Epidermal Growth Factor (EGF) (Life Technologies) を加えたものを使用し、細胞は 5%CO₂ / 95% air を気相とした 37°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 collagen type- I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) でコートしたものを使用した。

ウイルスパッケージング細胞である 293FT 細胞は Invitrogen より購入した。培地は、DMEM に 10% (v/v) FBS (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA)、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen) 、2 mM GlutaMAXTM (Invitrogen) および pen/st を加えたものに、G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) を 500 µg/mL の濃度で添加して使用した。細胞は 5% CO₂ / 95% air を気相とした 37°C の CO₂ インキュベーターにて培養した。

1-2-2 培地添加剤条件および培養温度条件の最適化

以下で述べる培養条件については Table 2 にまとめた。CAM に 4 µg/mL Blasticidin S HCl (Invivogen, San Diego, CA, USA) を加えた (以下 CAM + Bla とする) ものを基礎培地とし、それに対して培養培地添加剤条件 [FBS (10%含有または不含)、dBcAMP (不含または 1 mM 含有)] および培養温度条件 (33°C または 37°C) を組み合わせた 8 種の培養条件を検討した。

まず、CAM + Bla に 10% (v/v) FBS を加えた培地または加えない培地 (それぞれ CAM + Bla, FBS 10% または CAM + Bla, FBS free とする) を作製した。さらに組成変更型培地として、上記の培地を基に、dBcAMP を 1 mM 加えた培地またはその溶媒である滅菌超純水を加えた培地を作製した。さらに、培地添加剤条件変更に加え、培養温度の変更 (33°C または 37°C) を組み合わせた培養条件を検討した。ヒト不死化アストロサイト human astrocyte / conditionally immortalized clone 35 (HASTR/ci35) における培地添加剤条件および培養温度条件の変更は、Fig. 2 に示す方法に従っておこなった。HASTR/ci35 を培養ディッシュに CAM + Bla, 10%FBS を用いて播種し、33°C で培養した。播種 1 日後に培養添加材条件または培養温度条件

を上記 8 種の条件に変更した。その後 1 日培養し、最終日に形態観察、細胞の回収、細胞免疫染色またはトランスポートアッセイをおこなった。

Table 2. Composition of culture medium used in this study

Culture condition	Variously modified culture conditions							
	A	B	C	D	E	F	G	H
FBS	10%	10%	—	—	10%	10%	—	—
Temperature	33°C	37°C	33°C	37°C	33°C	37°C	33°C	37°C
dBcAMP	—	—	—	—	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM

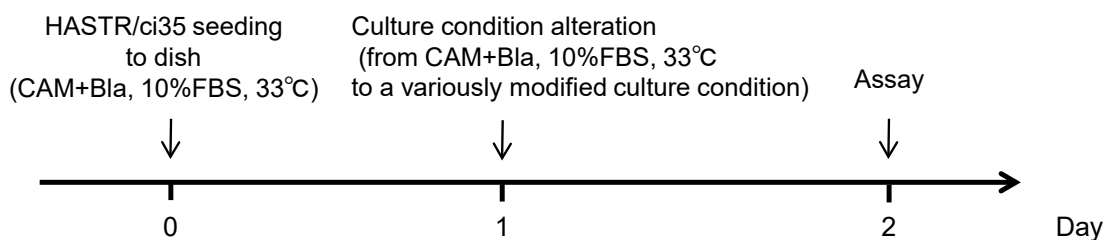


Fig. 2 Illustration of culture methods used in this study

1-2-3 ヒト不死化アストロサイトの作製

prHASTR を 1.0×10^5 cells/mL の濃度で collagen type- I でコートした 6-well プレートに播種し、tsSV40T-Lenti を 20 % (v/v) の濃度で 48 時間曝露し、トランスダクションした。このとき、Polybrene® (Sigma-Aldrich) を最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で共に加えた。続いてこの細胞を 1.0×10^5 cells/mL の濃度で collagen type- I でコートした 6-well プレートに播種し、24 時間後、hTERT-Lenti を 10 % (v/v) の濃度で 48 時間曝露し、トランスダクションした。このとき同様に、Polybrene® を最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で共に加えた。トランスダクションから 7 日後、培地に Blasticidin S HCl を 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、生き残った細胞をヒト不死化アストロサイト mixture 細胞 (human astrocyte/conditionally immortalized, HASTR/ci) とした。

HASTR/ci を CAM + Bla, 10%FBS を用いて細胞密度 1.0×10^4 cells/mL で collagen type- I でコートした 24-well プレートに播種し、33°C で培養をおこなった。細胞の増殖が認められた well 内の培地を除去し、細胞を剥離した。剥離した細胞を 1.0×10^4 cells/mL となるように CAM + Bla, 10%FBS で希釈し、播種および培養した。この操作を、理論上 1 ウェルあたり 1 細胞種以下となるまで、計 4 回繰り返しおこなうことにより、複数のクローンを得た。得られたクローンについて、細胞形態の

観察および細胞増殖能の解析、アストロサイトマーカー遺伝子の mRNA 発現解析をおこない、これら結果を比較することにより HASTR/ci35 を選択した

HASTR/ci35 の培養培地には CAM + Bla, 10%FBS 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。細胞の継代は、以下の方法により 1:1 程度の継代率で 3 日ごとにおこなった。まずディッシュ内の培地を除去し、Phosphate-Buffered saline (PBS) (-) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を加えてリンスし、溶液を除去した後、0.1 % Trypsin – EDTA phenol red free (Wako) を加え、37°C で 5 分間インキュベーションした。顕微鏡で細胞が底面から完全に剥離していることを確認した後、0.1 % Trypsin – EDTA phenol red free と同量の培地を加え、1000 μ L チップを用いて、穏やかに 15 回程度ピペティングをおこない細胞を剥離した。その細胞を新しい培地と 1 対 1 の割合で混合し、cellmatrix collagen type I -C でコートしたディッシュに播種した。

1-2-4 細胞増殖能の解析

細胞増殖能は直接細胞計測法により解析した。HASTR/ci35 を cellmatrix collagen type I -C でコートした培養ディッシュに CAM + Bla, 10%FBS を用いて、細胞密度 1.0×10^4 cells/mL で播種し、33°C で培養した。播種した日を Day0 とし、Day1 に培養方法を変更した。以降は、1 日おきに培地交換した。Day3、Day5 および Day9 (dBcAMP 添加による細胞増殖能解析に関しては Day1、Day2 および Day3) に細胞を剥離し、細胞数を計数した。これにより得られた細胞数の経日的変化から細胞増殖曲線を得た。

1-2-5 Total RNA 抽出および cDNA 合成

Total RNA 抽出は、ISOGEN II (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いてプロトコールどおりにおこなった。ゲノム DNA の混入の有無は、Table 3 に示すプライマー (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) F, R) および Go Taq[®] Green Mater Mix (Promega, Madison, WI, USA) を用いた PCR により確認した。ゲノム DNA の混入が認められた場合には DNase I (Roche Diagnostics K. K., Tokyo, Japan) にて除去した。cDNA の合成は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA) および付属の random hexamer primer を用いてプロトコールどおりにおこなった。

1-2-6 Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記 1-2-5 で合成した cDNA を template とし、Table 3 に示すプライマーおよび Go Taq[®] Green Mater Mix を用いた PCR により解析した。解析対象とする遺伝子

は、不死化遺伝子 (tsSV40T および hTERT)、アストロサイトマーカー遺伝子 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1 [ALDH1L1]、glial fibrillary acidic protein [GFAP]、Vimentin、S100 β 、fibroblast growth factor receptor 3 [FGFR3]、serine racemase [SR]、glutamine synthetase [GS]、aquaporin-4 [AQP4] および brain lipid-binding protein [BLBP])、グルタミン酸トランスポーター遺伝子 (excitatory amino acid transporter [EAAT] 1 および EAAT2)、アデノシントランスポーター遺伝子 (equilibrative nucleoside transporter [ENT] 1 および ENT2) である。内部標準遺伝子には GAPDH mRNA を用いた。

Table 3. Primers used in RT-PCR

Primer name ^a	Sequence (5' > 3')
SV40T F	CGC CAT GGA TAA AGT TTT AAA CAG AGA GG
SV40T R	TTT TAT GTT TCA GGT TCA GGG GGA GGT
hTERT F	AAT AGT CGA CGC GAT GCC GCG CGC TC
hTERT R	CCG CGT CGA CTC AGT CCA GGA TGG TC
ALDH1L1 F363	AGC AGT GAC GGG TGA T
ALDH1L1 R679	GTG ATT GGA CAG AGC C
GFAP F281	TGG AGC TCA ATG ACC GCT TT
GFAP R542	GCCTCAGGTTGGTTTCATCC
Vimentin F626	CAA TGC GTC TCT GGC ACG TCT T
Vimentin R852	TCA GCAAAC TTG GAT TTG TAC C
S100 β F228	CTC ATC GAC GTT TTC CAC CAA T
S100 β R280	CTC CTT CAG TTC GGA TTT CTT CA
FGFR3 R1437	CCG TGA AGA TGC TGA AAG ACG A
FGFR3 R1707	GAC ACC AGG TCC TTG AAG GTG A
SR F126	CGA GAT TCT ATC CAC CTC ACA CC
SR R394	GTC TGG GGC ACC ACAATA TAA G
GS F1102	CAG TCT GAG GGT TCC AAC AGT G
GS R1309	TAT ACT CCT GCT CCA TGC CAA A
AQP4 F267	CGA CAT GGT TCT CAT CTC CCT T
AQP4 R617	ACA TCA GTC CGT TTG GAA TCA C
BLBP F	AGG ATG GCA AAA TGG TTA TGA
BLBP R	TCA TAG TGG CGA ACA GCA AC
EAAT1 F741	ATG AGG ATG TTA CAG ATG CTG G
EAAT1 R919	CAG GAT GGA TGA TGA TGA CAA T
EAAT2 F1221	CTG TTG TCT CTC TGT TGA ACG
EAAT2 R1519	CAA CCA CTT CTA AGT CCT TGA TTG
ENT1 F579	TGG ATG CTC TGC CCT TCT TTG T
ENT1 R1096	CTC AAC AGT CAC GGC TGG AAA C
ENT2 F1471	CAT GTG CCT GGC GCC CAG GCA GGT
ENT2 R1838	GAG GTC TTG TGC GAG TCA CCC CCA

^a, F and R indicate forward and reverse direction.

1-2-7 定量的 real-time PCR

上記 1-2-5 の方法に従い合成した cDNA を template とし、Table 4 に示すプライマー、KAPATM SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, Ma, USA) および Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, Tokyo, Japan) により real-time PCR をおこなった。解析対象は、アストロサイトマーカー遺伝子 (GFAP、S100β および ALDH1L1)、グルタミン酸トランスポーター遺伝子 (EAAT1 および EAAT2)、アデノシントランスポーター遺伝子 (ENT1 および ENT2) mRNA とした。内部標準遺伝子には GAPDH mRNA を用い、各遺伝子の mRNA 発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた相対定量法により解析した。

Table 4. Primers used in qPCR

Primer name ^a	Sequence (5' > 3')
ENT1 F150	AGC CAG GGA AAA CCG AGA
ENT1 R223	ACC CAG CAT GAA GAA GAT AAG C
ENT2 F940	CAA AGC TGA GCT CCT CCA GT
ENT2 R1009	CAG GGT CAG AGC TAC TTT CTG G
GFAP F1163	ACA GGA AGC TGC TAG AGG GCG A
GFAP R1249	CCA GGC TGG TTT CTC GAA TCT G
S100β F228	CTC ATC GAC GTT TTC CAC CAA T
S100β R280	CTC CTT CAG TTC GGA TTT CTT CA
ALDH1L1 F664	ATC ACC CGT CAC TGC TCC CTA
ALDH1L1 R743	CCC CCC TTT CTT ATC TCC GTG
EAAT1 F611	GTT TCG GAA TGC TTT TGT GCT GCT C
EAAT1 R688	TAT GGT CGG AGG GTA AAT CCA AGG A
EAAT2 F95	TCT CCC CAG TAC CTC TCC AG
EAAT2 R186	TGG GCA TAT TGT TGG CAC T

^a, F and R indicate forward and reverse direction.

1-2-8 細胞免疫染色法

HASTR/ci35 における tsSV40T、hTERT、GFAP、GS、EAAT1、EAAT2、ENT1、ENT2 タンパク質の検出は、以下に示す方法に従っておこなった。培養ディッシュ上に UV 滅菌したガラス板を設置し、培養ディッシュとともに cellmatrix collagen type I -C 処理をおこなった。HASTR/ci35 をコラーゲンコート処理したガラス板に CAM + Bla, FBS 10%培地を用いて 1.0×10^5 cells/mL の細胞濃度で播種し、33°Cで培養した。その後、培養条件の変更をおこない、培養最終日にアッセイをおこなった。まず培地を除去し PBS (-) で細胞層をリンスした後、BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences, New Jersey, USA) を用いて 4°Cで 30 分間インキュベートし、固定処理をおこなった。固定液を BD Perm/Wash™ (BD Biosciences) でリンスした後、0.1% Triton-X100 (Wako) を加えた PBS (-) を用いて室温で 15 分間インキュベートし浸透処理をおこなった。浸透液を BD Perm/Wash™ でリンスした後、3% Bovine Serum Albumin (BSA) (Wako) を加えた PBS (-) を用いて室温で 30 分間静置しブロッキングをおこなった。一次抗体は、Table 5 に示した抗体を Can Get Signal® A Immunostain (TOYOBO, Osaka, Japan) でそれぞれ 100 倍に希釈したものをを用い、常温で 2 時間振盪した。二次抗体は、Table 5 に示した抗体を Can Get Signal® A Immunostain でそれぞれ 200 倍に希釈したものをを用い、常温で 1 時間振盪した。二次抗体を除去した後、PBS (-) で細胞層をリンスし、antifead (0.1% (w/v) p-phenylenediamine and 68.8 % (v/v) glycerol, pH 8.0) 50 μ L を用いて細胞を封入した。核染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いておこなった。蛍光検出は、共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡 (OLYMPUSFLUOVIEW) (OLUMPUS, Tokyo, Japan) または Zeiss LSM780 (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) でおこなった。

Table 5. Antibodies used in this study

Antibody	Source	Product code
(Primary antibody)		
Mouse anti-SV40T Ag monoclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-147
Rabbit anti-hTERT monoclonal IgG	Abcam	RabMAb1531-1
Rabbit anti-GFAP monoclonal IgG	Abcam	RabMAb2301-1
Rabbit anti-EAAT1 polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-15316
Rabbit anti-EAAT2 polyclonal IgG	Cell Signaling Technology	3838S
Goat anti-ENT1 polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-48489
Rabbit anti-ENT2 polyclonal IgG	Medical & Biological Laboratories	BMP066
Rabbit anti-GS polyclonal IgG	Abcam	Ab16802
Mouse anti-MAP2 monoclonal IgG	Sigma	M9942
(Secondary antibody)		
Goat rhodamine (TRITC)- affinipure F(ab') ₂ fragment anti-rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	111-025-006
Donkey Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	Life Technologies	A21206
Donkey FITC-conjugated AffiniPure anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-20024
Goat FITC-affinipure F(ab') ₂ fragment anti-mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	115-096-006

1-2-9 トランスポートアッセイ

基質溶液は以下に示す方法により調製した。

[³H]-L-Glutamate (Glu) (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA) および非標識 Glu (Wako) を Na⁺-plus Krebs-Hesselei buffer (KHB) (NaCl 118 mM, KCl 50 mM, MgSO₄·7H₂O 1.1 mM, CaCl₂·2H₂O 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 2.5 mM, glucose 10 mM and HEPES 10 mM, pH 7.4) または Na⁺-free KHB (Na⁺-plus KHB の NaCl を Choline·Cl に、NaHCO₃ を Choline·HCO₃ に置き換えたもの) に溶解し、最終濃度 10 μM、最終放射線濃度 1.0 μCi/mL とした。

[³H]-Adenosine (Ado) (Moravsek Biochemicals, CA, USA) および非標識 Ado (Sigma-Aldrich) を Na⁺-plus KHB または Na⁺-free KHB に溶解し、最終濃度 0.1 μM、最終放射線濃度 0.5 μCi/mL とした。

阻害実験では、以下の化合物を用いた。10 μM UCPH101 (EAAT1 阻害剤, Santa Cruz Biotechnology)、1 mM Dihydrokainic acid (EAAT2 阻害剤, Abcam)、100 nM nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR) (ENT1 阻害剤, Sigma-Aldrich)、100 μM NBMPR (ENT1/ENT2 阻害剤)。

HASTR/ci35 を 24-well プレートに CAM + Bla, 10%FBS 培地を用いて 2.0 × 10⁵ cells/mL の細胞密度で播種し、33°Cで培養した。その後、培養条件の変更をおこない、培養最終日にアッセイをおこなった。細胞を 37°Cの Na⁺-plus KHB もしくは Na⁺-free KHB で 1 回リンスした後、基質溶液 200 μL を加えて、37°Cで取り込み反応を開始した。取り込み時間は、予備検討の結果より取り込み活性に直線性の認められた範囲内の 2 分間に設定した。インキュベーション後、氷冷した Na⁺-plus KHB もしくは Na⁺-free KHB で細胞を速やかに 3 回リンスし、250 μL の 0.2 % SDS を加え、室温で 5 時間振盪し、細胞溶解液とした。細胞溶解液のうち 200 μL を scintillation vial に移し、Clear-sol II (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 2 mL を加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。細胞溶解液のうち 20 μL は、DC protein assay kit II (Bio-Rad) を用いたタンパク質濃度測定に使用した。また、取り込み反応温度を 4°Cとして上述と同様の実験をおこない、トランスポーター非依存的な基質の取り込みを測定した。基質の細胞内取り込み速度は下記の式を用いて算出した。

【式】

[取り込み速度(pmol/min/mg protein)]

=[放射能(dpm)] / [基質溶液放射能(dpm/nmol)] / [採取量(mL)] × [全量(mL)]

×[1000(pmol/nmol)] / [タンパク濃度(mg/ml)] × [全量(mL)]/[取り込み時間(min)]

1-2-10 統計解析

細胞増殖能解析、定量的 **real-time PCR**、トランスポートアッセイにより得られたデータは、**single-factor ANOVA (analysis of variance between groups)** により群間の差の検定をおこなった後、有意差が認められた場合は個々のデータの差を **Student's t-test** により検定した。これら統計計算は **Excel 統計ソフト Statcel 第3版 (OMS, Tokyo, Japan)** によりおこなった。

第3節：結果

1-3-1 ヒト不死化アストロサイトの作製および細胞の単一化

レンチウイルスベクターを用いて **tsSV40T cDNA** および **hTERT cDNA** をヒト初代培養アストロサイトにトランスダクションし、**Blasticidin S** で選択することにより、ヒト不死化アストロサイト **mixture** 細胞 (**HASTR/ci**) を作製した。得られた **HASTR/ci** を単一化し、**40** 種のクローンを得た。得られた **40** 種のクローンについて、細胞形態観察および細胞増殖能解析をおこなった。細胞形態については、アストロサイトに特徴的な星状形態を指標とし、細胞増殖能については、増殖が速いものから遅いものまで幅広く選択した。その結果、星状形態を保持しつつ、増殖能が異なる **11** 種のクローンを単離した。

1-3-2 各クローンにおけるアストロサイトマーカー遺伝子の mRNA 発現解析

HASTR/ci 由来の **11** 種の各クローンの中から、最も分化形質を高く保持するクローンを選択するために、各クローンにおける代表的なアストロサイトマーカー遺伝子 (**GFAP**、**S100 β** および **ALDH1L1**) の mRNA 発現量を解析した。その結果、クローン **35** においてこれら遺伝子の最も高い mRNA 発現量が認められた (**Fig. 3**)。そこで、これを **HASTR/ci35** とし、以降の解析に用いた。

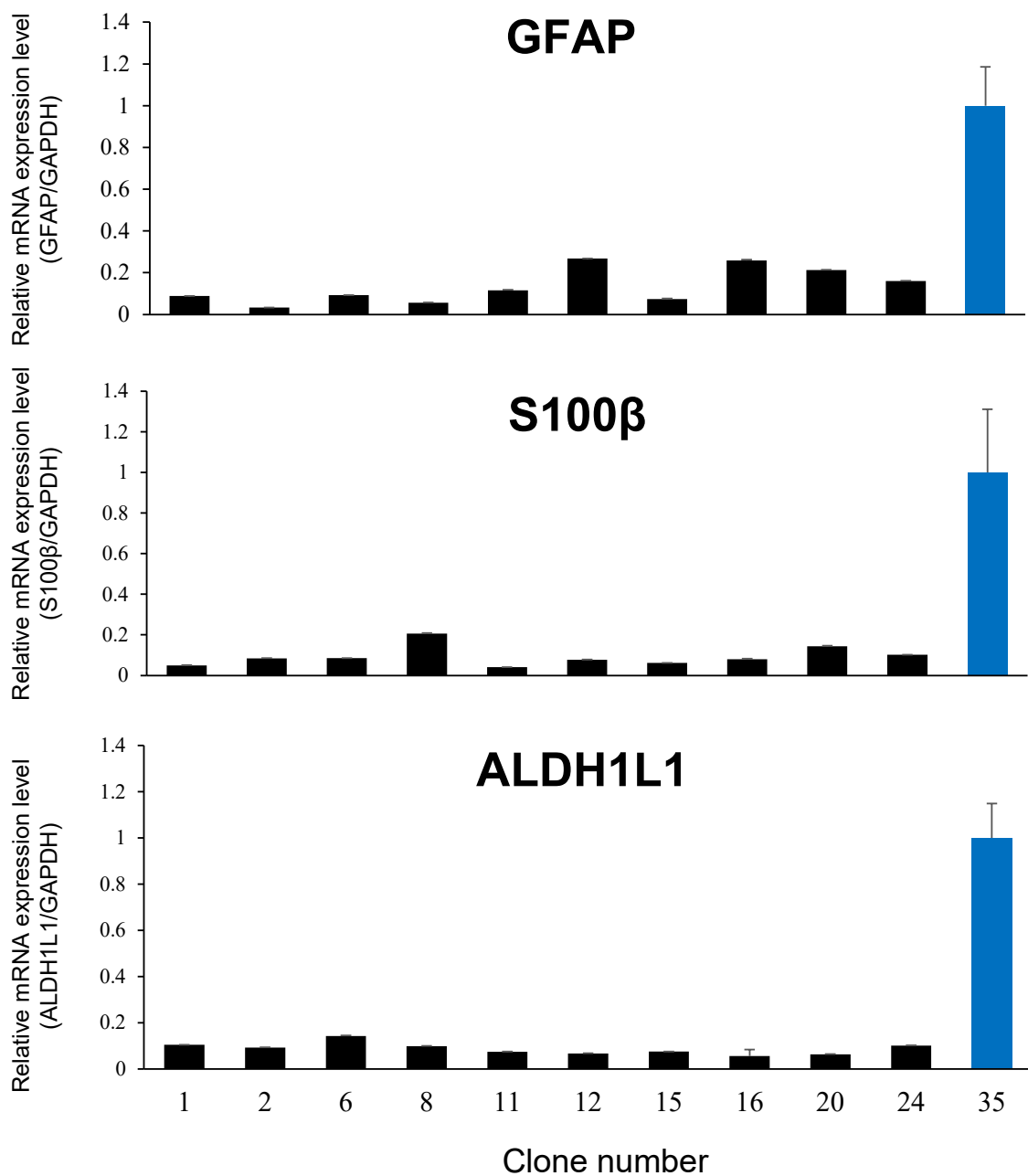


Fig. 3 Examination of representative astrocyte markers mRNA expression levels in several HASTR/ci clones

Eleven HASTR/ci clones were selected based on results of preliminary screening, and mRNA expression level of representative astrocyte marker genes (GFAP, S100β and ALDH1L1) were examined by qPCR. The relative mRNA expression level was calculated using the GAPDH mRNA level. Each result is expressed as mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate.

1-3-3 HASTR/ci35 における tsSV40T、hTERT の発現および細胞増殖能解析

HASTR/ci35 における不死化形質を明らかにするため、まず、HASTR/ci35 における tsSV40T と hTERT の mRNA およびタンパク質の発現を、それぞれ RT-PCR および細胞免疫染色法により解析した。その結果、HASTR/ci35 においていずれの mRNA およびタンパク質発現も認められた (Fig. 4a and b)。続いて、HASTR/ci35 の細胞増殖能を解析した結果、高い細胞増殖能が認められ (細胞倍化時間 = 2.5 days) (Fig. 4c)、また、細胞の増殖能は継代を重ねても (連続継代回数 > 100) 変わらなかった (Fig. 4d)。これは、増殖能が低く、継代培養が不可能であったヒト初代培養アストロサイトとは大きく異なる形質であった。

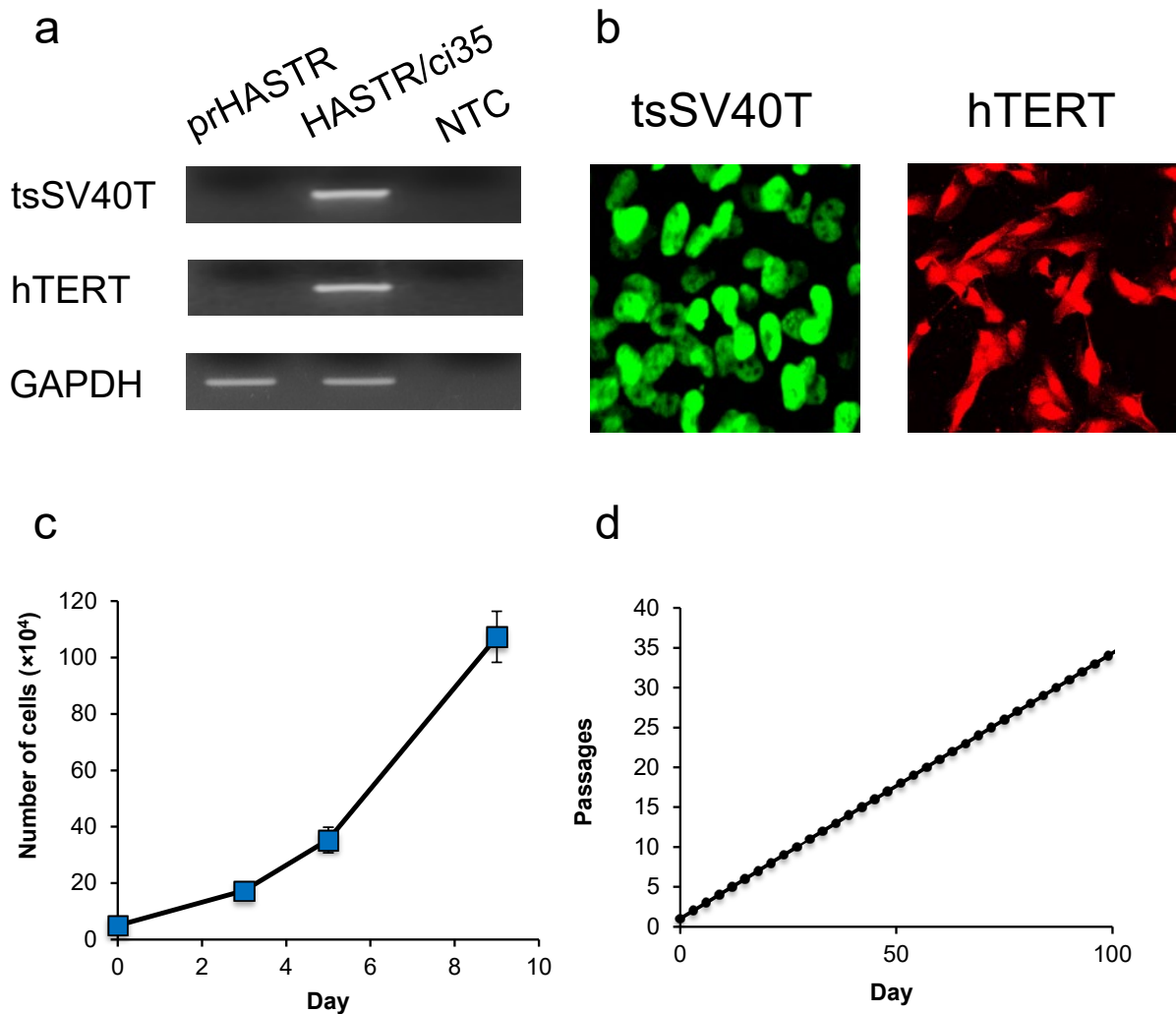


Fig. 4 Validation of immortalized cell properties in HASTR/ci35 cells

(a) tsSV40T and hTERT mRNA expression in HASTR/ci35 cells were examined by RT-PCR. Note that the primers for hTERT mRNA were designed to selectively detect lentivirus-derived hTERT mRNA. (b) tsSV40T and hTERT protein expression in HASTR/ci35 cells were examined by immunocytochemistry. In (a) and (b), the experiments were repeated three times and representative results are shown. (c) HASTR/ci35 proliferation ability was examined by drawing cell proliferation curves. The numbers of cells were counted at the days 3, 5 and 9, and the data are shown as mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. (d) Effects of prolonged culture on HASTR/ci35 cell proliferation ability were examined. The cells were successively cultured for more than 100 days.

1-3-4 HASTR/ci35 におけるアストロサイトマーカー遺伝子の発現解析

HASTR/ci35 におけるアストロサイトマーカー遺伝子 (EAAT1、EAAT2、ENT1、ENT2、vimentin、FGFR3、SR、GS、AQP4 および BLBP) の mRNA 発現プロファイルを RT-PCR により解析した。その結果、HASTR/ci35 において上記 mRNA はヒト初代培養アストロサイトと同様に発現していた (Fig. 5a)。また、細胞免疫染色法をおこなったところ、HASTR/ci35 において、GFAP および GS 遺伝子のタンパク質発現が認められた (Fig. 5b)。

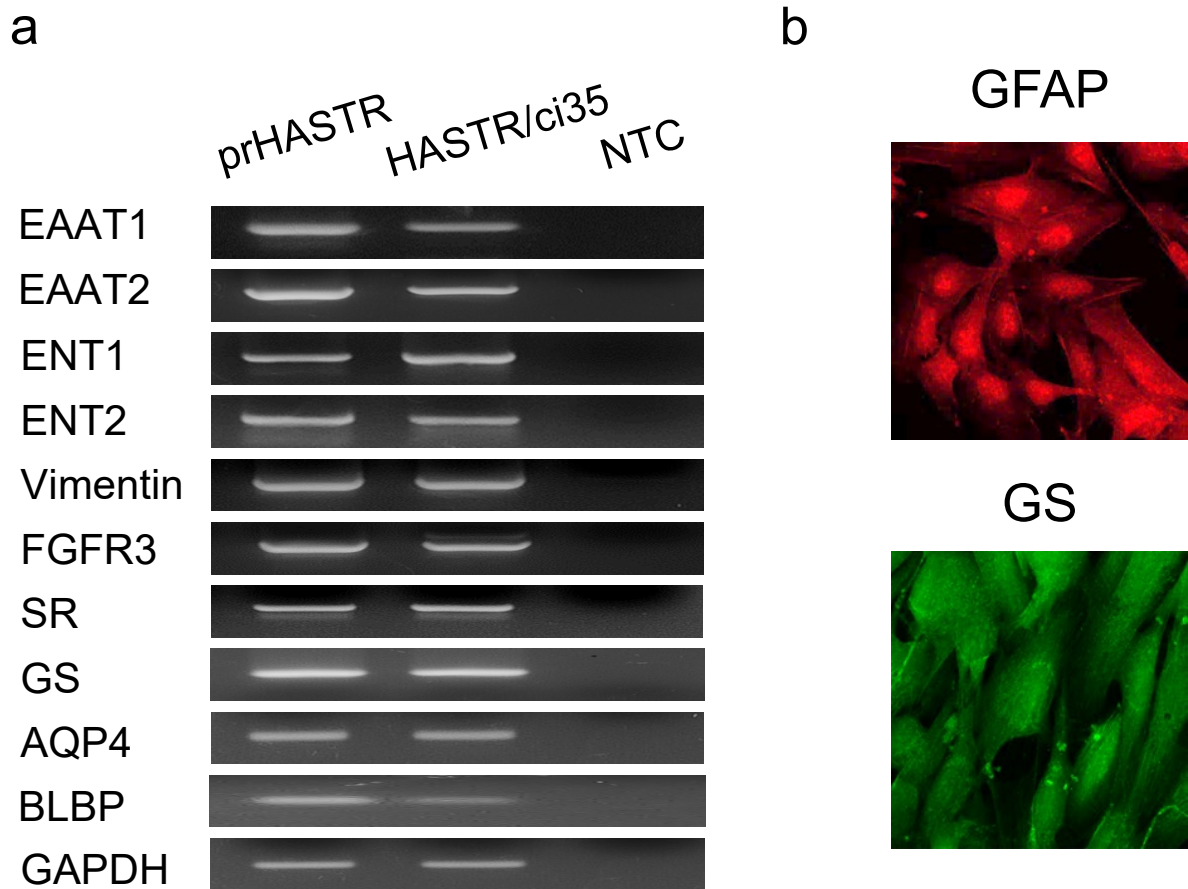


Fig. 5 Astrocyte marker gene expression profiles in HASTR/ci35

(a) mRNA expression profiles of various astrocyte marker genes (EAAT1, EAAT2, ENT1, ENT2, vimentin, FGFR3, SR, GS, AQP4 and BLBP) in HASTR/ci35 cells were examined by RT-PCR. prHASTR cells were used for a comparison, and GAPDH mRNA was used as an internal control. NTC refers to non-template control. (b) GFAP and GS protein expression in HASTR/ci35 cells were examined by immunocytochemistry. In all examinations, the experiments were repeated three times and representative results are shown.

1-3-5 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する FBS の影響

継代培養時には HASTR/ci35 の増殖能を維持するため、FBS 含有培地を用いているが、一般に、FBS は分化抑制に関与することも知られている。そこで、FBS が HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に与える影響を解析した結果、10%FBS 含有培地条件下では分化したアストロサイトに特徴的な細胞突起伸長が存在しなかったが、FBS 不含培地条件下においてはわずかに認められた (Fig. 6a)。また、細胞増殖能は、FBS 不含条件への変更により、10%FBS 添加条件の 0.6 ± 0.1 倍 ($p < 0.01$) と有意に低下した (Fig. 6b)。

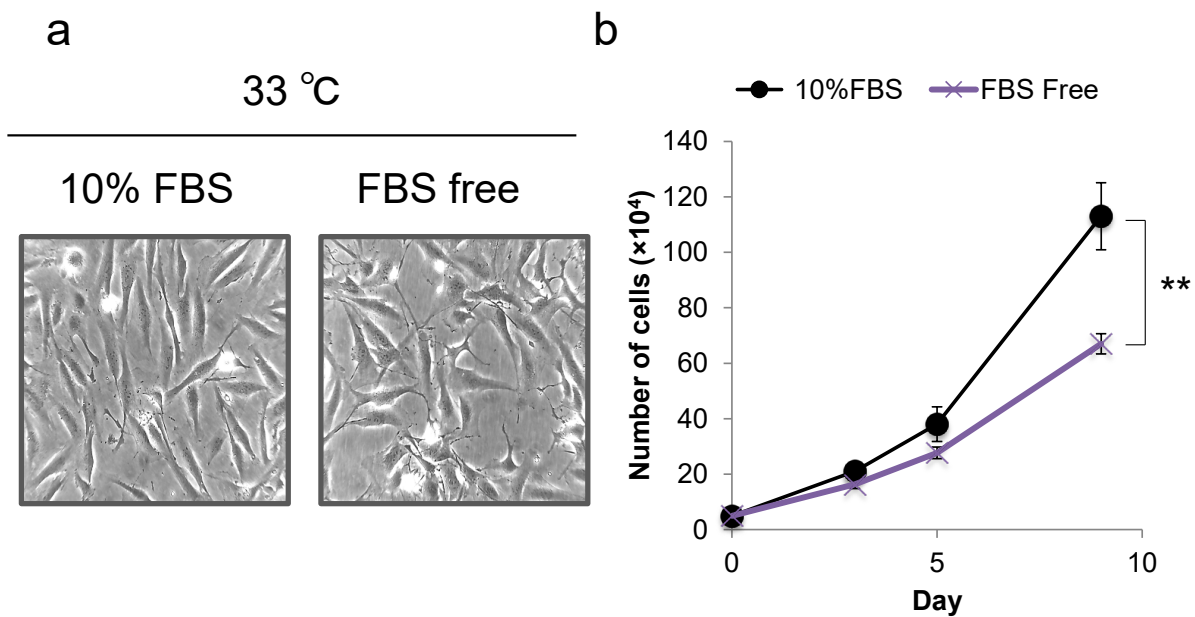


Fig. 6 Effects of serum concentration on HASTR/ci35 morphology and their proliferation ability

One day after HASTR/ci35 seeding with CAM+Bl_a, 10%FBS, the culture medium was replaced by serum-free medium. The cells were additionally cultured at 33°C or 37°C for 24 hour, after which the cell morphology (a) and their proliferation abilities (b) were examined according to the same methods as those employed in Fig. 3 and 4. The cell numbers are shown as mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. **, $p < 0.01$.

1-3-6 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する培養温度の影響

温度感受性不死化細胞株の特徴として、培養温度条件の変更 (33°Cから 37°C) による tsSV40T 不活化に依存した細胞増殖の抑制および分化形質の向上が知られている。そこで、培養温度条件 (33°Cまたは 37°C) が HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に与える影響を解析した。その結果、33°C無血清培養条件下でわずかに存在した細胞突起伸長が、37°C無血清培養条件下では顕著に認められた (Fig. 7a)。また、細胞増殖能は、37°C無血清培養条件への変更により、33°C無血清培養条件の 0.6 ± 0.1 倍 ($p < 0.001$) と有意に低下した (Fig. 7b)。

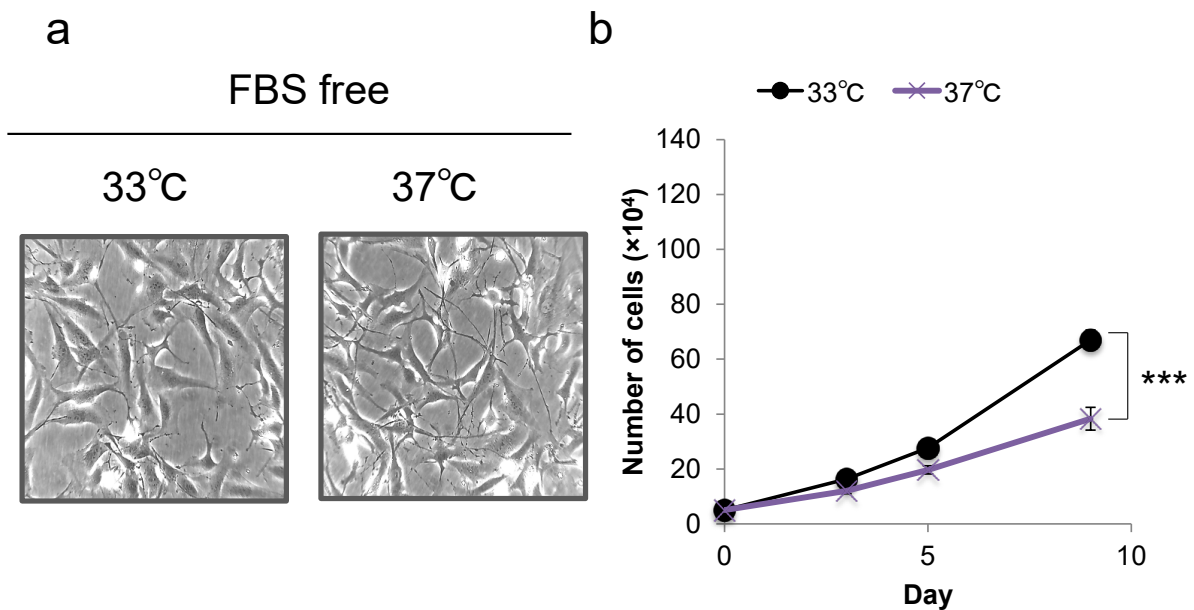


Fig. 7 Effects of different culture temperature on HASTR/ci35 morphology and their proliferation ability

One day after HASTR/ci35 seeding with CAM+Bla, 10%FBS, the culture medium was replaced by serum-free medium. The cells were additionally cultured at 33°C or 37°C for 24 hour, after which the cell morphology (a) and their proliferation abilities (b) were examined according to the same methods as those employed in Fig. 3 and 4. The cell numbers are shown as mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. ***, $p < 0.001$.

1-3-7 HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に対する dBcAMP の影響

dBcAMP は細胞透過型 cAMP アナログであり、代表的なアストロサイト分化誘導促進剤として広く用いられている。そこで、HASTR/ci35 の細胞形態および細胞増殖能に与える dBcAMP (1 mM) の影響を解析した。その結果、37°C無血清培養条件下の dBcAMP 添加により、非添加時と比べ明らかな細胞突起の伸長および細胞体からの突起伸長数の増加が認められた (Fig. 8a)。また、細胞増殖能は、dBcAMP 添加により、非添加時の 0.7 ± 0.1 倍 ($p < 0.01$) と有意に低下した (Fig. 8b)。

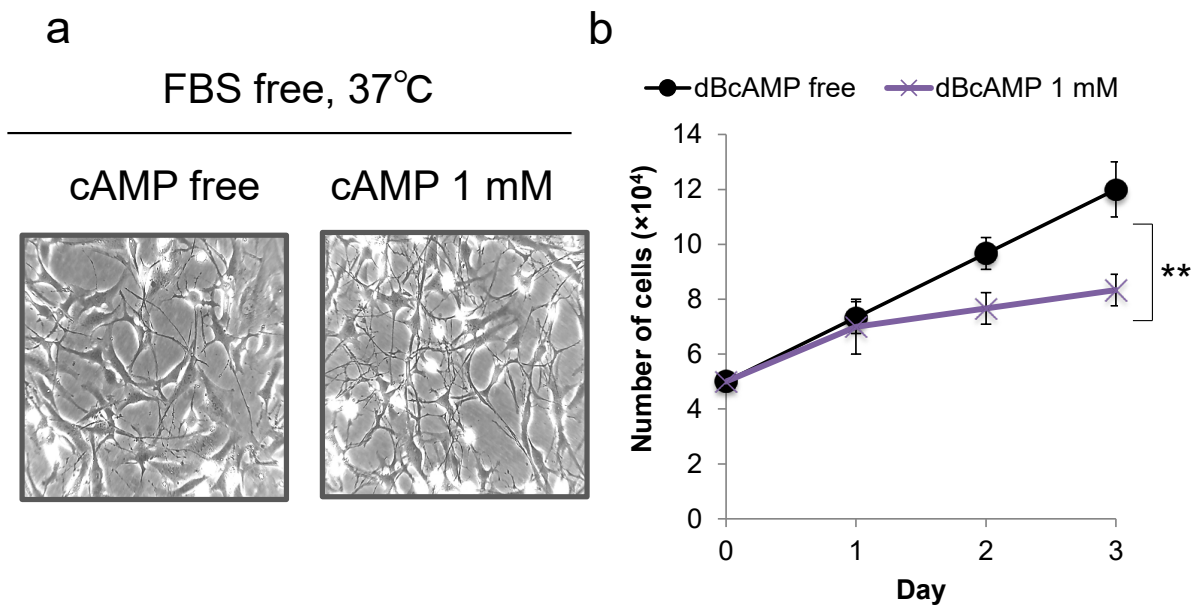


Fig. 8 Effects of cAMP on HASTR/ci35 morphology and their proliferation ability
One day after HASTR/ci35 seeding with CAM+Bl_a, 10%FBS, the culture medium was replaced by serum-free medium containing 1 mM dBcAMP. The cells were additionally cultured at 37°C for 24 hour, after which the cell morphology (a) and their proliferation abilities (b) were examined according to the same methods as those employed in Fig. 3 and 4. The cell numbers are shown as mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. ***, $p < 0.01$.

1-3-8 各種培養条件下における HASTR/ci35 のアストロサイトマーカー遺伝子の mRNA 発現量解析

上記で検討した FBS 添加条件、培養温度条件および dBcAMP 添加条件を組み合わせ、HASTR/ci35 の培養をおこない、8 種培養条件下におけるアストロサイトマーカー遺伝子 (GFAP, ALDH1L1 および S100 β) の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR により解析した。その結果、従来の培養条件である 10%FBS, 33°C, dBcAMP 不含培養条件 (培養条件 A, Table 2) と比較して、新たに確立した FBS 不含, 37°C, dBcAMP 1 mM 含有培養条件 (培養条件 H, Table 2) において、最も高いアストロサイトマーカー mRNA 発現量 (GFAP [6.0 \pm 0.5 倍, (p<0.001)], ALDH1L1 [18.2 \pm 1.5 倍, (p<0.001)] および S100 β [20.0 \pm 2.8 倍, (p<0.001)]) が認められた (Fig.9)。また、FBS 不含, 37°C, dBcAMP 不含培養条件 (培養条件 D, Table 1) において、中程度のマーカー mRNA 発現量 (GFAP [3.1 \pm 0.6 倍, (p<0.001)], ALDH1L1 [8.4 \pm 0.7 倍, (p<0.001)] および S100 β [5.3 \pm 1.1 倍, (p<0.001)]) の増加が認められた。興味深いことに、dBcAMP 添加によるマーカー mRNA の発現上昇は、FBS 不含条件下では認められたのに対し、10%FBS 含有条件下においては認められなかった。

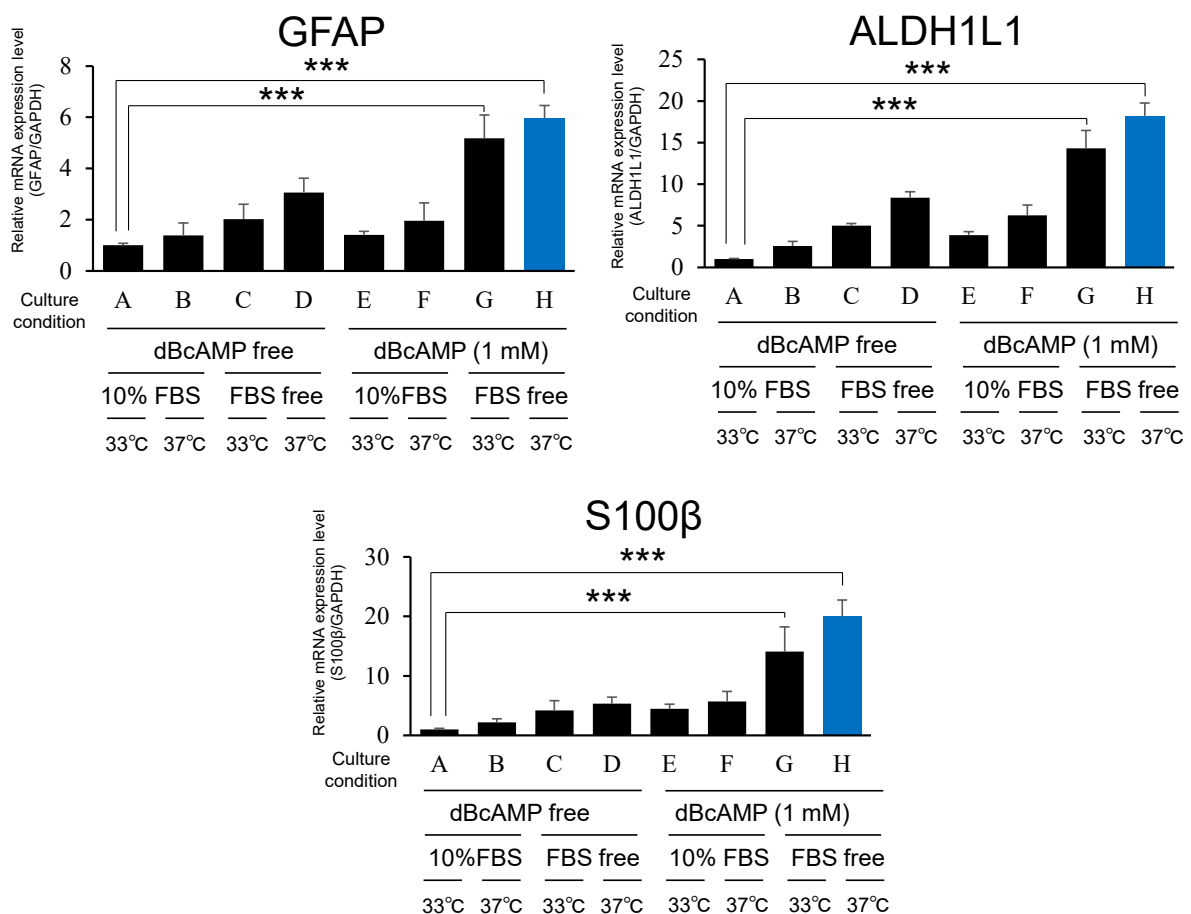


Fig. 9 Comparison of representative astrocyte marker mRNA expression levels among HASTR/ci35 cells cultured with variously modified culture conditions

One day after HASTR/ci35 seeding with CAM+Bla,10%FBS, the culture conditions were changed to either one of those shown in Table 2. The cells were further cultured for 24 hour, after which cDNA of each culture were prepared. The relative mRNA expression levels of astrocyte marker genes (GFAP, ALDH1L1 and S100 β) in the cells cultured with variously modified culture conditions were examined. The values were normalized using the GAPDH mRNA level, and the results are the mean \pm S.D. of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. ***, $p < 0.001$.

1-3-9 HASTR/ci35 の分化誘導がグルタミン酸トランスポーターの発現および機能に及ぼす影響

上記で確立した分化誘導条件で培養した HASTR/ci35 を用い、代表的なアストロサイトの分化機能である Na⁺依存性グルタミン酸取り込みトランスポーター (EAAT1 および EAAT2) の発現および機能の解析をおこなった。まず、HASTR/ci35 の分化誘導が上記遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量に与える影響をそれぞれ、定量的 real-time PCR および細胞免疫染色により解析した。その結果、分化誘導に伴い HASTR/ci35 における EAAT1 mRNA 発現量は 1.8 ± 0.4 倍 ($p < 0.05$) (培養条件 D, Table 2) および 3.1 ± 0.7 倍 ($p < 0.05$) (培養条件 H, Table 1)、EAAT2 mRNA 発現量は 1.8 ± 0.3 倍 ($p < 0.01$) (培養条件 D) および 6.0 ± 0.2 倍 ($p < 0.001$) (培養条件 H) と有意に上昇した (Fig. 10a)。また、HASTR/ci35 におけるこれらタンパク質の蛍光強度は、分化誘導に伴い増強した (Fig. 10b)。

そこで次に、HASTR/ci35 の分化誘導がグルタミン酸トランスポーター機能に与える影響をトランスポートアッセイにより解析した。その結果、グルタミン酸の細胞内取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は、Na⁺存在下、いずれの条件下においても 37°Cにおいて 4°Cよりも高く、それぞれ 55.5 ± 2.4 、 4.9 ± 0.82 (培養条件 A)、 65.2 ± 1.7 、 3.8 ± 0.45 (培養条件 D) および 74.9 ± 1.2 、 3.1 ± 0.3 (培養条件 H) であった。また、Na⁺非存在下、37°Cにおいて取り込み活性はそれぞれ 28.0 ± 1.5 、 29.0 ± 2.9 および 28.9 ± 0.9 となり、いずれの条件においても Na⁺依存的なグルタミン酸取り込み活性が認められた。さらに、Na⁺存在下、37°Cにおいて EAAT1 阻害剤である UCPH101 および EAAT2 阻害剤である DHK を用いて各トランスポーターに依存するグルタミン酸の細胞内取り込み活性を解析したところ、培養条件 A, D および H における EAAT1 依存性取り込み活性値は、それぞれ 41.9 ± 0.9 、 47.8 ± 3.0 および 51.7 ± 3.0 、EAAT2 依存性取り込みそれぞれ 46.5 ± 0.5 、 53.0 ± 1.9 および 48.5 ± 1.2 となり、いずれの条件においても EAAT1 および EAAT2 に特異的なグルタミン酸取り込み活性が認められた (Fig. 11a)。したがって分化誘導培養により、EAAT1 機能は、従来培養条件下の 1.3 ± 0.1 倍 (培養条件 D) および 1.7 ± 0.3 倍 ($p < 0.05$) (培養条件 H) に上昇し、EAAT2 機能は 1.4 ± 0.1 倍 (培養条件 D)、 3.0 ± 1.2 倍 ($p < 0.01$) (培養条件 H) に上昇した (Fig. 11b)。

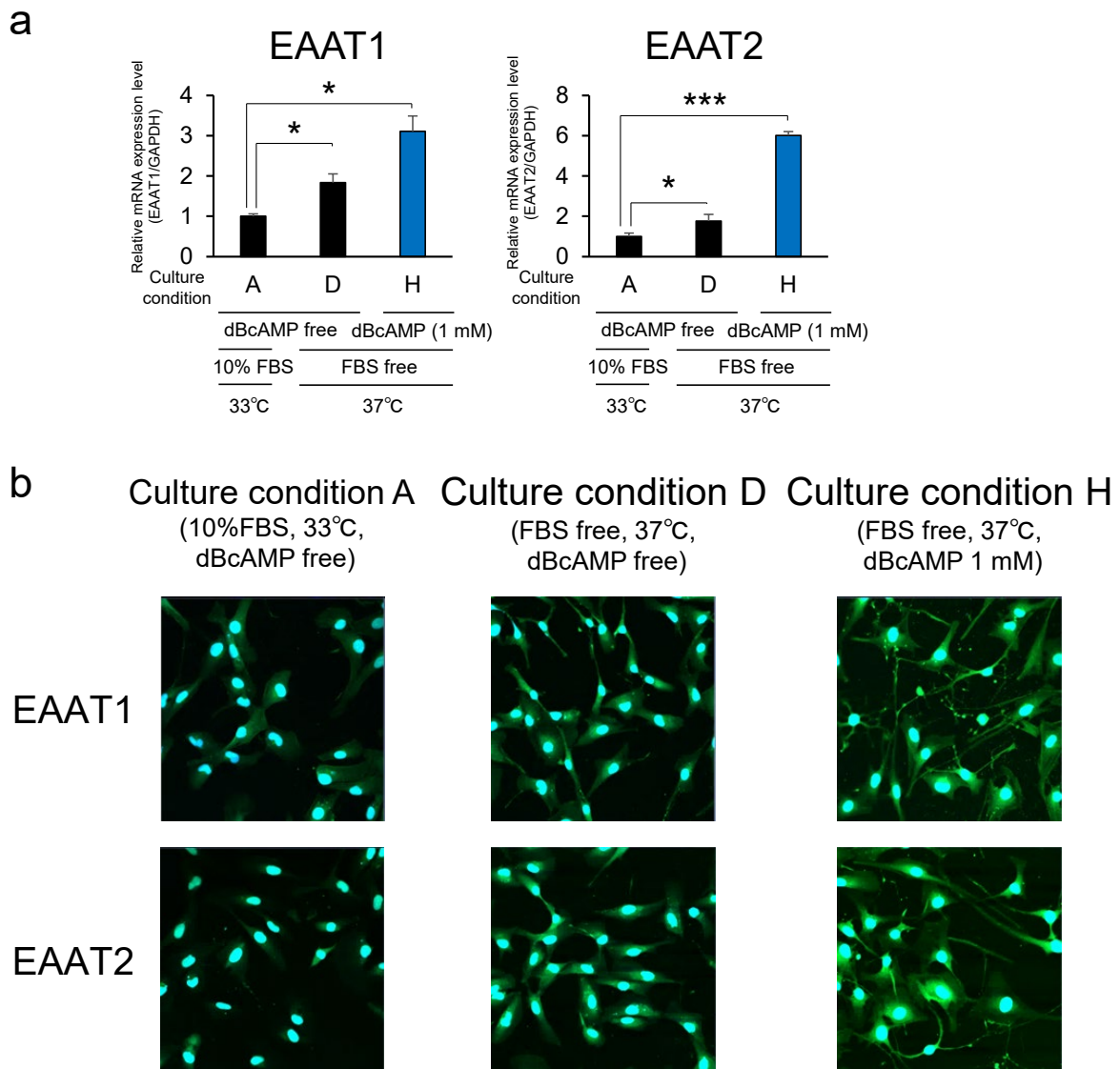


Fig. 10 Effects of differentiation induction of HASTR/ci35 on the glutamate transporters gene expression

(a) The relative mRNA expression levels of glutamate transporters in the cells cultured with the condition A, D and H (which is shown in Table. 2) were examined by real-time PCR. (b) EAAT1 and EAAT2 protein expression (green) in HASTR/ci35 cells cultured with the conditions A, D and H were analyzed by immunocytochemistry. DAPI was used for nuclear counter-staining (blue). In (b), the experiments were repeated three times and representative results are shown. In (a), each value was the mean \pm SD of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

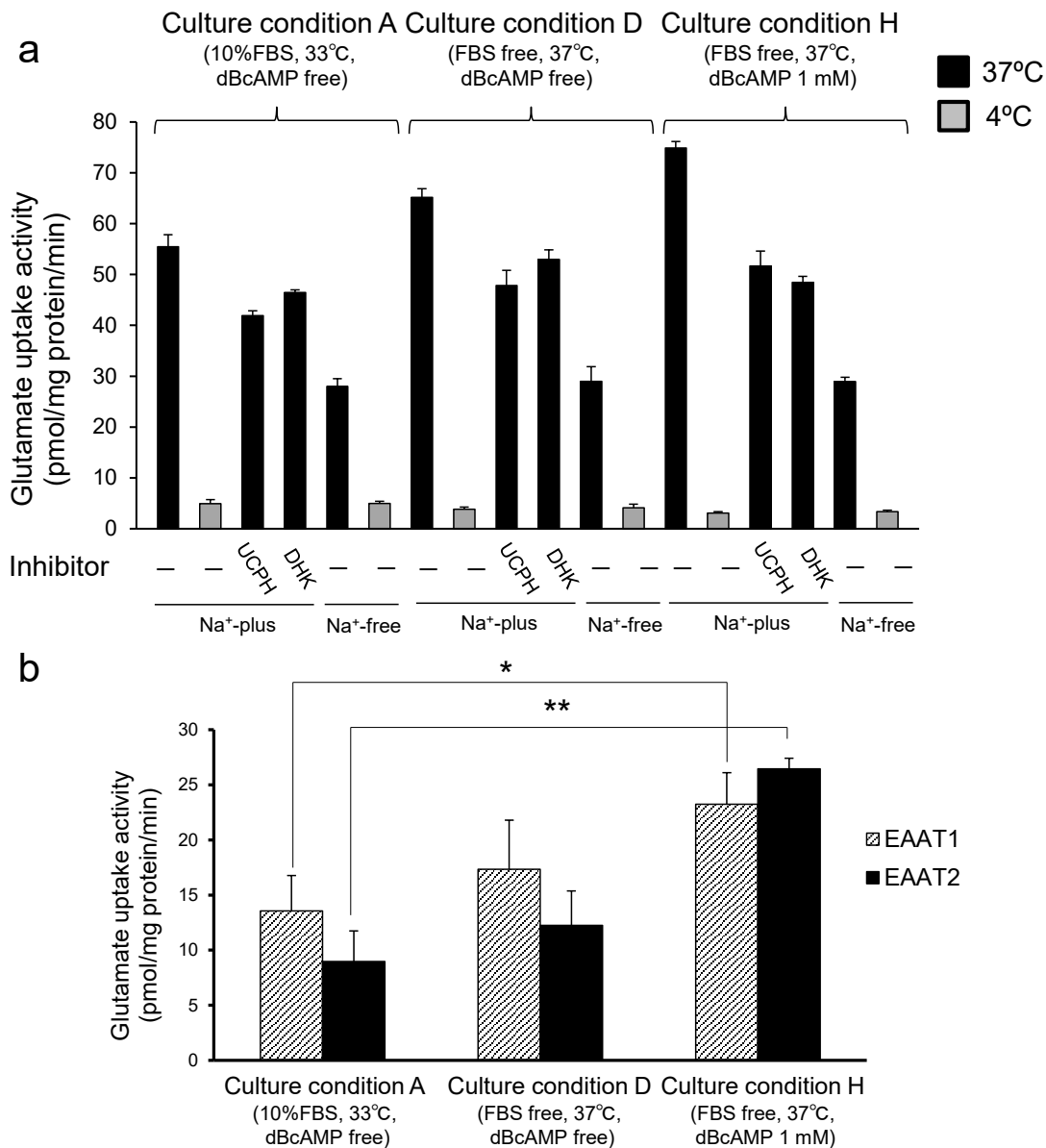


Fig. 11 Effects of differentiation induction of HASTR/ci35 on the glutamate transporters function

(a) Glutamate (10 μ M, 1.0 μ Ci/mL) uptake activity levels of HASTR/ci35 cells cultured with the condition A, D and H were examined by transport assays at 37°C in the presence or absence of Na⁺. The assays were also performed at 4°C to determine the background activity level. To separately analyze contribution of each transporter to the uptake, EAAT1-specific inhibitor (UCPH, 10 μ M), EAAT2-specific inhibitor dihydrokainic acid (DHK, 1 mM) were used in the assays. Each value was the mean \pm SD of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. EAAT1 or EAAT2-mediated glutamate uptake activity levels of HASTR/ci35 cells cultured with the condition A, D and H were shown in (b). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

1-3-10 HASTR/ci35 の分化誘導がアデノシントランスポーターの発現および機能に及ぼす影響

グルタミン酸取り込み機能に加え、 Na^+ 非依存性アデノシン取り込みトランスポーター (ENT1 および ENT2) 機能も代表的なアストロサイト分化機能として知られている。そこで、HASTR/ci35 の分化誘導に伴うこれら遺伝子の発現および機能の解析おこなった。まず、HASTR/ci35 の分化誘導が上記遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量に与える影響をそれぞれ、定量的 real-time PCR および細胞免疫染色により解析した。その結果、HASTR/ci35 の分化誘導により ENT1 mRNA 発現量には変化が認められなかったが、ENT2 mRNA 発現量は 1.3 ± 0.2 倍 (培養条件 D) および 5.4 ± 0.3 倍 ($p < 0.001$) (培養条件 H) に上昇した (Fig. 12a)。また、細胞免疫染色では、これらタンパク質発現に由来する蛍光強度は、HASTR/ci35 の分化誘導に伴い増強した (Fig. 12b)。

そこで次に、HASTR/ci35 の分化誘導がアデノシントランスポーター機能に与える影響をトランスポートアッセイにより解析した。その結果、アデノシンの細胞内取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は、 Na^+ 非存在下、いずれの条件下においても 37°C において 4°C よりも高い細胞内取り込み活性が認められ、それぞれ 3.2 ± 0.3 、 0.3 ± 0.04 (培養条件 A)、 7.2 ± 0.6 、 0.3 ± 0.02 (培養条件 D) および 11.7 ± 0.4 、 0.2 ± 0.01 (培養条件 H) であった。さらに、ENT1 を阻害する 100 nM NBMPR および ENT1/ENT2 を阻害する 100 μM NBMPR を用いてアデノシンの細胞内取り込み活性を Na^+ 非存在下、 37°C の条件で解析したところ、培養条件 A, D および H における活性値は、ENT1 阻害によりそれぞれ 1.0 ± 0.02 、 2.0 ± 0.3 および 3.0 ± 0.4 、ENT1/ENT2 阻害によりそれぞれ 0.4 ± 0.1 、 0.5 ± 0.1 および 0.5 ± 0.05 となり、いずれの条件においても ENT1 および ENT2 によるアデノシン取り込み活性が認められた (Fig. 13a)。したがって、HASTR/ci35 の分化誘導に伴い、ENT1 機能は、従来の培養条件下の 2.4 ± 0.5 倍 ($p < 0.01$) (培養条件 D) および 4.0 ± 0.4 倍 ($p < 0.001$) (培養条件 H) に上昇し、ENT2 機能は 2.2 ± 0.2 倍 ($p < 0.05$) (培養条件 D) および 3.8 ± 0.1 倍 ($p < 0.01$) (培養条件 H) に上昇した (Fig. 13b)。

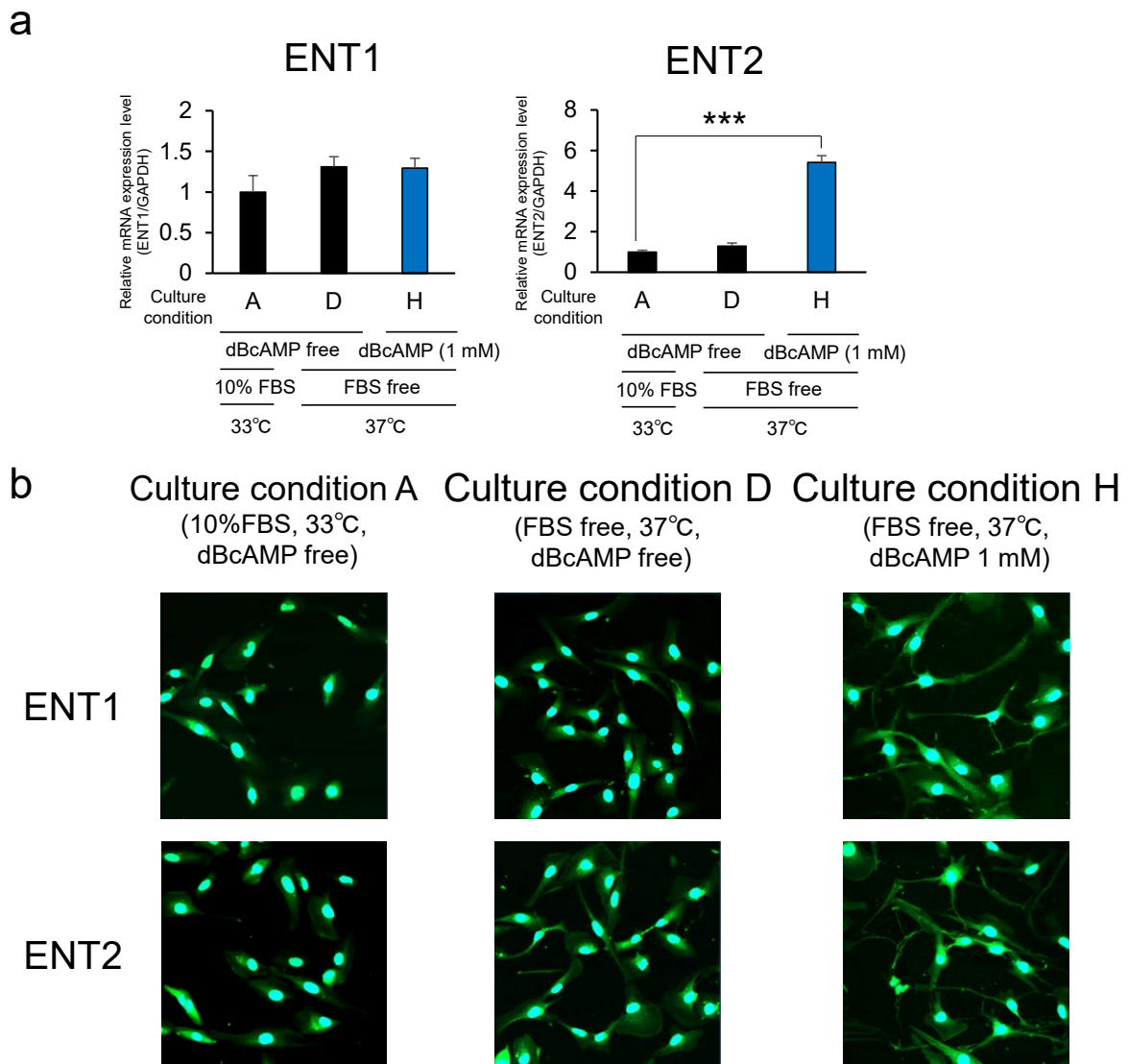


Fig. 12 Effects of differentiation induction of HASTR/ci35 on the adenosine transporters gene expression

(a) The relative mRNA expression levels of adenosine transporters in the cells cultured with the condition A, D and H were examined by real-time PCR. (b) ENT1 and ENT2 protein expression (green) in HASTR/ci35 cells cultured with the condition A, D and H were analyzed by immunocytochemistry. DAPI was used for nuclear counter-staining (blue). In (b), the experiments were repeated three times and representative results are shown. In (a), each value was the mean \pm SD of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. ***, $p < 0.001$.

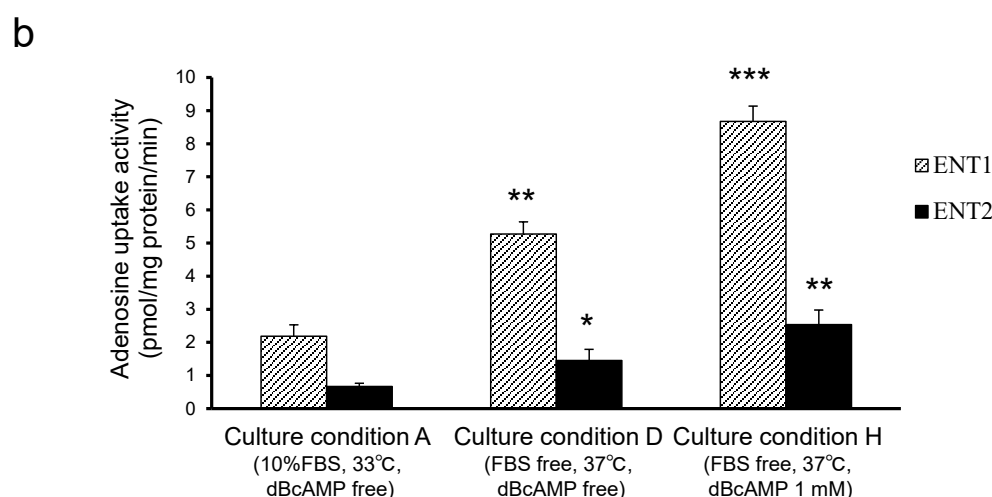
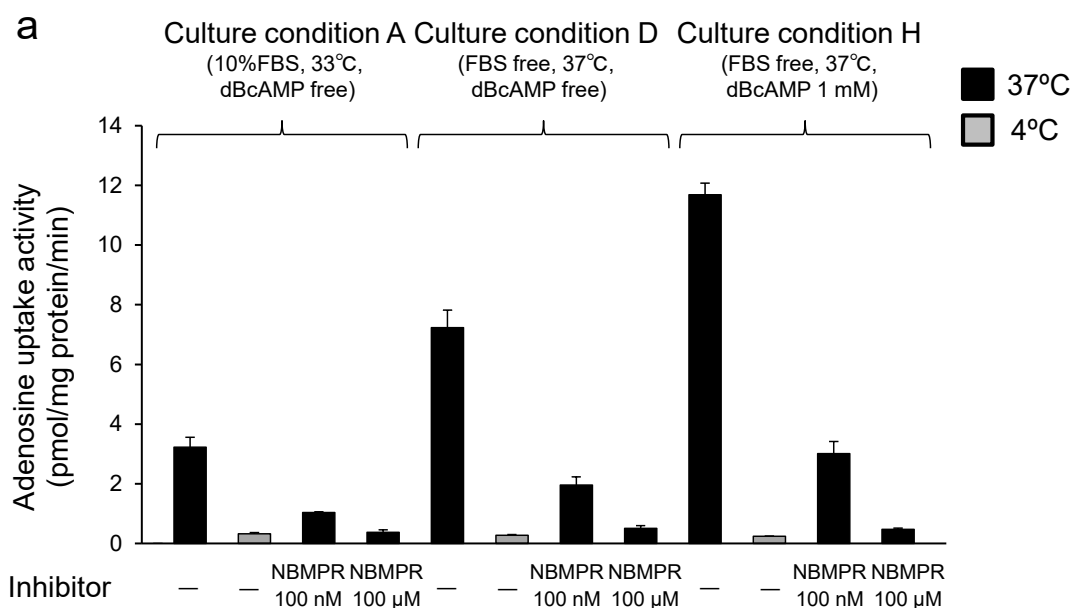


Fig. 13 Effects of differentiation induction of HASTR/ci35 on the adenosine transporters function

(a) Adenosine (50 µM, 0.5 µCi/mL) uptake activity level of HASTR/ci35 cells cultured with culture conditions A, D and H was examined by transport assays at 37°C in the absence of Na⁺. The assays were also performed at 4°C to determine the background activity level. In inhibition experiments, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR) 100 nM was used for ENT1 inhibition, whereas NBMPR 100 µM was used for both ENT1 and ENT2 inhibition. Each value was the mean ± SD of the values obtained from three separate experiments, each performed in duplicate. ENT1 or ENT2-mediated adenosine uptake activity levels of HASTR/ci35 cells cultured with culture conditions A, D and H were shown in (b). **, p<0.01 and ***, p<0.001.

第4節：考察

第1章では、優れた増殖能を有し、長期継代培養、繰り返し凍結融解が可能なヒト不死化アストロサイト HASTR/ci35 を樹立した。また、培養条件の最適化により、短時間（24時間）で HASTR/ci35 の分化形質を誘導することが可能であった。これらの結果から HASTR/ci35 は、既存のアストロサイトモデル細胞であるヒト初代培養アストロサイト及び幹性細胞由来アストロサイトが抱える増殖能の低さや、分化誘導の煩雑さ（1ヶ月以上）³¹⁾などの問題を解決する汎用性に優れた細胞であると考えられる。また、HASTR/ci35 は、グルタミン酸やアデノシンなどの神経伝達物質取り込み能など、重要なアストロサイト機能を保持していた。これらのことから、HASTR/ci35 は汎用性かつ分化形質を高く保持した新たな *in vitro* ヒトアストロサイトモデルであると考えられる。

樹立した HASTR/ci35 が、アストロサイトとしての高い分化形質を保持することを明らかとするために、HASTR/ci35 におけるアストロサイトの代表的な機能である神経伝達物質トランスポーターの機能を詳細に解析した。HASTR/ci35 は、グルタミン酸トランスポーターEAATs やアデノシントランスポーターENTs の機能を有することから、アストロサイト機能として最も重要な脳内の神経伝達物質濃度制御システムを保持していると考えられる。EAAT1 および EAAT2 は、シグナル伝達時に神経細胞から放出されるグルタミン酸の効率的な除去を担うことで、グルタミン酸過剰による神経毒性の回避に重要な役割を担うことが知られている^{32, 33)}。特に、EAAT2 の活性は *in vivo* において EAAT1 よりも優位であることが報告されている^{34, 35)}。HASTR/ci35 における EAAT2 活性の寄与は、生体内（80-90%）には及ばないものの、これまでに *in vitro* において EAAT2 機能を保持するアストロサイトは報告されておらず、HASTR/ci35 は EAAT2 を機能的に発現することが証明された初めての細胞である。また、HASTR/ci35 は EAATs 機能に加えて、シナプス間隙におけるアデノシンの濃度調節により神経活動の調節に重要な役割を担うアデノシントランスポーターENTs 機能を保持していた。

近年、脳内におけるグルタミン酸の細胞外濃度は、アストロサイトに発現する EAAT2 だけでなく、同じく細胞外に存在するアデノシンの濃度によっても協調的に制御されていることが明らかとなっている¹⁴⁾。また、アストロサイトに発現する EAAT2 と ENT1 の間には、互いにその機能を制御し合うクロストークの関与が報告されている³⁶⁾。これらのことから、脳内における細胞外グルタミン酸濃度の厳密な制御機構を明らかとするためには、アストロサイトに発現する EAAT2 と ENT1 の両者を考慮した詳細な解析が必要であると考えられる。HASTR/ci35 は、これらのトランスポーター機能を共に保持し、脳内の複雑な神経伝達物質制御機構を備えることから、アストロサイトとして高い分化形質を保持すると考えられる。したがって、

HASTR/ci35 は汎用性と高い分化形質を兼ね備えた、これまでにない新たなヒトアストロサイトモデルであると考えられる。

本研究において、HASTR/ci35 の分化誘導には、培養温度、FBS および cAMP が関与することが明らかとなった。不死化遺伝子 tsSV40T は SV40T の温度感受性変異体であり、33°C培養温度条件においては安定に発現し、がん抑制遺伝子である p53 や pRb と複合体を形成し、それら機能の抑制を介して細胞増殖を亢進することが知られている。一方で、37°C培養温度条件においては速やかに不活性化・分解され、解離した p53 および pRb を介した細胞増殖シグナルが抑制され、分化誘導が促進されることが報告されている²⁸⁾。転写因子である p21 には 2 つの p53 結合部位が存在し、p53 結合を介した転写促進に関与する。これまでに、いくつかの温度感受性不死化細胞株において、培養温度の変更 (33°C→37°C) による tsSV40T 不活性化は、細胞増殖の低下および分化の促進を引き起こし、これには p53 の活性化を介した p21 の誘導が関与することが報告されている³⁷⁾。したがって、HASTR/ci35 においても培養温度変更に伴う分化促進には、tsSV40T 不活性化による p53-p21 経路の活性化が関与している可能性が考えられる。

また、培地からの FBS を除くことにより、HASTR/ci35 における細胞増殖の抑制および分化促進が認められたことから、FBS に含まれる多種多様な成長因子やホルモンなどの因子がこれら現象に関与していると考えられる。中でも、EGF や FGF などの細胞増殖因子は、細胞増殖シグナルを介して様々な細胞において細胞増殖や分化誘導を制御することが知られている^{38, 39)}。したがって、培地からの FBS 除去に伴う増殖シグナルの不活性化が、HASTR/ci35 の分化促進に寄与した可能性が考えられる。

cAMP は中枢神経系において、発達過程や細胞の分化に重要な役割を担うことが知られており、代表的なアストロサイト分化誘導促進剤としても広く用いられている⁴⁰⁻⁴²⁾。本研究においても、HASTR/ci35 への dBcAMP 曝露により分化誘導が認められた。細胞内の cAMP レベルの上昇は、さまざまな経路の活性化に関与し、代表的な経路として PKA の活性化、CREB のリン酸化を介した転写因子の活性化が知られている⁴³⁾。したがって、dBcAMP による HASTR/ci35 の分化誘導に上記経路の活性化が関与する可能性が考えられる。興味深いことに、dBcAMP による分化誘導は FBS 存在下においては認められなかった。cAMP は、上記の経路以外にも、MAPK 経路を介した細胞増殖シグナル活性化を抑制することが知られている^{44, 45)}。一方で、FBS に含まれる増殖因子は、MAPK 経路を活性化し、細胞増殖を亢進することが知られている⁴⁶⁾。したがって、FBS 存在条件下での MAPK 経路が亢進した状態においては、cAMP による MAPK 経路の阻害が不十分であり、このことが FBS 存在下において cAMP による分化誘導が認められなかった原因の一つである可能性が考えられる。これらのことから、HASTR/ci35 における分化促進には、cAMP と増殖因子による MAPK 経路を介したクロストークが重要な役割を担っている可能性が考えられる。

以上、第 1 章では増殖能に優れ、長期継代培養、簡便な分化誘導が可能な汎用性に優れたヒト不死化アストロサイト **HASTR/ci35** を樹立した。**HASTR/ci35** はアストロサイトとしての多彩な機能を兼ね備え、高い分化形質を保持することから、*in vitro* ヒト **BBB** モデル構築に有用な細胞となる可能性が考えられた。

第2章

in vitro ヒト BBB モデルの構築とその機能解析

第1節：序論

In vitro ヒト BBB モデルは、医薬品開発において候補化合物のヒト中枢移行性を評価するための有用な創薬ツールとなることが期待されている。最も単純な BBB モデルは、BMEC のみを単層培養した単独培養モデルである。しかし、生体内と同様に、BBB モデル構築においても BMEC が BBB としての形質を獲得するためには、周囲に存在するアストロサイトおよびペリサイトとの細胞間相互作用が重要な役割を果たすことが知られている^{47, 48)}。実際に、BMEC 単独培養系と比較して、アストロサイトおよびペリサイトとの 3 種共培養系において、高い BBB 機能を発揮することが報告されている^{17, 49, 50)}。

様々な種類の BBB モデルが構築されている中で、トランスウェルシステムを用いた BBB モデルは、比較的構築が容易であり汎用性に優れることから、創薬研究においても広く使用されている。トランスウェルシステムは、上部のドナーチャンバーと下部のアクセプターチャンバーがポアフィルターにより 2 つのコンパートメントに区画された構造を持つ。このトランスウェルに 3 種類の細胞を共培養する際には、インサートの内部に BMEC、インサートの裏側にペリサイト、プレートの底面にアストロサイトを播種する方法が、生体の BBB における位置関係を最も模倣することからよく用いられる²⁵⁾。構築した BBB モデルにおいて、ドナーチャンバー側を血液側、アクセプターチャンバー側を脳側と仮定し、ドナーチャンバー側に添加した薬物が、一定時間後にアクセプターチャンバー側に移行した量を定量することにより、薬物の脳移行速度を簡便かつ定量的に評価することが可能である^{51, 52)}。

第1章で樹立したヒト不死化アストロサイト HASTR/ci35 を含め、これまでに BBB を構成するヒト不死化 BMEC (human brain microvascular endothelial cells/conditionally immortalized clone 18, HBMEC/ci18) およびヒト不死化ペリサイト (human brain pericyte/conditionally immortalized clone 37, HBPC/ci37) の 3 種類のヒト不死化 BBB 細胞の開発が行われてきた^{11, 12)}。これらのユニークな不死化特性を有する 3 種類のヒト不死化 BBB 細胞を組み合わせる構築される hiBBB は、既存のモデルよりも汎用性に優れ、かつ BBB 形質を高く保持することが期待され、創薬研究に広く応用可能であると考えられる。

そこで、第2章ではヒト不死化 BBB 細胞を用いた hiBBB を構築し、その機能特性を明らかとすることを目的とした。

第2節：実験材料・方法

2-2-1 細胞およびその培養方法

HASTR/ci35 は第1章で樹立したもの、HBMEC/ci18 および HBPC/ci37 は東京薬科大学で樹立されたものを用い、5%CO₂/95%air、33°Cで培養した。prHBMEC（正常ヒト脳皮質由来）は Cell Systems (Kirkland, WA, USA) より購入し（ロット番号：376.02.03.21.2F および 376.03.04.01.2F）、HBMEC/ci18 細胞と同じ培地で5%CO₂/95%air、37°Cで培養した。prHBMEC は、透過性実験では継代数4、mRNA解析では継代数5~7の細胞を使用した。培養ディッシュはコラーゲン-タイプIでコーティングされたものを使用した。使用した培地に関する情報は Table 6 に示した。

HBMEC/ci18 は、内皮細胞用培地 (Vasculife complete medium, Vas-comp) で培養した。HASTR/ci35 および HBPC/ci37 は、それぞれアストロサイト増殖用培地 (Astrocyte growth medium, AGM) およびペリサイト用培地 (Pericyte medium, PM) で培養した。各培地の組成は以下の通りである。

- Vas-comp：基礎培地 Vasculife basal medium (クラボウ, 大阪, 日本) に添加剤として 5 ng/mL human fibroblast growth factor-basic (hFGF-b)、50µg/mL ascorbic acid、1 µg/mL hydrocortisone (HC)、15 ng/mL human insulin-like growth factor-1 (hIGF-1)、5 ng/mL human epidermal growth factor (hEGF)、5 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF)、0.75 unit/mL heparin、10 mM L-glutamine、2% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (全てクラボウから購入)、100 units/mL-100µg/mL penicillin streptomycin (pen/st) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) および 4µg/mL blasticidin S (InvivoGen, San Diego, CA) を加えたもの。
- AGM：基礎培地 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) high-glucose GlutaMAX pyruvate (Thermo Fisher Scientific) に添加剤として 1% (v/v) N2 supplement with apo-transferrin (Wako)、10% (v/v) FBS (Thermo Fisher Scientific)、100 units/mL-100µg/mL pen/st および 4µg/mL blasticidin S を加えたもの。
- PM：基礎培地 pericyte basal medium に添加剤として 2% (v/v) FBS、1% (w/v) pericyte growth factors、1% pen/st (全て ScienCell, San Diego, CA から購入) および 4µg/mL blasticidin S を加えたもの。

2-2-2 hiBBB の構築

hiBBB は 3 種のヒト不死化 BBB 細胞 (HBMEC/ci18、HASTR/ci35 および HBPC/ci37) をトランスウェルシステムで共培養して構築した。共培養方法の概略については Fig. 18a に示した。具体的には、まず細胞培養インサート (12 ウェルタイプ, translucent polyethylene terephthalate, 0.4 μm high-density pores, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA, cat# 353494) は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ タイプ IV コラーゲン (新田ゼラチン, 大阪, 日本) および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ フィブロネクチン (Thermo Fisher Scientific) の混合溶液を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートしてコーティングした。混合溶液を除き風乾させた後、phosphate-buffered saline (PBS) (-) で二度洗浄してから使用した。hprBBB モデルは、3 種類の細胞のうち HBMEC/ci18 を prHBMEC に置き換えることで構築した。ただし、Fig. 18a で示したスキームのうち、step3 の培養温度を 37 $^{\circ}\text{C}$ で実施し、それ以外は hiBBB と同様の手順で構築した。

共培養開始の 2 日前 (D-2) に HASTR/ci35 (2.5×10^4 cells/cm²) を 12 ウェルプレートの底面に、HBPC/ci37 (3.0×10^4 cells/cm²) をインサートの裏側に播種した (Step1)。翌日 (D-1) に HASTR/ci35 および HBPC/ci37 の分化誘導のため、培養温度の変更 (33 $^{\circ}\text{C}$ から 37 $^{\circ}\text{C}$) および分化誘導培地への変更 (HASTR/ci35 の培地を AGM からアストロサイト分化誘導培地 [Astrocyte differentiation medium, ADM] に変更) をおこなった (Step2)。その 24 時間後 (D0) に HBMEC/ci18 (1.3×10^5 cells/cm²) を内皮細胞分化誘導培地 (Vas-comp VEGF/hEGF free, Vas-comp V/E free) 培地を用いて HBPC/ci37 が播種されたインサートの内側に播種した。その後、HASTR/ci35 が播種されたプレート内の培地を ADM から脳実質培地 (brain parenchyma medium, BPM) に変更し、そこに HBMEC/ci18 および HBPC/ci37 が播種されたインサートをセットして 33 $^{\circ}\text{C}$ で培養することで 3 種共培養を開始した (Step3)。共培養から 24 時間後 (D1) に各種解析をおこなった。モデル構築に用いた培地に関する情報は Table 7 に示した。2-2-1 で組成を示した以外の培地で、BBB モデル構築に用いた培地の組成は以下の通りである。

- ADM : AGM から FBS および blasticidin S を除き、1 mM dibutyryl cyclic AMP (dBcAMP) (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) を加えたもの。
- Vas-V/E free : Vas-comp から VEGF、hEGF および blasticidin S を除いたもの。
- BPM : 基礎培地 Neurobasal medium (Life Technologies) に、添加剤として 1% (v/v) N2 supplement with apo-transferrin (Wako)、2 mM L-glutamine (Wako)、100 units/mL-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pen/st を加えたもの。

2-2-3 RNA 抽出、cDNA 合成およびリアルタイム定量 PCR (qPCR)

RNA 抽出には ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いた。cDNA 合成には、PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラ, 滋賀, 日本) を用いた。qPCR は Table 7 に示すプライマーセットを用いておこない、PCR の増幅効率が 1 に近いことを確認した。結果は delta-delta-CT 法を用いて解析した。内部指標として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量を使用した。

2-2-4 免疫細胞染色 (Immunocytochemistry, ICC)

細胞を PBS (-) で洗浄し、4% paraformaldehyde (ナカライテスク, 大阪, 日本) を用いて 4°C、15 分間インキュベートし、固定処理をおこなった。固定液を洗浄し、0.1% triton-X を用いて室温で 15 分間インキュベートし、浸透処理をおこなった。浸透液を洗浄し、3% (v/v) bovine serum albumin (BSA) (Wako) を加えた PBS (-) を用いて室温で 45 分静置しブロッッキングした。一次抗体を Can Get Signal immunostain solution A (東洋紡, 大阪, 日本) で各希釈倍率に希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。二次抗体を Can Get Signal immunostain solution A で各希釈倍率に希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体を PBS (-) で洗浄後、各サンプルは fluoro-keeper antifade reagent (0.1% [w/v] p-phenylenediamine and 68.8% [v/v] glycerol, pH 8.0) で封入した。核カウンター染色には、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を使用した。蛍光検出には、Zeiss LSM780 共焦点顕微鏡 (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いた。使用した抗体に関する情報は Table 8 に示した。

2-2-5 RNA-sequencing とデータ解析

prHBMEC と HBMEC/ci18 それぞれの total RNA (各 200 ng) を RNA-sequencing に使用した (Genewiz, 東京, 日本)。品質確認後の RNA サンプルを NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, MA, USA) を用いて cDNA ライブラリー構築に使用した。NovaSeq 6000 プラットフォーム (イルミナ社, カリフォルニア州サンディエゴ, 米国) を用いて、ペアエンドシーケンス長 150bp の RNA 配列を決定した。リード配列を GRCh38 (hg38) に対してアライメントし、遺伝子発現量を HTSEQ v0.6.1 で定量した。比較解析に有効な mRNA 発現量は、fragments per kilobase of exon per million mapped reads (FPKM) 値 > 5 とした。

2-2-6 経内皮電気抵抗 (trans-endothelial electrical resistance, TEER) の測定

TEER 測定は、Millicell ERS-2 (Millipore, Darmstadt, Germany) に STX01 電極 (Millipore) を装着したものをを用い、メーカーの説明書に従って実施した。TEER 値 ($\Omega \times \text{cm}^2$) は、下記の式に基づき、細胞群の抵抗値 (R [cell]) からブランク群の抵抗値 (R [blank]) を引き、インサートの表面積 A (12 ウェルインサートの場合 0.9 cm^2) を掛けることで算出した。

$$TEER (\Omega \times \text{cm}^2) = (R [\text{cell}] - R [\text{blank}]) \times A$$

2-2-7 *In vitro* BBB 透過性試験

被験物質の BBB 透過性試験は、hiBBB または hprBBB を用いておこなった。細胞が播種されたインサートを PBS (+) (Invitrogen) で一度洗浄した後、培地を Hank's balanced salt solution with calcium and magnesium (HBSS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に交換し、それぞれ hiBBB の場合は 33°C 、hprBBB の場合は 37°C で 10 分間プレインキュベーションした。その後温度を 37°C に移し、各インサートの apical 側 (A) に被験物質を添加してアッセイを開始した。被験物質は、リバスチグミン (並木商事, 東京, 日本)、カルバマゼピン (Sigma, St. Louis, MO, USA)、メマンチン (Sigma)、ジフェンヒドラミン (Sigma)、ドネペジル (Wako, 大阪, 日本)、エファビレンツ (東京化成工業, 東京, 日本)、フェニトイン (Wako)、インドメタシン (Wako)、リスペリドン (Wako)、ガバペンチン (Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada)、アテノロール (東京化成工業)、バンコマイシン (Wako)、メトトレキサート (Sigma)、セフォタキシム (Combi-Blocks, San Diego, CA, USA)、ルシファーイエロー (Lucifer yellow, LY, Sigma)、ローダミン 123 (rhodamine123, R123, Wako) およびダントロレン (Wako) を使用した。被験物質の最終添加濃度は、R123 とダントロレンは $5\mu\text{M}$ 、その他は $1\mu\text{M}$ に設定した。 37°C で反応を開始した後 30 分、60 分および 90 分間インキュベートした後、各時点において各インサートの basolateral 側 (B) から溶液を回収し、溶液中の化合物濃度を測定した。

P-gp、BCRP および H^+/OC antiporter の阻害実験は、それぞれの特異的阻害剤または競合基質を用いて実施した。P-gp 阻害剤にはシクロスポリン A (CysA, $10\mu\text{M}$, 東京化成工業)、BCRP 阻害剤には Ko143 ($1\mu\text{M}$, Sigma) を用いた。 H^+/OC antiporter に対する競合基質は、別の H^+/OC antiporter 基質であるピリラミン (1 mM , Sigma) を用いた。これらの阻害剤あるいは競合基質をインサートの apical 側と basolateral 側の両側に添加し、2 時間のプレインキュベーションの後、上述の方法に従って透過性試験をおこなった。

LY と R123 の蛍光測定は、SpectraMax マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて、それぞれ励起/発光波長 (nm) を LY は

428/536、R123 は 505/534 に設定して測定した。その他の化合物については、QTRAP 5500 LC-MS/MS システム (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を使用して定量分析した。ロードしたサンプルは Atlantis T3 カラム (100Å, 3 μm, 2.1 mm × 50 mm, Waters, Milford, MA, USA) で分離した。移動相は 0.1% (v/v) ギ酸を含む水および 0.1% (v/v) ギ酸を含むアセトニトリルから構成される溶液を使用した。m/z の情報は Table 9 に記載した。

各化合物の透過係数 (Permeability coefficient, Pe , $\times 10^{-6}$ cm/s) の算出方法を以下に示した。インサートの apical 側の濃度 (C_{apical})、basolateral 側の濃度 ($C_{basolateral}$)、apical 側の体積 (V_{apical} ; 750μL)、basolateral 側の体積 ($V_{basolateral}$; 2250μL) を用いて以下の式よりクリアランス体積を算出した。

$$Cleared\ volume_{A\ to\ B}\ (\mu L) = \frac{C_{basolateral} \times V_{basolateral}}{C_{apical}}$$

$$Cleared\ volume_{B\ to\ A}\ (\mu L) = \frac{C_{apical} \times V_{apical}}{C_{basolateral}}$$

クリアランス体積を時間に対してプロットしてクリアランス曲線を作成した後、細胞群 (PS_{total}) およびブランク群 (PS_{insert}) のクリアランス曲線の傾きをそれぞれ算出し、それぞれの値の逆数の差を算出し、内皮単層の透過性×面積値 (PS_e) を以下の式で求めた。

$$\frac{1}{PS_e} = \frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{insert}}$$

最後に PS_e 値をインサートの表面積 A (12 ウェルインサートの場合 0.9cm²) で割ることにより、透過係数 Pe 値を算出した。

$$Pe = \frac{PS_e}{A}$$

P-gp および BCRP の排出トランスポーター機能を検証するための双方向輸送試験では、basolateral 側から apical 側への Pe 値 (Pe_{BA}) を apical 側から basolateral 側の Pe 値 (Pe_{AB}) で割ることで、下の式に基づき流出比 efflux ratio (ER) を算出した。

$$ER = \frac{Pe_{BA}}{Pe_{AB}}$$

2-2-8 統計解析

統計解析は **ystat2006** (医学書院, 東京, 日本) を用いて行った。多重比較は、まず **one-way analysis of variance (ANOVA)** により解析し、その後ボンフェローニ法により解析した。2 値間の比較は、**unpaired Student t-test** を用いて行った。

Table 6. Composition of culture medium used in this study

Medium name	Vas-comp	Vas-V/E free
Cells	HBMEC/ci18	
Basal medium	VascuLife	
Culture supplements		
hFGF-b	+	+
Ascorbic acid	+	+
HC	+	+
hIGF-1	+	+
hEGF	+	—
VEGF	+	—
Heparin	+	+
L-glutamine	+	+
FBS	2%	2%
Pen/st	+	+
Blasticidin S	+	—

Medium name	AGM	ADM
Cells	HASTR/ci35	
Basal medium	DMEM	
Culture supplements		
Pen/st	+	+
N2	+	+
FBS	10%	—
Blasticidin S	+	—
dBcAMP	—	+

Medium name	PM
Cells	HBPC/ci37
Basal medium	Pericyte medium
Culture supplements	
Pen/st	+
FBS	2%
Pericyte growth factor	+
Blasticidin S	+

Medium name	BPM
Cells	HASTR/ci35, HBPC/ci37
Basal medium	Neurobasal medium
Culture supplements	
Pen/st	+
N2	+
L-glutamine	+

Vas-comp, Vasculife complete medium; Vas-V/E free, VEGF- and hEGF-free Vasculife complete medium; Vas-FBS, Vasculife complete medium with FBS; FBS, fetal bovine serum; HC, hydrocortisone; hFGF-b, human fibroblast growth factor-basic; hIGF-1, human insulin-like growth factor-1; hEGF, human epidermal growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; Pen/st, penicillin streptomycin; AGM, astrocyte growth medium; ADM, astrocyte differentiation medium; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; dBcAMP, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate; PM, pericyte medium; BPM, brain parenchyma medium.

Table 7. Primers used in this study

Primer name ^a	Sequence (5' >)
<i>(qPCR)</i>	
GAPDH F	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C
GAPDH R	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
P-gp F	GGA AAT TTA GAA GAT CTG ATG TCA AAC
P-gp R	ACT GTA ATA ATA GGC ATA CCT GGT CA
BCRP F	TTC CAC GAT ATG GAT TTA CGG
BCRP R	GTT TCC TGT TGC ATT GAG TCC
Claudin-5 F	GTG CTA CAC CCA GTG TGC TG
Claudin-5 R	CCA GTT CAG GTG ACA CCA CTT
Occludin F	CCC TTT TAG GAG GTA GTG TAG GC
Occludin R	AGC CAT AGC CAC TTC CGT AG
VE-cadherin F	AAT GCG TCC GTG CCT GAG TCG T
VE-cadherin R	GTG GTC TCC CAC AGT GGG GTC G
ZO-1 F	TGA TCA TTC CAG GCA CTC G
ZO-1 R	CTC TTC ATC TCT ACT CCG GAG ACT
GLUT1 F	GGT TGT GCC ATA CTC ATG ACC
GLUT1 R	CAG ATA GGA CAT CCA GGG TAG C
TfR F	GCG GCT GCA GGT TCT TCT
TfR R	GAC AAT GGT TCT CCA CCA AAC A
MFSD2A F	ACC TAT TGG ATG TGG CTC AGA
MFSD2A R	GGC CCA CAA ACA GGA TGA T
INSR F	CAT TTA TGT CCA GAC AGA TGC C
INSR R	TGG GAT GAT GAG TTA GAC ACT G
JAM-A F	TGA TCG CGA TGG GGA CAA AG
JAM-A R	AAT GCC AGG GAG CAC AAC AG
LAT-1 F	GTG GAA AAA CAA GCC CAA GT
LAT-1 R	GCA TGA GCT TCT GAC ACA GG
FcRn F	TGA AGG GAA CGT CGT CCT
FcRn R	CTC CCA GGA AGG AGA AAG AGC

^aF and R indicate forward and reverse directions.

Table 8. Antibodies used in this study

Antibody	Source	Product code
<i>Primary antibody</i>		
Mouse anti-P-gp monoclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-55510
Mouse anti-BCRP monoclonal IgG	Novus Biologicals	NB100-2177
<i>Secondary antibody</i>		
CF555 Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	Biotium	20037

Table 9. m/z information

Compounds	Q1 (precursor m/z)	Q3 (product m/z)	DP	EP	CE	CXP
Rivastigmine	251.297	86.1	56	10	35	11
Carbamazepine	236.952	193.98	44	5	27	15
Memantine	180.196	107.068	65	8	36	11
Diphenhydramine	256.258	167.021	41	4	21	13
Donepezil	380.198	91.273	95	11	67	13
Efavirenz	316.008	243.807	76	10	15	19
Phenytoin	253.212	181.991	58	11	25	13
Indomethacin	358.088	138.813	68	11	27	11
Risperidone	411.25	191.163	75	8	36	15
Gabapentin	172.157	154	46	12	23	13
Atenolol	266.933	145.134	72	10	37	11
Vancomycin	1448.605	1305.243	205	12	46	45
Dantrolene	313.001	228.147	-50	-8	-19	-13
Methotrexate	455.157	308.167	75	11	29	17
Cefotaxime	456.002	166.974	80	11	31	15

DP, Declustering Potential (V); EP, Entrance Potential (V); CE, Collision Energy (V); CXP, Collision Cell Exit Potential (V)

第3節：結果

2-3-1 HBMEC/ci18 における網羅的な遺伝子発現プロファイル解析

まず、HBMEC/ci18 における網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析し、prHBMEC との比較をおこなうことで、その類似性から HBMEC/ci18 がどの程度 BBB 形質を保持するかを検討した。RNA-sequencing 解析の結果、両者の遺伝子発現プロファイルの全体的な類似性（1/3～3 倍以内の差と定義）は 97.6%（対象となる mRNA のうち 6203/6359）と高いことが明らかとなった。また、BBB に高く発現する mRNA サブセットに着目した場合においてもその類似度は高く、それぞれ TJ 蛋白質では 84.6%（11/13）、受容体では 100%（9/9）、SLC トランスポーターでは 90.9%（10/11）、ABC トランスポーターでは 90.0%（9/10）であった（Fig. 14a）。解析に使用した標的遺伝子の詳細は Table 10 に示した。

さらに、2 つの細胞間における BBB 特有に発現する遺伝子の発現量を qPCR により定量的に比較した。その結果、HBMEC/ci18 における BBB 特有遺伝子の mRNA 発現量は prHBMEC と概ね同等であり、HBMEC/ci18 が基本的な BBB 形質を保持していることが示唆された（Fig. 14b）。解析に使用した標的遺伝子の詳細は Fig. 14 の凡例に記載した。これらの結果から、両細胞は類似した遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなったため、以降の実験では HBMEC/ci18 および prHBMEC それぞれを用いた BBB モデルを構築し、その機能解析を実施することとした。

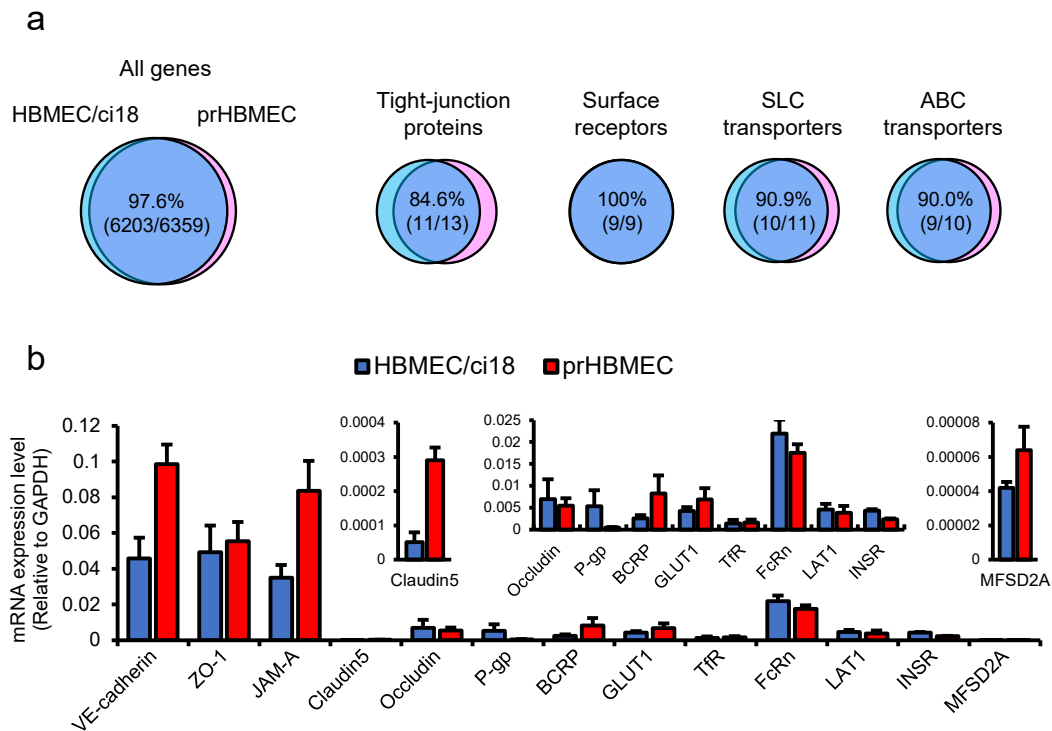


Fig. 14 Characterization of gene expression profiles in HBMEC/ci18 cells and prHBMEC

(a) RNA-sequencing analyses were performed to compare differences in gene expression profiles between HBMEC/ci18 and prHBMEC cells. Among mRNAs identified, those carrying the FPKM value above 5 were picked up and used in comparison analyses, and "the similar gene expression level" between the two cell types was defined as its difference within the 1/3~3-fold range. Based on the results, the Venn diagrams were depicted for all pickup genes, as well as subsets of BBB-enriched genes (tight-junction [TJ] proteins, surface receptors, solute carrier [SLC] transporters, and ATP-binding cassette [ABC] transporters), to visualize the degree of the overall gene expression similarities between the two types of the cells (indicated by the merged areas). The gene numbers identified/examined are also shown. The list of genes used in subsets analyses are summarized in Table 10. (b) The mRNA expression levels of BMEC-enriched genes in HBMEC/ci18 cells and prHBMEC were validated using real-time quantitative PCR (qPCR). The targets are vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), zonula occludens 1 (ZO-1), junctional adhesion molecule A (JAM-A), claudin-5, occludin, P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), glucose transporter 1 (GLUT1), transferrin receptor (TfR), neonatal Fc receptor (FcRn), L-type amino acid transporter 1 (LAT1), insulin receptor (INSR), and the major facilitator superfamily domain containing 2A (MFSD2A). The values were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels, and the results are shown as the mean \pm SEM obtained from three independent experiments. Each experiment was performed in duplicate.

Table 10. The list of target genes used in RNA-sequencing analyses

Tight-junction proteins	Surface receptors	SLC transporters	ABC transporters
ZO-1	LDLR	GLUT1	ABCA2
ACTB	LRP5	SLC2A3	ABCA3
Vinculin	LRP6	SLC2A6	ABCB10
AFDN	LRP10	4F2hc	ABCC1
VE-cadherin	TFRC	SLC6A6	ABCD1
JAM3	FcRn	SLC6A8	ABCD3
CTNNA1	B2M	SLC7A1	ABCE1
β -catenin	IGF1R	LAT1	ABCF1
JUP	IGF2R	SLC16A1	ABCF2
GSK3B		SLC23A2	ABCF3
CD31		SLC38A2	
RPS13			
JAM-A			

ZO-1, zonula occludens-1; ACTB, actin beta; AFDN, adherens junction formation factor; VE-cadherin, vascular endothelial-cadherin; JAM, junctional adhesion molecule; CTNNA1, catenin alpha 1; JUP, junction plakoglobin; GSK3B, glycogen synthase kinase 3; RPS13, ribosomal protein S13; LDLR, low density lipoprotein receptor; LRP, Low density lipoprotein receptor-related protein; TFRC, transferrin receptor; FcRn, neonatal Fc receptor; B2M, beta-2-microglobulin; IGF1R, insulin-like growth factor receptor; GLUT1, glucose transporter 1; SLC, solute carrier; LAT1, L-type amino acid transporter 1; ABC, ATP binding cassette

2-3-2 hiBBB の構築および培養方法の最適化

序論で述べたように、BMEC が BBB としての特性を獲得するためにはアストロサイトおよびペリサイトとの相互作用が重要な役割を果たす。BBB モデル構築においても、アストロサイトおよびペリサイトとの共培養によりモデルが高機能化することが報告されている^{47, 48)}。そこで、本研究においても HBMEC/ci18 (BMEC)、HASTR/ci35 (アストロサイト) および HBPC/ci37 (ペリサイト) を組み合わせた hiBBB を構築することとした。一般に、BBB モデルの機能には、共培養条件や血清の種類、コーティング剤、インサート膜の種類などの様々な培養条件が影響することが知られている⁵³⁻⁵⁵⁾。そこで、本研究においても、hiBBB が最大限の機能を発揮するために必要な最適な培養条件を検討した。

まず、トランスウェルに播種する各細胞の位置について、過去の検討において、異なる位置での複数の共培養モデルを検討した結果、BMEC 単独培養モデル (E00) と比較して、生体の BBB に最も近い位置関係にある EPA モデル (BMEC [E] はインサート上部、ペリサイト [P] はインサートの裏側、アストロサイト [A] はプレート底面) において最も高いバリア機能を示した。

次に、個々の細胞の機能を向上させるための培養条件を検討した。まず、HBMEC/ci18 について、共培養時の内皮細胞側の培地を検討した。これまでに VEGF や EGF などの細胞増殖因子は、細胞増殖には必須であるが、BBB バリア機能には悪影響を及ぼすことが報告されている^{56, 57)}。そこで、これまで細胞継代培養時に用いてきた増殖因子を含む血管内皮培養用培地 (Vasculife complete kit, Vas-comp) から VEGF および hEGF を除去した培地 (Vas-V/E free) を作製し、Fig. 18a の step3 においてインサートへの HBMEC/ci18 播種時に培地を Vas-comp から Vas-V/E free 交換して1日後に TEER 値を解析した。その結果、Vas-V/E free を使用したモデルでは、Vas-comp と比べて 2.15 倍高い TEER 値 (Vas-comp; 50.4, Vas-V/E free; 108.5, $\Omega \times \text{cm}^2$) が認められた (Fig. 15a)。したがって、従来の報告と同様に、培地から VEGF および hEGF を除去することにより、hiBBB モデルのバリア機能が向上すると考えられた。

次に、HBMEC/ci18 の細胞播種濃度がバリア機能に与える影響について検討した。これまでの検討では $2.6 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の播種濃度を用いてきたが、その半分の播種濃度 $1.3 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ まで播種濃度を低下させても TEER 値は変化しなかった (Fig. 15b)。本検討の結果、バリア機能に影響を与えずに播種濃度を低減させることが可能になり、1 度に播種可能なウェル数が増えることで、本モデルのスループット向上に繋がると考えられた。

次に、支持細胞である HASTR/ci35 および HBPC/ci37 の分化効率を高めるために、無血清培地の使用や培養温度の変更 (33°C から 37°C への変更) を検討した。一例として、Fig. 18a に示した過程の中で、step2 を 33°C でおこなった際の共培養効果は、

37°Cの場合よりも著しく低く、TEER の向上に対する共培養効果はそれぞれ 33°Cで 1.30 倍、37°Cで 1.76 倍であった (Fig. 15c)。このことから、HBMEC/ci18 に対する効率的な分化誘導効果を引き出すためには、HASTR/ci35 および HBPC/ci37 の共培養前の分化誘導過程が重要な役割を果たすことが示唆された。

また、共培養効果を得るために必要な共培養期間の検討をおこなった。バリア機能の指標である TEER 値は、共培養開始 1 日後には E00 モデルと比較して EPA モデルで高値を示し、その後少なくとも 5 日間に渡って同等の値を維持した (Fig. 15d)。これらの結果から、最大効果は共培養開始 1 日後と短期間に発揮され、その後共培養効果を維持可能であることが明らかになった。

さらに、上述のバリア機能の検討に加えて、もう 1 つの重要な BBB 機能である薬物排出トランスポーター (P-gp および BCRP) の発現および機能についても検討した。まず、hiBBB における P-gp および BCRP の蛋白質発現を細胞免疫染色法により解析した。その結果、E00 および EPA の両モデルにおいて P-gp および BCRP の蛋白質発現が認められ、その発現は E00 モデルと比較して EPA モデルにおいて高く認められた (Figs. 16a および b)。また、hprBBB においても一部染色性が低いものの、hiBBB と同様の傾向を示した。この蛋白質発現レベルと一致して、hiBBB の EPA モデルにおいて、各薬剤排出トランスポーター基質 (P-gp 基質: キニジン, デスロラタジン, R123、BCRP 基質: ダントロレン) の apical 側から basolateral 側への透過性 (Pe 値) は E00 モデルよりも低く (Figs. 17a-d)、EPA モデルでは E00 モデルと比較して P-gp および BCRP の機能が誘導されていることが示された。

以上の検討を通じて、各細胞に適した培養方法や最適な共培養条件を見出したことにより、hiBBB が効果的に機能を発揮できるプロトタイプとなる培養プロトコールを構築した。そのプロトコールの概要を Fig. 18a に示した (詳細な共培養方法については実験方法 2-2-2 の項目に記載した)。以降では、この最適化した方法を用いて構築した hiBBB を用いて、より詳細な機能解析を進めることとした。

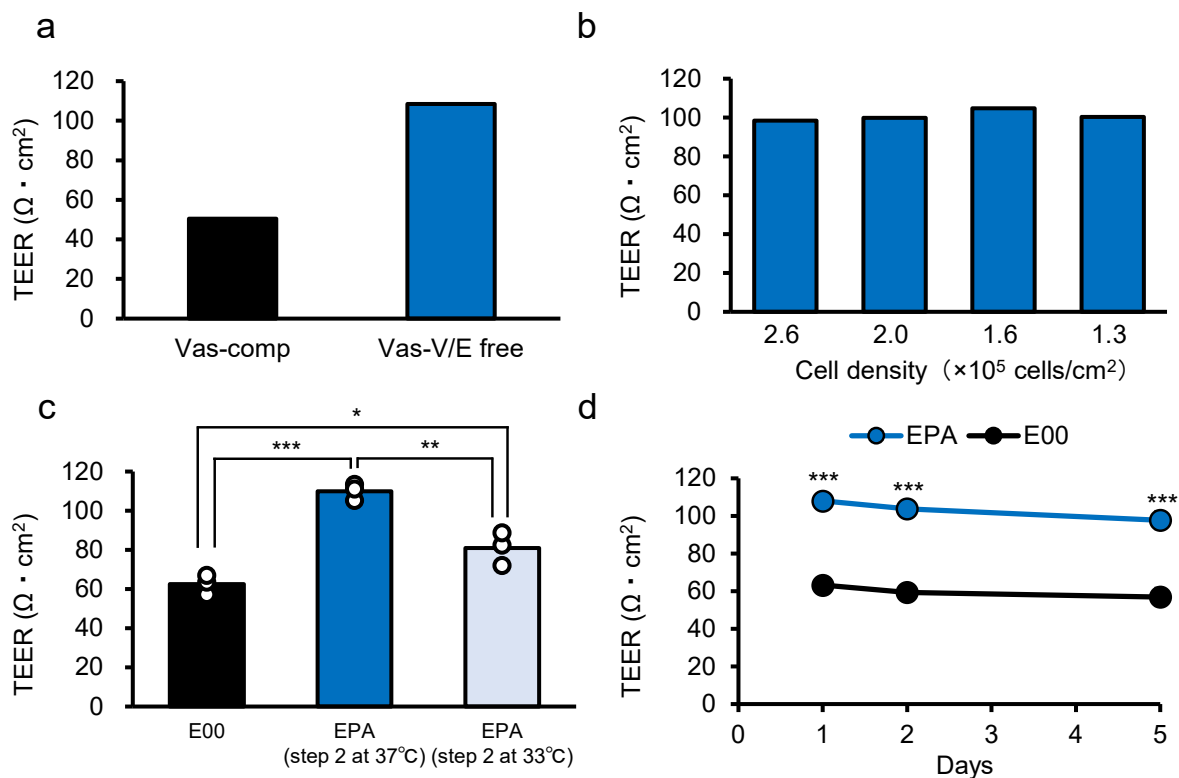


Fig. 15 Characterization of barrier properties and optimization of their culture methods in hiBBB models

(a) The trans-endothelial electrical resistance (TEER) was measured in hiBBB models constructed under the different vascular medium. The HBMEC/ci18 cells were co-cultured either using Vas-comp or Vas-V/E free medium, and TEER values were measured on day 1 after initiating co-culture. (b) The TEER value was measured in hiBBB models constructed under the different cell seeding density of HBMEC/ci18 cells. The HBMEC/ci18 cells were seeded into the insert at the indicated cell density using Vas-V/E free medium, and started co-culturing, then TEER values were measured on day 1 after initiating co-culture. (c) The step 2 (please see Fig. 18a) was performed either at 33°C (w/ the step 2 at 33°C) or 37°C (w/ the step 2 at 37°C), and the effects on the TEER values of HBMEC/ci18 cells were compared. The TEER values of the E00 model (w/ the step 2 at 37°C) were also determined for comparison. The results represent the mean \pm SD of values obtained from three independent experiments. Each experiment was performed in duplicate. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (d) The TEER values of the E00 and EPA models were examined at days 1, 2, and 5. The results are the mean \pm SD of values obtained from three independent experiments. Each experiment was performed in duplicate. ***, $p < 0.001$.

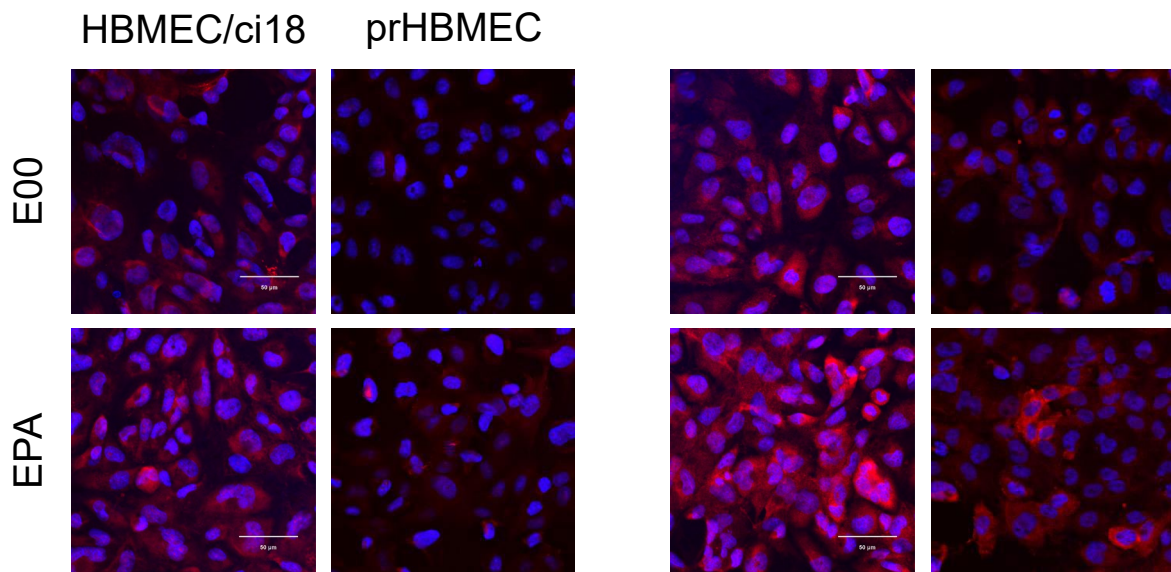


Fig. 16 Protein expression profiles of P-gp and BCRP in HBMEC/ci18 and prHBMEC cells.

The protein expression of (a) P-gp and (b) BCRP in the E00 and EPA models using HBMEC/ci18 and prHBMEC cells were examined by immunocytochemistry. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclear counter-staining (blue). The experiments were repeated three times and representative pictures are shown.

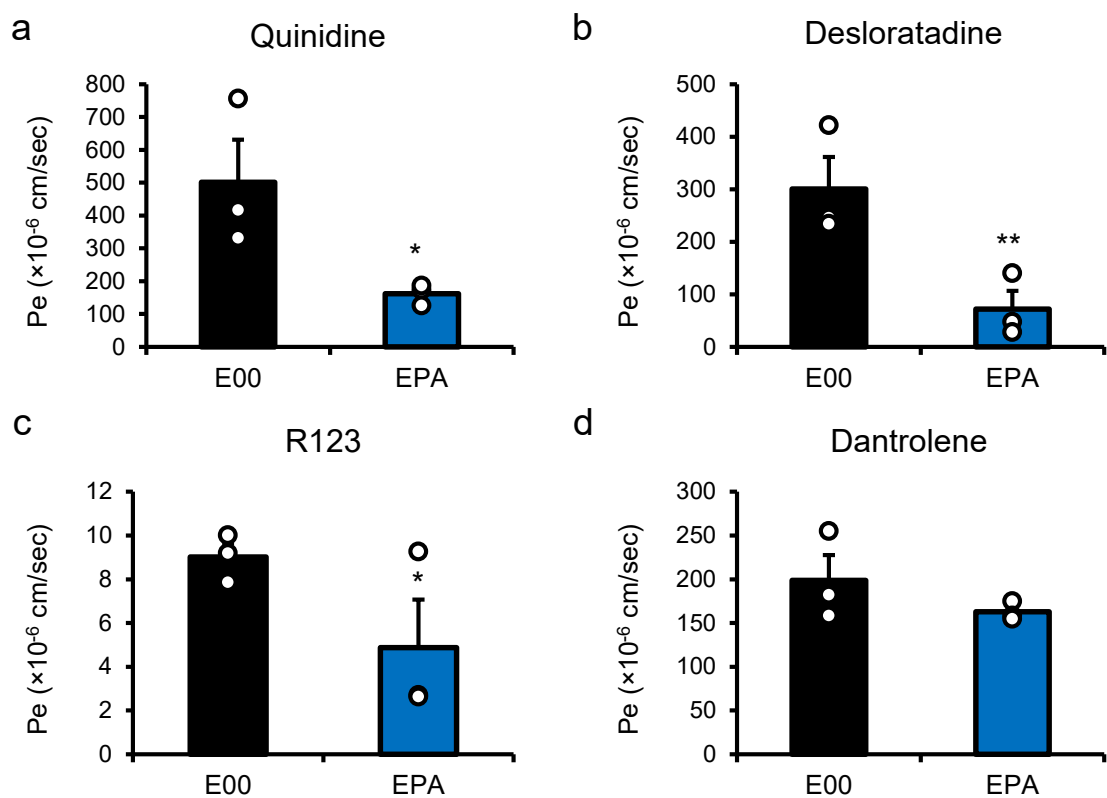


Fig. 17 BBB permeability assay using P-gp and BCRP substrates in hiBBB models

BBB permeability assays were performed in the E00 and EPA models using representative P-gp and BCRP substrates. Among them, (a) quinidine, (b) desloratadine and (c) R123 are P-gp substrates and (d) dantrolene is a BCRP substrate. The concentrations used were: 5 μ M for R123 and dantrolene, and 1 μ M for quinidine and desloratadine. After the addition of a compound to the apical side, incubation was performed for 30, 60, or 90 min. Medium was collected from wells and the concentrations of the corresponding compounds were determined. Using the concentration data, the permeability coefficient (Pe) values were calculated. Each value is the mean (SD) of values obtained from three independent experiments. Each experiment was performed in duplicate. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs E00.

2-3-3 hiBBB における BBB 機能評価

hiBBB の BBB 機能をより詳細に明らかにするため、prHBMEC を用いた BBB モデル (hprBBB) との機能比較検証をおこなった。上記 2-3-2 の検討により最適化された培養プロトコール (Fig. 18a) に基づき hiBBB を構築した。また比較対象として、HBMEC/ci18 を prHBMEC に置き換えたヒト初代 BBB モデル (hprBBB) を構築した。

まず、両モデルのバリア機能を評価するために、その指標である TEER 測定と LY 透過性試験をおこなった。その結果、hiBBB の TEER は 106.7 ± 3.7 ($\Omega \times \text{cm}^2$) であり、hprBBB から得られた TEER ($99.6 \pm 2.6 \Omega \times \text{cm}^2$) と同程度であった。同様に、hiBBB と hprBBB から得られた LY 透過係数 (P_e , $\times 10^{-6} \text{ cm/s}$) は同等であった (それぞれ 27.7 ± 4.2 と 31.1 ± 3.7) (Figs. 18b および c)。

次に、hiBBB および hprBBB における薬物排出トランスポーター機能を明らかにするために、R123 (P-gp 基質) およびダントロレン (BCRP 基質) を用いた双方向輸送アッセイをおこなった。その結果、hiBBB における R123 (2.0 ± 0.17) およびダントロレン (1.9 ± 0.19) の ER は、hprBBB と同程度 (R123, 2.6 ± 0.44 、ダントロレン, 1.5 ± 0.60) であった (Figs. 18d および e)。さらに、それぞれの特異的阻害剤を用いた阻害実験の結果、CysA (P-gp 阻害剤) または Ko143 (BCRP 阻害剤) の前処置により、hiBBB (R123, 0.63 ± 0.26 、ダントロレン, 0.79 ± 0.20) および hprBBB (R123, 0.71 ± 0.09 、ダントロレン, 0.59 ± 0.11) において ER は著しく低下した (Figs. 18d および e)。これらの結果から、いずれの BBB モデルにおいても P-gp および BCRP が機能的に発現していると考えられた。

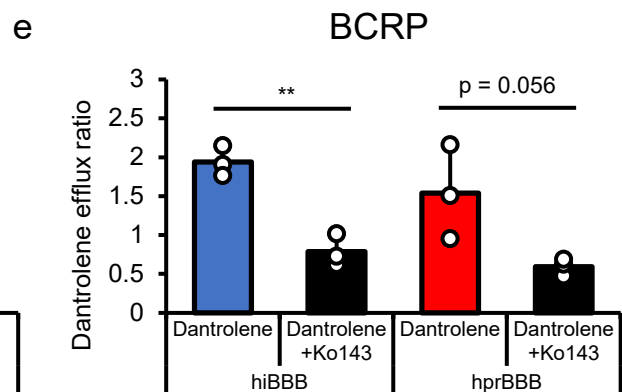
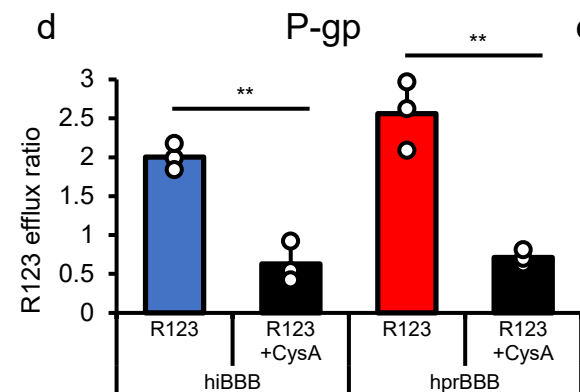
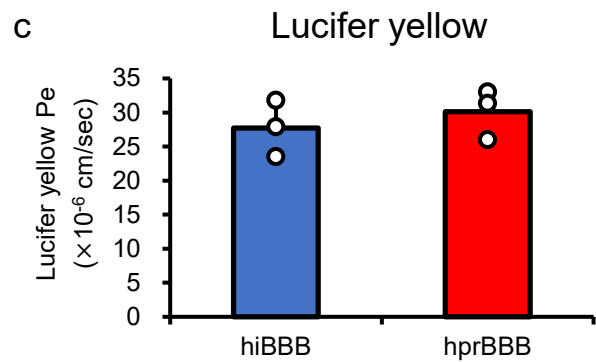
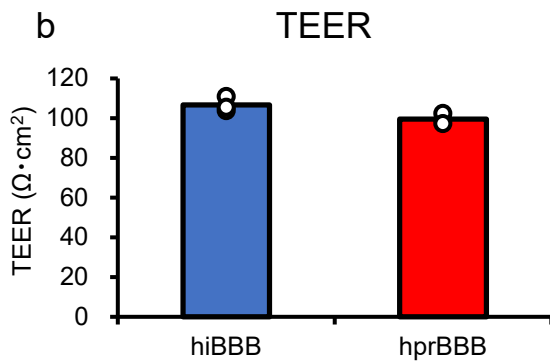
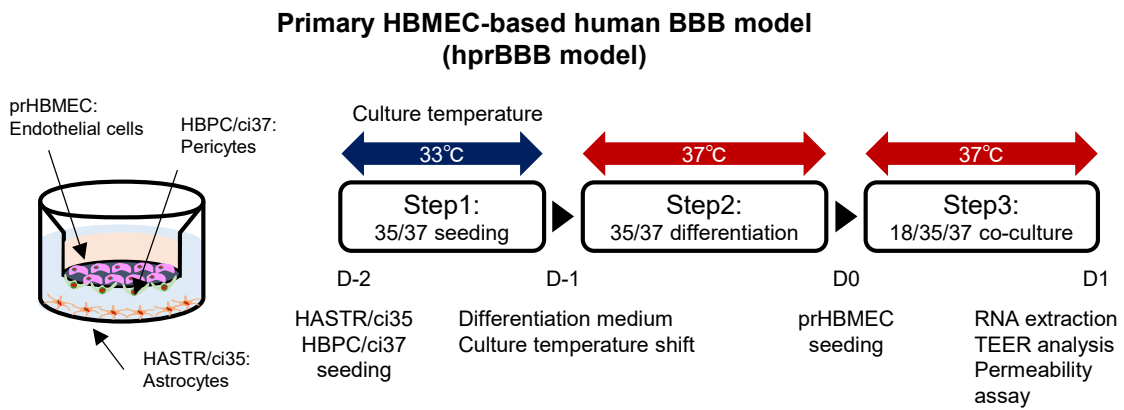
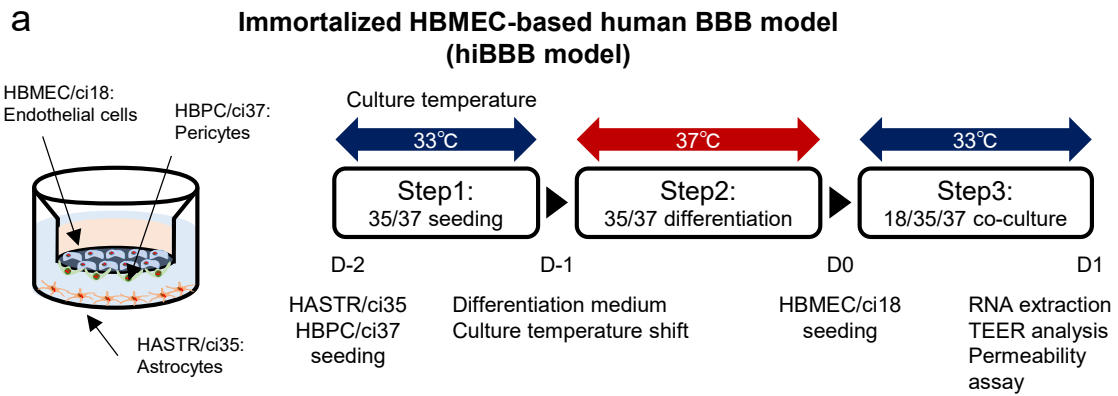


Fig. 18 Characterization of the BBB functionalities in the hiBBB and the hprBBB models

(a) Schematic drawings are shown to provide an overview of the development of the hiBBB and the hprBBB models in a 12-well transwell culture system. Additional notes are: the membranes of cell culture inserts (translucent polyethylene terephthalate, 0.4 μm high-density pores, BD Falcon) were incubated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ type-IV collagen/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fibronectin solution at 37°C for one hour (extracellular matrix coating). The inserts were dried by air and rinsed with phosphate-buffered saline twice. (b) and (c) The trans-endothelial electrical resistance (TEER) and the lucifer yellow permeability coefficient (P_e) values were measured in both BBB models on day 1 of co-culturing. (d) and (e) The bi-directional transport assays with 5 μM rhodamine123 (R123) (a P-gp substrate) and 5 μM dantrolene (a BCRP substrate) were performed using both BBB models. The efflux ratios were obtained by the equation: $ER = P_{eBA}/P_{eAB}$, where the P_{eAB} and P_{eBA} values were permeability coefficients (from the apical to the basolateral direction and *vice versa*, respectively). Validation of the P-gp and BCRP functions was performed using their specific inhibitors (10 μM cyclosporine A [CysA] and 1 μM Ko143, respectively). Each value represents the mean (SD) obtained from three independent experiments, each performed in duplicate. **, $p < 0.01$. Each dot represents the individual value obtained.

さらに詳細に hiBBB の機能を解析するために、遺伝学的には未同定ではあるが BBB における薬物取り込みトランスポーターとして機能することが知られている H^+/OC antiporter⁹⁾ の機能を、その代表的な基質を用いて検証した。透過性試験の結果、 H^+/OC antiporter 基質であるメマンチンおよびジフェンヒドラミンの P_e 値は、それぞれ 715.6 ± 164.8 および 702.6 ± 153.4 であった。さらに、ピリラミン (別の H^+/OC antiporter 基質) を用いた競合阻害試験の結果、 P_e 値はそれぞれ 9.3 ± 5.9 (メマンチン) および 25.5 ± 0.8 (ジフェンヒドラミン) と有意に低下した (Figs. 19a および b)。これらの結果から、hiBBB において H^+/OC antiporter が機能的に発現していると考えられた。

以上の結果を踏まえると、hiBBB は細胞間結合によるバリア機能をはじめ、取り込み/排出トランスポーターなどの BBB として重要な多彩な細胞機能を併せ持ち、その機能性は hprBBB と同程度であることが明らかとなった。

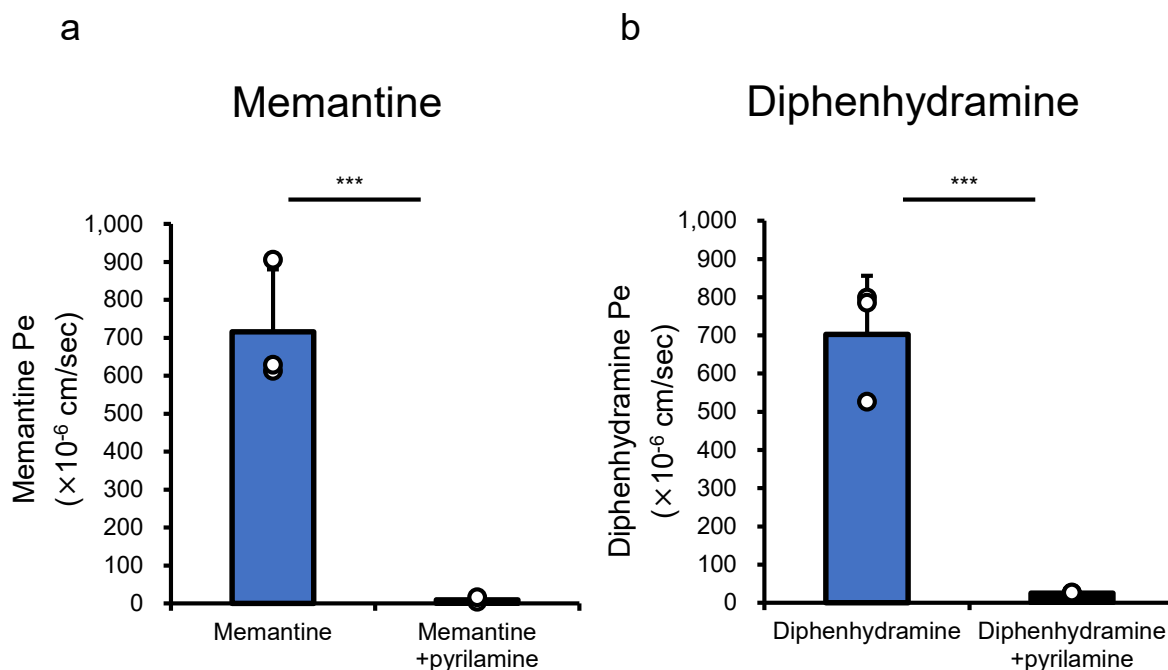


Fig. 19 Characterization of proton-coupled organic cation (H^+/OC) antiporter functions in the hiBBB model

Permeability assay with the H^+/OC antiporter substrates memantine (a) and diphenhydramine (b) were performed in the hiBBB models. Memantine (1 μ M) or diphenhydramine (1 μ M) were added to the insert chamber, followed by incubation for 30, 60, or 90 min. Concentration data were used to calculate Pe values (from the apical to the basolateral direction). In the competitive analysis, pyrilamine (1 mM) was used as a competitive inhibitor. Each value represents the mean (SD) obtained from three independent experiments, each performed in duplicate. ***, $p < 0.001$. Each dot represents the individual value obtained.

2-3-4 hiBBB を用いた *in vitro* BBB 透過性試験

これまでの検討の結果、hiBBB が機能的な BBB 特性を保持することが明らかとなった。そこで次に、hiBBB が薬物の中枢移行性評価に有用であるかを明らかにするために、複数の薬物/化合物を用いた BBB 透過性試験を実施した。

透過性試験には、BBB 透過性が既知の 22 種類のモデル薬物/化合物 (BBB を透過するものを BBB+, BBB を透過しないものを BBB-と記載した) を用いた。被験物質名は実験方法の項に記載し、BBB 透過性の分類は Fig. 20 の凡例に示した。具体的には、BBB+に分類される薬物には受動拡散 (プロプラノロール) あるいは H⁺/OC antiporter 基質 (ピリラミン, メマンチンおよびジフェンヒドラミン) が含まれる。一方で、BBB-に分類される薬物には、P-gp 基質 (キニジン, デスロラタジン, リスペリドン, ガバペンチンおよび R123)、BCRP 基質 (ダントロレンおよびメトトレキサート)、非 BBB 透過性マーカー (LY および Na-F) などが含まれる。

透過性試験の結果、予想通り BBB 透過性薬物の Pe 値 (Ave. 883.6×10^{-6} cm/s) は、BBB 非透過性の薬物の Pe 値 (Ave. 79.9×10^{-6} cm/s) に比べ、高値を示した。また、 200×10^{-6} cm/s (Fig. 20 の横線で示した) を Pe 値の閾値とすることで、薬物の BBB 透過性を判別可能であることが明らかとなった。得られた各被験物質の Pe 値は Table 11 に記載した。また、評価感度の指標である Pe 値のダイナミックレンジは 450 倍以上 (最大 Pe 値はリバスチグミン: 2580.4 ± 781.9 、最小 Pe 値は R123: 5.7 ± 0.7 から算出した) と優れていることが明らかとなった (Fig. 20)。

次に、hiBBB から得られた *in vitro* Pe 値と薬物の物理化学的性質との相関について解析をおこなった。代表的な物理化学的パラメータとして、分子量、cLogP、polar surface area および Hydrogrn bond donor count を用いた。その結果、これまでの報告と同様に、分子量 ($R^2 = 0.0937$, $p = 0.302$)、cLogP ($R^2 = 0.1788$, $p = 0.250$)、polar surface area ($R^2 = 0.198$, $p = 0.158$) および Hydrogrn bond donor count ($R^2 = 0.1064$, $p = 0.248$) などの薬物が持つ物理化学的性質と BBB 透過性の間に関連性は認められなかった (Figs. 21a-d)。これらの結果から、hiBBB は薬物の中枢移行性評価に有用なモデルであることが示唆された。

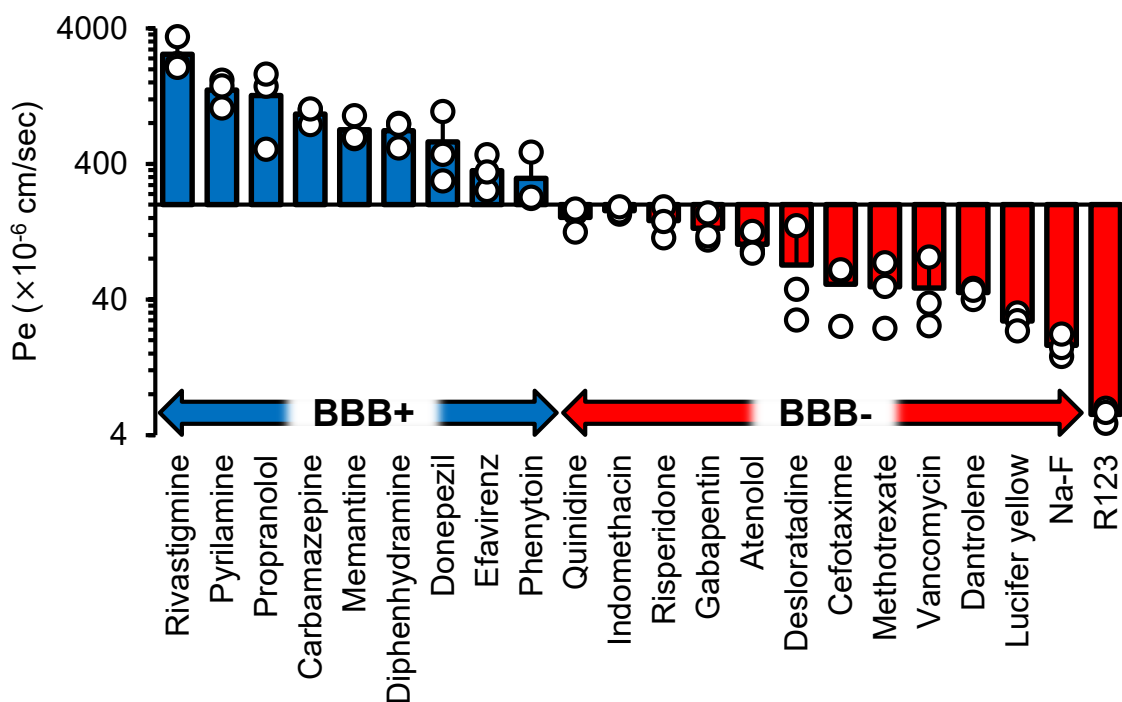


Fig. 20 Characterization of the BBB permeabilities of BBB permeable (BBB+) and non-permeable (BBB-) drugs and compounds in the hiBBB model

The hiBBB model was used to assess BBB permeability to several drugs and compounds with differential BBB permeability profiles. The BBB permeable compounds (BBB+) were rivastigmine, carbamazepine, memantine, diphenhydramine, donepezil, efavirenz, and phenytoin. The non-BBB permeable compounds (BBB-) were indomethacin, risperidone, gabapentin, atenolol, vancomycin, dantrolene, methotrexate, cefotaxime, lucifer yellow, and R123. Risperidone, gabapentin, and R123 are P-gp substrates. Dantrolene and methotrexate are BCRP substrates. Memantine and diphenhydramine are H⁺/OC antiporter substrates. The concentrations used were: 5 μ M for R123 and dantrolene, and 1 μ M for others. The Pe determination was performed as described in Figures 17-19. Each value represents the mean (SD) obtained from three independent experiments. Each experiment was performed in duplicate. Each dot represents the individual value obtained.

Table 11. List of the compounds used in the BBB permeability assays

	Compounds	P_e ($\times 10^{-6}$ cm/s)
BBB permeable compounds	Rivastigmine	2580 ± 782
	Propranolol	1280 ± 686
	Carbamazepine	935 ± 133
	Memantine	716 ± 165
	Diphenhydramine	703 ± 153
	Donepezil	582 ± 352
	Efavirenz	357 ± 106
	Phenytoin	313 ± 153
BBB non-permeable compounds	Indomethacin	180 ± 11.8
	Risperidone	153 ± 39.6
	Gabapentin	134 ± 35.1
	Atenolol	102 ± 21.3
	Vancomycin	48.6 ± 30.0
	Dantrolene	45.0 ± 4.48
	Methotrexate	49.7 ± 25.0
	Cefotaxime	52.0 ± 23.2
	Lucifer yellow	27.7 ± 4.15
	R123	5.69 ± 0.73

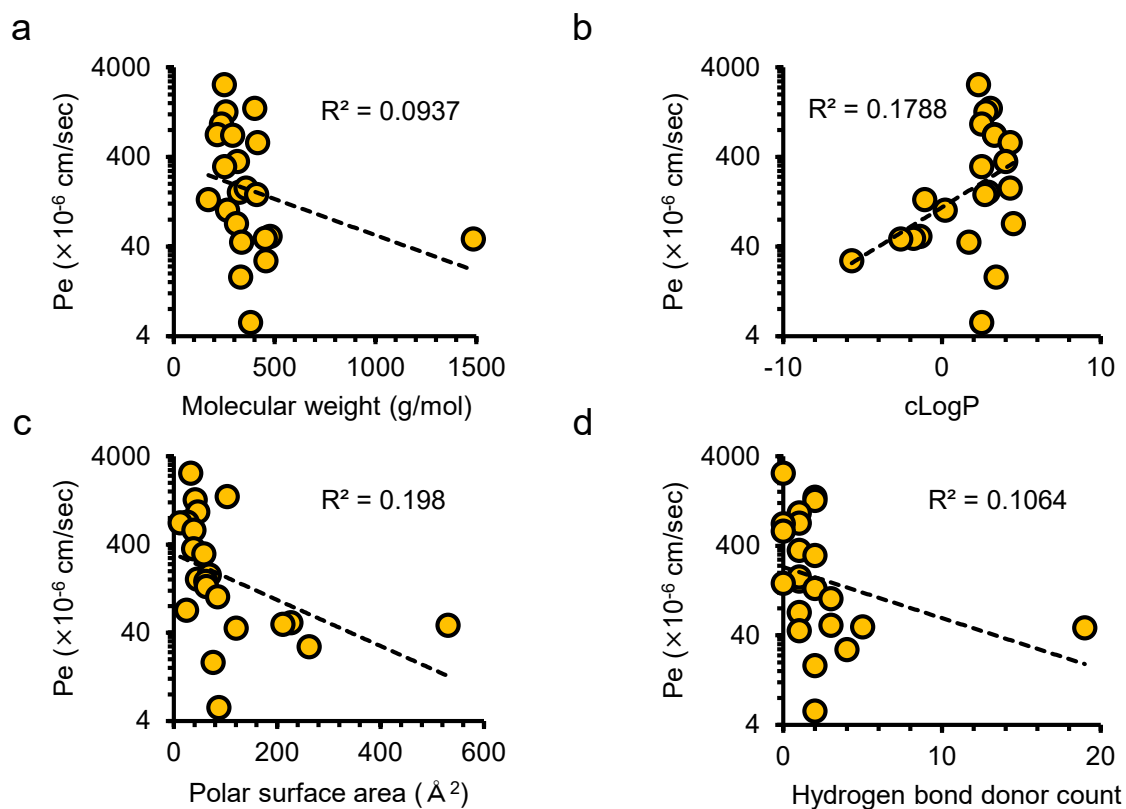


Fig. 21 Relationship between in vitro BBB permeability values and drug physicochemical properties.

The Pe values of tested drug and compounds from the hiBBB models and relationship with their (a) molecular weight, (b) cLogP, (c) polar surface area, and (d) hydrogen bond donor count, respectively.

第4節：考察

第2章では、3種類の不死化ヒト BBB 細胞を共培養することにより、*in vitro* ヒト不死化 BBB モデル (hiBBB) を構築し、その機能的特徴を明らかにした。hiBBB は 22 種のモデル化合物/薬物の BBB 透過性を明確に判別可能であり、その Pe 値のダイナミックレンジは、既報の動物由来の初代培養 BBB モデルで得られた値と同程度であった^{50, 23, 58}。これらの優れた機能特性は、hiBBB が hprBBB と類似した遺伝子発現プロファイル、バリア特性および排出トランスポーター機能を保持していることから裏付けられる。

hiBBB のバリア機能について、TEER 値は 100.6 ($\Omega \times \text{cm}^2$) であり、この値は *in vivo* での報告値 (1,000 以上^{25, 26}) や、ラット初代培養細胞 BBB モデル (約 350 36⁵⁰) には及ばないものの、本研究で比較した hprBBB (99.6) や、他のヒト初代培養細胞モデルの報告値 (140~260^{17, 59}) と同程度であることから、hiBBB が機能的なバリアを形成することが示唆された。一般に、広く受け入れられる TEER 値の基準は定められていないものの、これまでの報告では、150-400 ($\Omega \times \text{cm}^2$) の TEER 値を示す BBB モデルにおいて、細胞間隙を介して輸送される化合物の Pe 値が飽和することが報告されており^{16, 60}、この値を 1 つの基準に考えると、hiBBB はこの値には僅かに及ばず、今後、機能改善の余地が残されてはいるものの、既報の不死化細胞を用いた BBB モデルの中では、最も機能的なモデルであると考えられる。

さらに、複数のモデル化合物/薬物を用いた透過性試験の結果、Pe 値のダイナミックレンジは約 450 倍にも達したことから、hiBBB の高い薬物中枢移行性評価能が強く支持される。これらの結果から、hiBBB は Pe 値の閾値を $200 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ に設定することで、BBB 透過性の高い化合物と低い化合物を区別可能であり、創薬において中枢移行性に優れた化合物の抽出に応用できると考えられる。

注目すべき点として、hiBBB が代表的な薬物排出トランスポーターである P-gp および BCRP を機能的に発現する点が挙げられる。これは、P-gp および BCRP の蛋白質発現が細胞免疫染色により検出されたことや、それぞれの典型基質 (P-gp 基質: R123, BCRP 基質: ダントロレン) を用いた検討からも明らかであり、その機能性は hprBBB と同程度であった。また、蛋白発現解析や透過性試験の結果から、E00 と比較して EPA モデルにおいて、P-gp および BCRP の発現および機能が上昇したことから、HASR/ci35 および HBPC/ci37 との共培養が hiBBB の機能発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

上記の BBB の基本的な機能特性に加えて、hiBBB が有するもう 1 つの利点は、その優れた汎用性である。本研究で用いた 3 種類のヒト不死化細胞は、いずれも優れた細胞増殖能を示すとともに、長期間の培養培養や凍結融解の繰り返し条件下においても異常な表現型を示さなかった。さらに、今回構築したプロトコールでは、培養培地と培養温度の変更のみで、簡便かつ短期間にそれぞれの細胞の分化誘導が可

能であり、時間やコストの観点からも実験上の大きな利点があると考えられる。以上のことから、hiBBB は薬物の中枢移行性評価に必要な基本的な BBB 機能を有し、かつ優れた汎用性も兼ね備えることから、中枢創薬の初期段階における薬物の BBB 透過性評価に有用なモデルであると期待される。

hiBBB が BBB 形質を高く保持できた要因として、独自の不死化細胞の樹立と、培養方法の最適化が重要であると考えられる。一般に、不死化細胞は汎用性に優れる一方で、初代培養細胞と比較して機能性が低いことが知られている。その点において本研究で用いた不死化細胞は、培養温度感受的に分化形質を獲得するユニークな不死化特性を持つ。hiBBB はこのような独自の特徴を持つ 3 種類の細胞の共培養系で構成されており、それぞれの不死化細胞に独自の培養方法を用いることで、他の不死化 BBB モデルと比べて優れたバリア機能を実現することができたと考えられる。特に、HASTR/ci35 と HBPC/ci37 細胞の分化誘導過程は、本モデルで独自に最適化された部分である。これまでに、HASTR/ci35 および HBPC/ci37 細胞の分化は 37°C 培養により誘導されることを報告しており^{12, 61)} この報告と一致して、本研究でも HBMEC/ci18 細胞に対するバリア機能誘導効果は、33°C 培養よりも 37°C 培養で顕著であったことから、培養温度変更に伴う tsSV40T 消失による不死化シグナルの解除が共培養効果の発揮に重要であることを示している。

共培養効果の分子メカニズムは不明であるが、アストロサイトおよびペリサイトから分泌される液性因子が BBB 形質の誘導に一部関与している可能性が考えられる。例えば、本研究での培養培地の検討の過程で、従来使用していた培地から増殖因子である VEGF や hEGF を除いた培地に変更することで HBMEC/ci18 のバリア機能が向上したことから、このような因子が BBB 機能の変動に影響することが示唆された。VEGF や hEGF 以外にも、BBB 機能を変動させる因子としては、アストロサイトから分泌される glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)、sonic hedgehog (SHH) および wnt 蛋白質や、ペリサイトから分泌される angiopoep-1 などが知られており^{50, 62-64)}、HASTR/ci35 および HBPC/ci37 においてもこれらの mRNA 発現が認められている。したがって、HASTR/ci35 および HBPC/ci37 細胞の分化に伴い、これら因子の発現が向上し、共培養効果に寄与した可能性が考えられる。

上述のように、hiBBB は BBB モデルとして必要な基本的な機能を保持していると考えられるが、今後実用的なモデルとして発展させていくためには、モデルの更なる機能向上が必要である。特に、hiBBB における Na-F の Pe 値 (18×10^{-6} cm/s) や R123 の ER 値 (1.7) は、ラット初代培養 BBB モデルでの報告値 (Pe, Na-F = 4×10^{-6} cm/s, ER, R123 = 2.5) には及ばない⁵⁰⁾。したがって、hiBBB のバリア機能や薬物排出トランスポーター機能を向上させる必要がある。本研究において、hiBBB の培養条件の最適化をおこない、プロトタイプとなる培養条件を構築したが、その他にも検討の余地が残されている要因があり、例えば、血清の種類、コーティング剤、インサート膜の材質などによっても BBB 機能は大きく変動することが知られて

いる⁵³⁻⁵⁵⁾。今後、これら残された課題を検討し、培養方法を更に最適化することで、hiBBBの機能が更に向上することが期待される。

以上、第2章ではヒト不死化BBBモデルとしてhiBBBを構築し、その機能的特性を解析した。hiBBBには培養方法の更なる最適化を含め、モデル機能向上に向けた課題も残されているものの、バリア機能や薬物排出トランスポーター機能などの薬物の中枢移行性評価に必要な基本的なBBB機能を有していた。その上、優れた汎用性を兼ね備えていることから、BBB/PBPK法の妥当性を検証する上で、hiBBBは適切なモデルであると考えられる。そこで、続く第3章では、構築したhiBBBとCNS-PBPKモデルを組み合わせたヒト脳内薬物濃度予測方法の構築に向けた検討をおこなうこととした。

第3章 CNS-PBPK モデルの構築およびヒト IVIVC 解析

第1節：序論

生理学的薬物速度論 (physiologically based pharmacokinetic, PBPK) モデルに基づく定量的な薬物動態学・薬力学的 (pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD) 解析は、医薬品開発の成功確率を向上させるために必須である。一般に PK/PD 解析には、血漿中薬物濃度が用いられるが、中枢神経系の場合、血中から脳内への薬物の移行を制限する BBB の存在により、血漿中薬物濃度を指標に脳内の標的部位における薬理作用を説明することが困難である。そのため、中枢薬開発においては脳内薬物濃度が薬効発現を直接規定するパラメータとして用いられ、この脳内薬物濃度を如何に予測するかが新薬開発成功の鍵を握る。これまでに、このような脳内薬物濃度の予測は動物を用いた実験で行われてきたが、動物とヒトの間には種差があり、ヒトと動物の薬物動態にはしばしば乖離が認められる。一方、ヒトにおいては脳内薬物濃度を直接測定できないため、Positron Emission Tomography (PET) 試験や脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中薬物濃度を代替とした評価が必要となるが、いずれも煩雑で侵襲性が高く、汎用的な方法ではない。したがって、ヒトにおける脳内薬物濃度をより簡便に予測する方法の確立が望まれている。

一般にヒトにおける薬物の体内動態予測に用いられる薬物動態モデルは、経験的モデル、semi-PBPK モデルおよび full-PBPK モデルに分類され、後者ほどモデルの複雑性が増す。経験的モデルは生体を 1~3 個のコンパートメントで記述する簡便なモデルであるが、生理学的パラメータを使用しないため、生体への外挿性は乏しい⁶⁵⁾。一方、full-PBPK モデルは非常に多くのコンパートメントから構成され、さらに実際の組織容量や血流量などの生理学的特徴に基づく情報を付加することで、経験的モデルよりもより生体に近い情報を得ることが可能である^{65, 66)}。その特徴から、ヒト検体からの生検などでは直接アクセスできない組織であっても、full-PBPK モデルを活用することにより、組織中の薬物濃度の予測が可能となり^{67, 68)}、特に中枢神経系領域においては、PET イメージングや CSF 採取を行わずともヒトでの脳内薬物濃度予測が可能であると期待されている。一方で、full-PBPK モデルはモデル構築の複雑さや、構築に多大な時間と労力を要する点で、経験的モデルと比較して汎用性に劣る。

近年、これらの問題点を克服する方法として、経験的モデルの汎用性と full-PBPK モデルの予測精度の利点を組み合わせた CNS-PBPK モデルが提唱されている¹⁰⁾。CNS-PBPK モデルは、末梢部分は経験的モデルに基づく簡便なコンパートメントで記述するのに対し、脳内は生体情報を加味した詳細なコンパートメントで詳細することで、汎用性と予測精度を併せ持つ特徴を持つ。

これまでに、CNS-PBPK モデルを用いることで、既存薬のヒト脳内薬物濃度を予測可能であることが報告されている¹⁰⁾。その予測能力を高めるために、動物の *in vivo* PK データ、*in silico* 物理化学データおよび脳由来ではない非 BMEC 細胞（例えば、Caco-2 細胞や個々のトランスポーター過剰発現細胞）を用いた *in vitro* 透過性データ、から得られた BBB 透過性パラメータがしばしば利用されている。しかしながら、動物実験データは、種差に起因する偽陰性や偽陽性のリスクを常に孕んでおり¹⁹⁾、また *in silico* 物理化学データのみでは前述のように予測が困難である。また、BMEC と非 BMEC 細胞では、細胞構造やトランスポーターの発現プロファイルが異なるため、非 BMEC 細胞の使用には賛否両論がある⁶⁹⁾。したがって、上記のような実験から得られた BBB 透過性パラメータを用いてヒト脳内薬物動態を簡便かつ精度良く予測することは困難である。

上記の課題を克服するための新たなアプローチとして、*in vitro* ヒト BBB モデルの活用が考えられる。*in vivo* ヒト BBB 透過性の代替として、トランスウェルシステムを用いた透過性実験により得られた *in vitro* の BBB 透過パラメータを CNS-PBPK モデルに組み込む方法 (BBB/PBPK 法) を用いることで、ヒト脳内薬物濃度を簡便かつ精度良く予測できると期待されている。しかしながら、これまでに *in vitro* ヒト BBB モデルから得られた BBB 透過性パラメータが、どの程度ヒト *in vivo* の BBB 透過性を反映しているかについては検証されておらず、BBB/PBPK 法の妥当性や実現可能性について検証された報告はない。

そこで、第 3 章では、第 2 章で構築した hiBBB を代表的なヒト BBB モデルとして用い、BBB/PBPK 法構築に向けて BBB 透過性に関する IVIVC (*in vitro*–*in vivo* correlation) を明らかにすることを目的とした。具体的には、ヒト臨床データを用いたトップダウンアプローチに基づき、CNS-PBPK モデルから推定したヒト *in vivo* の BBB 透過性パラメータと hiBBB から得られた *in vitro* の BBB 透過性パラメータとの IVIVC を解析し、BBB/PBPK 法を用いた新たなヒト脳内薬物濃度予測法構築の可能性について検証した。

第2節：実験材料・方法

3-2-1 CNS-PBPK モデルの構築

CNS-PBPK モデルの概要図を Fig. 22 に示した。過去の報告¹⁰⁾ で構築されたモデルに基づき、汎用性を考慮して既報のモデルをより簡便にした。各薬物の PK 解析には、1-コンパートメントモデルまたは 2-コンパートメントモデルのいずれかを使用した。解析に用いた PK パラメータは、1 次吸収速度定数 (K_a)、クリアランス (CL)、中心コンパートメントおよび末梢コンパートメントの分布容積 (V_c および V_1)、コンパートメント間クリアランス (Q_1) である。

非線形混合効果モデル (nonlinear mixed-effects model, NONMEM) による母集団薬物動態 (population pharmacokinetics, PPK) 解析は、NONMEM version 7.3 (subroutines ADVAN 13; ICON Development Solutions, Hannover, MD, USA) を用いて実施した。解析における計算方法としては、一次近似法 (first order, FO 法) を基本とし、FO 法の近似精度をさらに高めた計算方法として、条件付一次近似法 (first-order conditional estimation, FOCE 法) において個体間変動パラメータ η と個体内変動パラメータ ϵ との相関を考慮した FOCEI 法 (first-order conditional estimation method with interaction) を採用した。解析で使用した微分方程式は以下の通りである。

$$\frac{dA_{gut}}{dt} = -K_a \times A_{dose} \quad (1)$$

$$V_c \cdot \frac{dC_{Vc}}{dt} = K_a \times A_{dose} - \frac{(Q_1 + CL + Q_{ECF})}{V_c} \times f_{u,p} \times A_{Vc} + \frac{Q_1}{V_1} \times A_{V1} \times f_{u,p} + \frac{Q_{diff}}{V_{SAS}} \times A_{SAS} \quad (2)$$

$$V_1 \cdot \frac{dC_{V1}}{dt} = \frac{Q_1}{V_c} \times A_{Vc} \times f_{u,p} - \frac{Q_1}{V_1} \times A_{V1} \times f_{u,p} \quad (3)$$

$$V_{ECF} \cdot \frac{dC_{ECF}}{dt} = \frac{Q_{ECF}}{V_c} \times A_{Vc} \times f_{u,p} - \frac{Q_{diff}}{V_{ECF}} \times A_{ECF} \quad (4)$$

$$V_{LV} \cdot \frac{dC_{LV}}{dt} = \frac{Q_{diff}}{V_{ECF}} \times A_{ECF} - \frac{Q_{diff}}{V_{LV}} \times A_{LV} \quad (5)$$

$$V_{TFV} \cdot \frac{dC_{TFV}}{dt} = \frac{Q_{diff}}{V_{LV}} \times A_{LV} - \frac{Q_{diff}}{V_{TFV}} \times A_{TFV} \quad (6)$$

$$V_{CM} \cdot \frac{dC_{CM}}{dt} = \frac{Q_{diff}}{V_{TFV}} \times A_{TFV} - \frac{Q_{diff}}{V_{CM}} \times A_{CM} \quad (7)$$

$$V_{SAS} \cdot \frac{dC_{SAS}}{dt} = \frac{Q_{diff}}{V_{CM}} \times A_{CM} - \frac{Q_{diff}}{V_{SAS}} \times A_{SAS} \quad (8)$$

上記の式において、 C と A はそれぞれ薬物濃度および量、 V_c と V_1 はそれぞれ中心コンパートメントおよび末梢コンパートメントの分布容積、 Q_1 はコンパートメント間クリアランスを表し、これらは薬物に依存する PK パラメータである。 Q_{ECF} は血中から脳細胞外液 ($Brain_{ECF}$) へのクリアランスを示し、*in vivo* における BBB 透過性パラメータとして用いられる。 Q_{diff} は CSF の拡散速度を表すパラメータであり、 Q_{ECF} および Q_{diff} は薬剤固有の脳薬物動態パラメータである。 V_{LV} 、 V_{TFV} 、 V_{CM} および V_{SAS} はそれぞれ側脳室 (lateral ventricle, LV)、第3および第4脳室 (third and fourth ventricle, TFV)、大槽 (cisterna magna, CM)、くも膜下空間 (subarachnoid space, SAS) における髄液容量を表し、これらは生体固有の生理学的パラメータである。解析に用いたヒトにおける生理学的パラメータを Table 12 に示した。

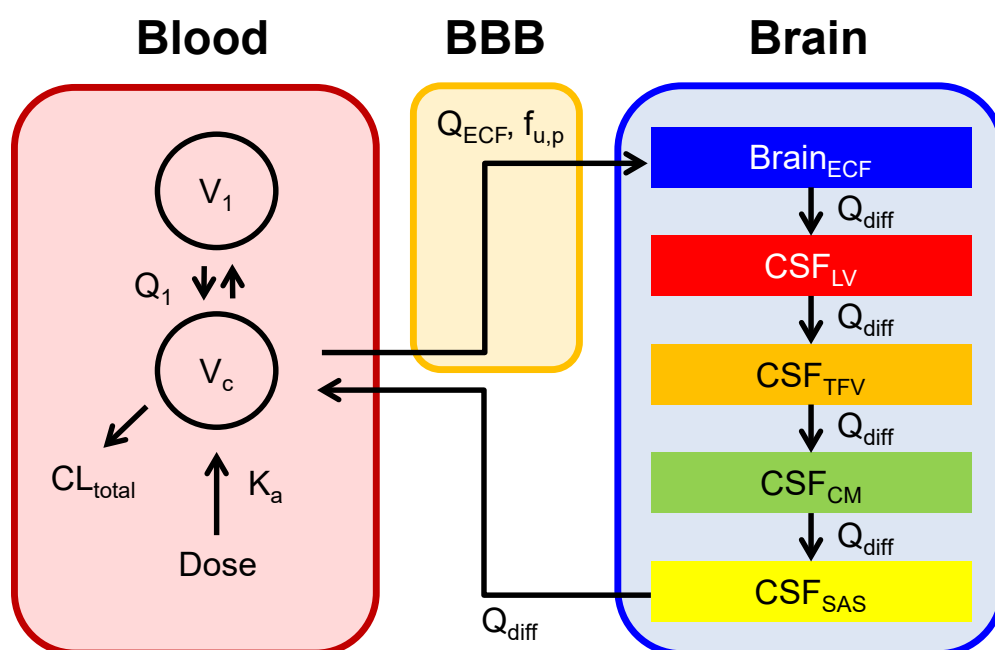


Fig. 22 Development of CNS-PBPK modeling using human clinical data

The structure of the human CNS-PBPK model is shown. The model consists of two empirical compartments for the systemic circulation and five physiologically based compartments for the CNS. $Brain_{ECF}$, brain extracellular fluid (ECF); V_{LV} , volume of cerebrospinal fluid (CSF) in the lateral ventricle; V_{TFV} , volume of CSF in the third and fourth ventricle; V_{CM} , volume of CSF in the cisterna magna; V_{SAS} , volume of CSF in the subarachnoid space.

Table 12. System-specific parameters used in CNS-PBPK modeling

Parameters	Human	References
Brain _{ECF} (mL)	260	10), 70)
V _{LV} (mL)	22.5	10), 70)
V _{TFV} (mL)	22.5	10), 70)
V _{CM} (mL)	7.5	10), 70)
V _{SAS} (mL)	107.5	10), 70)

Brain_{ECF}, brain extracellular fluid; V_{LV}, volume of CSF in the lateral ventricle; V_{TFV}, volume of CSF in the third and fourth ventricle; V_{CM}, volume of CSF in the cisterna magna; V_{SAS}, volume of CSF in the subarachnoid space

PK パラメータの個体間変動は、以下のような指数方程式に従ってモデル化した。

$$\theta_i = \theta \cdot \exp(\eta_i) \quad (9)$$

ここで、 θ_i は i 番目被験者のパラメータ値、 θ は母集団平均値、 η_i は平均値 0、分散 ω^2 の正規分布に従う確率変数である。残差として以下の比例誤差モデルを使用した。

$$C_{ij} = Y_{PRED,ij} \times (1 + \varepsilon_{ij}) \quad (10)$$

ここで、 C_{ij} は被験者 i の時間 j における薬物濃度測定値、 $Y_{PRED,ij}$ は薬物濃度推定値、 ε_{ij} は平均値 0、分散 σ^2 の正規分布に従う確率変数である。

3-2-2 視覚的事後予測性能評価 (Visual Predictive Check, VPC) によるモデルの予測性能評価

構築した CNS-PBPK モデルの予測性能を VPC により評価した。VPC とは、予測した薬物濃度の区間推定による予測範囲と実測値との比較や、特性の一致性を視覚化するシミュレーションベースの評価方法である。具体的には、モデル構築に用いた実測値の分布と、モデルからシミュレーションされた予測値の分布を比較し、モデルの予測値が実測値を包括しているか、また乖離がある場合どの程度か、どの時間帯で乖離が大きいかなどを視覚的に評価できる特徴を持つ。本解析では、構築したモデルの母集団薬物動態パラメータに基づき、推定に用いたオリジナルデータセットをシミュレーションテンプレートとして 500 回の独立したモンテカルロシミュレーションを実施した。得られた予測濃度の中央値 (中実線) と 95% 予測区間 (色塗部分) を実測値 (閉じた円) と比較し、モデルの持つ予測性能を評価した。

3-2-3 診断プロットによるモデルの適格性評価

構築した CNS-PBPK モデルの適格性を診断プロットにより検討した。診断プロットとして、各被検者の薬物濃度の実測値 (Observation, OBS) と母集団平均パラメータに基づく予測値 (prediction, PRED)、FOCE 法に対応した条件付重みつき残差 (conditional weighted residual, CWRES) と PRED、さらに CWRES と時間をそれぞれプロットすることにより、予測不十分な濃度域の有無、あるいは濃度や時間依存的な CWRES の偏りの有無を評価した。

3-2-4 BBB 透過性パラメータに関するヒト IVIVC 解析

解析に用いた 8 薬剤について、第 2 章において hiBBB を用いた透過性実験から得られた *in vitro* BBB 透過性パラメータ (P_e 値) を横軸に、ヒト臨床データを用いて 3-2-1 で構築した CNS-PBPK モデルから推定された *in vivo* BBB 透過性パラメータ (Q_{ECF}) を縦軸にプロットし、線形回帰分析により相関係数 R^2 を算出した。

第3節：結果

3-3-1 CNS-PBPK モデルの構築および *in vivo* ヒト BBB 透過パラメータ Q_{ECF} の推定

第2章において得られた hiBBB を用いた透過性実験から得られた *in vitro* Pe 値との相関関係を解析するために、ヒト臨床データを用いて CNS-PBPK モデルを構築し、ヒトでの *in vivo* BBB 透過パラメータである Q_{ECF} を推定した。解析に使用した文献で報告されているヒト臨床データを Table 13 にまとめた。ヒト臨床データの入手には限りがあり、Fig. 20 で実施した *in vitro* 透過性試験のうち、他の 11 薬物については臨床での報告がないか、あるいは解析に十分な薬物濃度情報が得られなかったため、解析に十分な情報量が得られた 8 薬物についてのみ解析をおこなった。

まず、構築した CNS-PBPK モデルの妥当性を示すために、VPC 解析をおこなった。その結果、500 回の独立したシミュレーションから得られた薬物濃度の中央値（中実線）および 95% 予測区間（色塗部分）は、実測値（閉じた円）の分布と概ね一致しており、明らかな偏りは認められなかった（Fig. 23）。また、複数の診断プロットによる解析からも、大きな偏りは認められず（Figs. 24a-c）、これらの結果から、構築した CNS-PBPK モデルが各薬剤の薬物濃度と時間のプロファイルを記述するモデルとして適切であると考えられた。次に、構築した CNS-PBPK モデルを用い、8 種の薬物における *in vivo* ヒト BBB 透過パラメータ Q_{ECF} を推定した。得られた Q_{ECF} の推定値を、他のパラメータとともに Table 14 にまとめた。

Table 13. Summary of the human clinical data

Compounds	Dosage	Number of samples	Age	Condition of patients	Sampling position	Ref
Cefotaxime	infusion	6	52 - 79	Uninflamed meninges	CSF _{SAS}	71)
Efavirenz	p.o.	80	36 - 52	HIV-1	CSF _{SAS}	72)
Indomethacin	infusion	31	0.3 - 12	Healthy children	CSF _{SAS}	73)
Gabapentin	p.o.	5	22 - 38	Partial epilepsy	CSF _{SAS}	74)
Methotrexate	infusion	1	40	Glioma	Brain _{ECF}	75)
Phenytoin	infusion	6	25 - 60	Epilepsy	CSF _{SAS}	76)
Propranolol	p.o.	37	30 - 73	Diagnosis	CSF _{SAS}	77)
Rivastigmine	p.o.	18	45 - 85	Alzheimer's disease	CSF _{SAS}	78)

Visual predictive check

Plasma and CSF/ECF concentrations of each drugs in Human

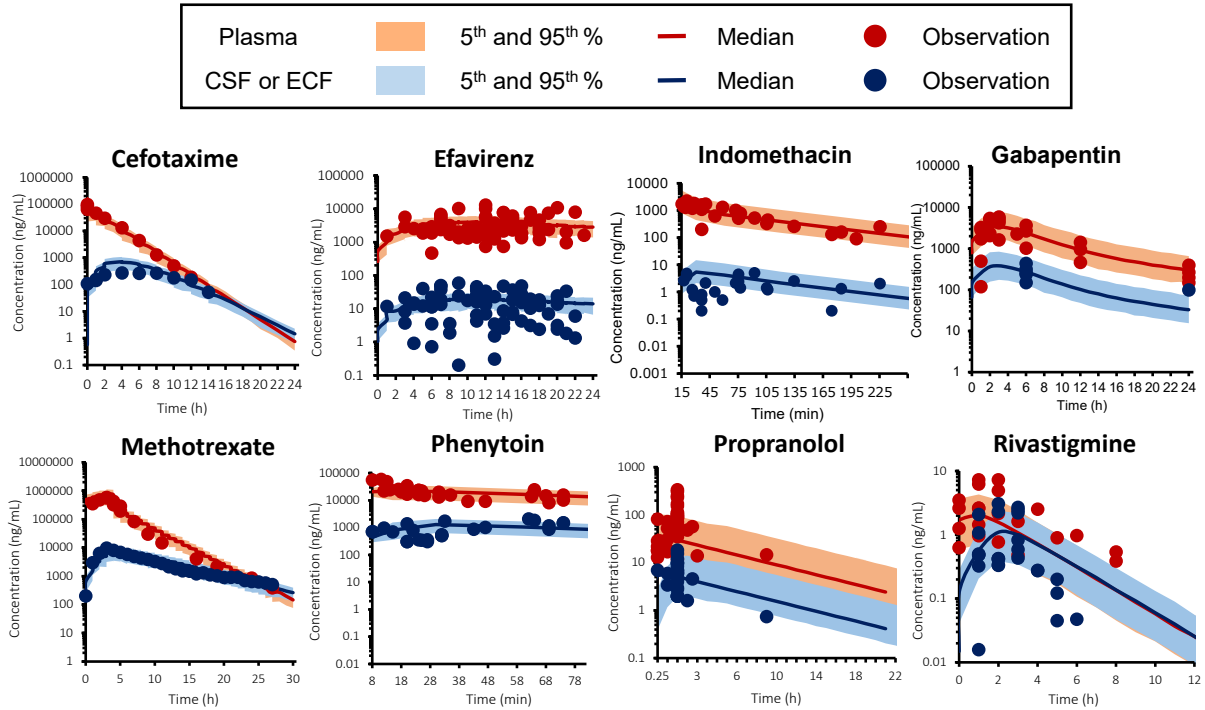


Fig. 23 Visual predictive check of the CNS-PBPK modeling

Predicted (middle solid line: median; shaded area: 5th to 95th percentile prediction interval obtained from 500 independent simulations) and observed (closed circles) concentration-time profiles for eight drugs in plasma and CSF (for methotrexate, the ECF data were collected from a microdialysis study ⁷⁵).

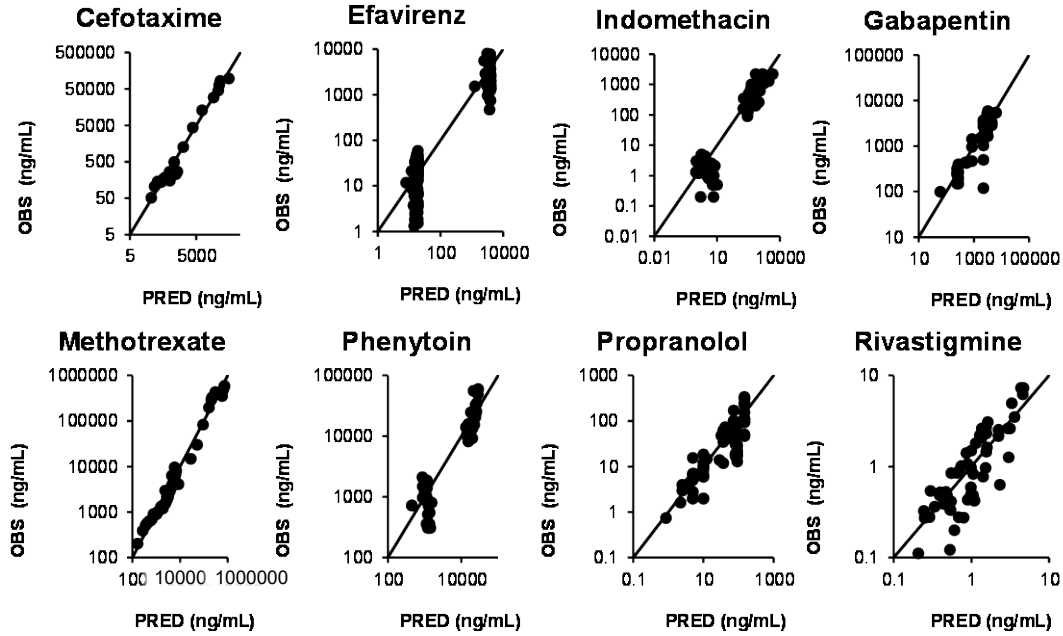
Table 14. Parameter estimates for eight drugs in CNS-PBPK modeling

Parameters	Cefotaxime	Efavirenz	Indometacin	Gabapentin	Methotrexate	Phenytoin	Propranolol	Rivastigmine
$f_{u,p}$	0.71 (Ref. 79)	0.005 (Ref. 73)	0.1 (Ref. 73)	0.97 (Ref. 80)	0.48 (Ref. 79)	0.1 (Ref. 81)	0.064 (Ref. 82)	0.36 (Ref. 78)
K_a (h ⁻¹)	-	0.179 (0.000379)	-	0.420 (0.101)	-	-	0.119 (0.0344)	0.421 (0.16)
CL (L/h)	14.8	804 (1.14)	22.7 (3.82)	18.5 (3.13)	13.2 (0.0393)	151 (50.3)	1450 (234)	418 (69.5)
Q_1 (L/h)	43.5	-	46.6 (18.9)	9.59 (4.73)	10.7 (0.107)	-	-	9940 (1430)
Q_{ECF} (L/h)	0.00355	0.0978 (0.000146)	0.031 (0.00867)	0.00938 (0.00315)	0.00131 (0.0000305)	0.070 (0.0137)	0.443 (0.619)	0.871 (0.165)
Q_{diff} (L/h)	0.101	9.93 (0.000984)	1.05 (0.223)	6.42 (4.18)	0.0401 (0.0000299)	3.39 (0.560)	0.723 (0.334)	0.424 (0.0861)
V_c (L/h)	1.04	98.5 (0.151)	1.44 (0.439)	77.4 (13.0)	1.5 (0.00248)	29.4 (5.74)	1.63 (2.92)	0.530 (0.157)
V_1 (L/h)	15.6	-	1.93 (0.673)	76.4 (18.2)	9.4 (0.0628)	-	-	124 (72.1)

The parameters were estimated by NONMEM (subroutine ADVAN 13) using the plasma and CSF or ECF concentration-time profile of each drug in humans. The values in parentheses represent the relative standard error of the estimate.

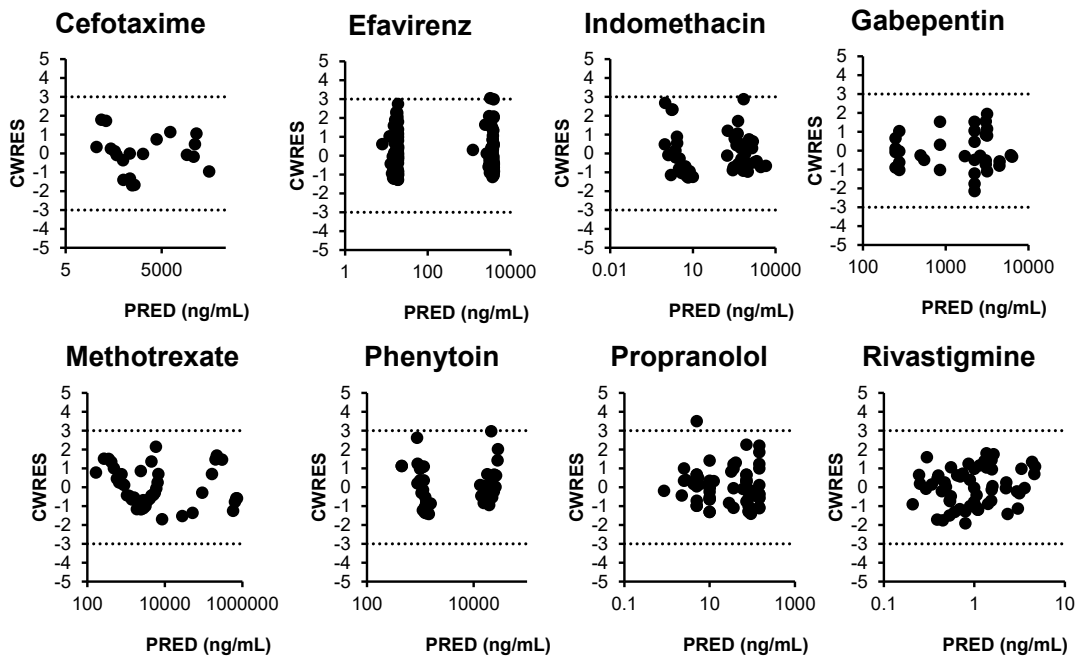
Diagnostic plots

a Population analysis-predicted versus observed values



Diagnostic plots

b Conditional weighted residuals (CWRES) versus population analysis-predicted values



Diagnostic plots

C Conditional weighted residuals (CWRES) versus time

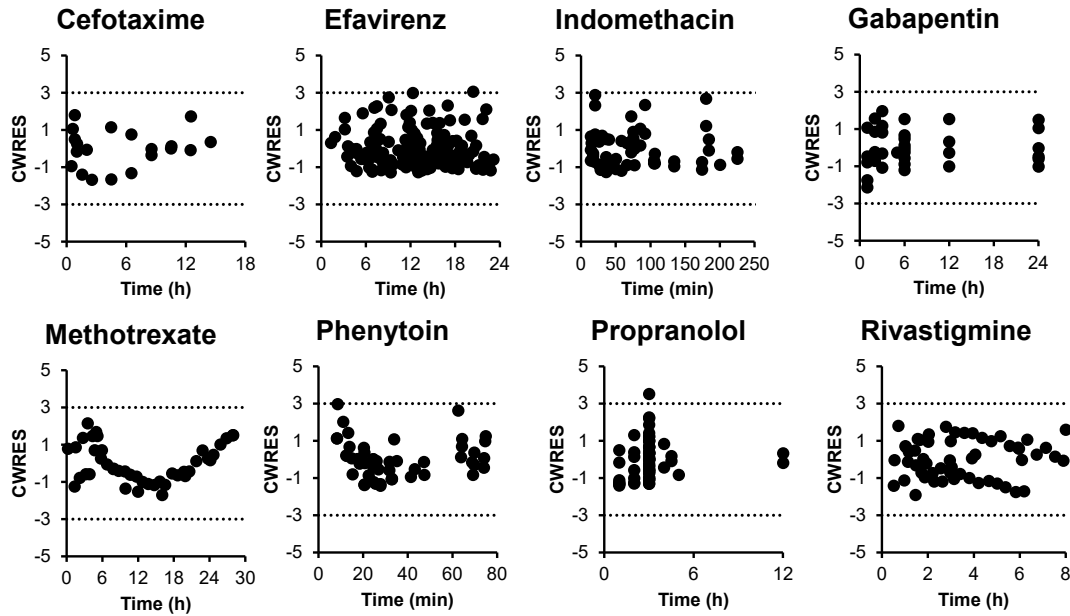


Fig. 24 Diagnostic plots for the CNS-PBPK modeling

(a) Diagnostic plots for population analysis-predicted versus observed values. The line represents a correlation coefficient of 1. (b) Diagnostic plots for conditional weighted residuals (CWRES) versus population analysis-predicted values. (c) Diagnostic plots for CWRES versus time.

3-3-2 BBB 透過性パラメータに関するヒト IVIVC 解析

8 薬物について第 2 章で hiBBB を用いて算出した *in vitro* の Pe 値と、3-3-1 で推定した *in vivo* の Q_{ECF} との相関を解析した。その結果、メトトレキサートのデータポイントは若干ずれているものの、他の 7 薬物（リバスチグミン、プロプラノロール、エファビレンツ、フェニトイン、インドメタシン、ガバペンチンおよびセフトキシム）については直線回帰曲線に近接しており、高い相関係数 ($R^2=0.96$) が認められた (Fig. 25)。この結果は、少なくとも解析した 8 薬物について、hiBBB を用いて得られた *in vitro* の BBB 透過性パラメータが、ヒト *in vivo* で推定された値を反映することを明確に示している。

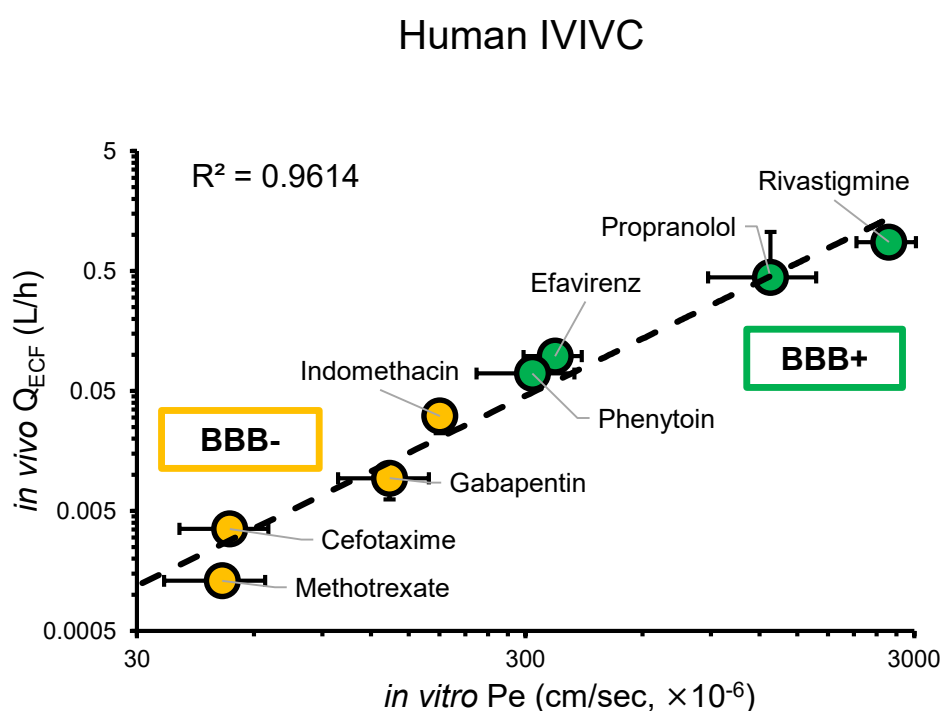


Fig. 25 Correlation analysis between *in vitro* Pe values obtained from the hiBBB model and *in vivo* Q_{ECF} estimated by CNS-PBPK modeling using human clinical data

IVIVC using *in vitro* BBB permeability (Pe) obtained from the hiBBB models (x-axis) and *in vivo* brain permeability (Q_{ECF}) (y-axis) determined by CNS-PBPK modeling using human clinical data, is shown. The dashed line is generated by linear regression analysis with R^2 value.

第4節：考察

In vitro ヒト BBB モデルと CNS-PBPK モデリングを組み合わせた手法 (BBB/PBPK 法) の確立により、ヒト脳内薬物濃度を簡便かつ精度良く予測可能になると期待されている。しかしながらこの方法には前例がなく、BBB/PBPK 法を検証するために必要な *in vitro* ヒト BBB モデルの機能レベルを含め、未だ検証されていない。第3章では、第2章で構築した hiBBB を代表的なヒト BBB モデルとして用い、BBB 透過性パラメータに関する *in vitro* と *in vivo* の高い相関関係を明らかにした。この結果は、BBB/PBPK 法を用いた脳内薬物濃度予測への応用可能性を支持するものである。

序論で述べたように、BBB/PBPK 法はその高い実用性から、医薬品開発への応用が期待されているが、その実現のためには、ヒト BBB モデルから得られた *in vitro* BBB 透過性パラメータが *in vivo* での BBB 透過性パラメータをどの程度反映するかに大きく依存する。この点を明らかとするために、本研究では、第2章において hiBBB を用いて算出した各薬物の *in vitro* P_e 値と、ヒト臨床情報を用いたトップダウンアプローチに基づき、構築した CNS-PBPK モデルから推定した 8 薬物の *in vivo* ヒト BBB 透過性 (Q_{ECF}) との相関関係を解析した。その結果、 P_e 値と Q_{ECF} の相関は $R^2 = 0.96$ と非常に高く、少なくとも今回解析した 8 薬物については、hiBBB は *in vivo* の BBB 透過性をよく再現することが明らかとなった。得られる予測精度は、実際に使用する BBB モデルの性能に依存するものの、hiBBB を用いた検討により、理論的には hiBBB 以外の他のヒト BBB モデルにおいても本アプローチが適応可能である可能性が考えられる。これらの結果は、今後の BBB/PBPK 法開発において重要な知見となると考えられる。

BBB/PBPK 法に利用可能なヒト BBB モデルが満たすべき条件として重要なポイントは、hiBBB のように薬物の BBB 透過性に関与する様々なトランスポーターのうち、特に取り込み/排出トランスポーターの機能を 1 つの評価系に備えている点である。医薬品開発の初期段階においては、他の *in vitro* 試験の結果から個々のトランスポーターの関与が疑われる場合でも、個々のトランスポーターの機能が全体の BBB 透過性に及ぼす正味の寄与を評価することは非常に困難であった。

しかし、例えば今回評価したガバペンチンのように、*in vitro* ヒト BBB モデルを使用することで、複合的な BBB 透過要因を 1 つの評価系で評価可能である。実際にガバペンチンは取り込みトランスポーター LAT1 の基質である⁸³⁾と同時に、排出トランスポーター P-gp の基質でもあることが報告されている⁸⁴⁾。このように複数のトランスポーターが関与する薬物の場合、従来のトランスポーター発現系での評価のみでは、ヒト BBB 透過性の予測は困難であった。それに対し、本研究において hiBBB を用いた透過性試験の結果、ガバペンチンは Fig. 20 に示すように比較的低い BBB 透過性を示すことが明らかとなった。実際に、*in vitro* で得られた結果は、ガバ

ペンチンがヒト脳内への分布性が低いこと⁷⁴⁾や、本研究で推定した *in vivo* のヒト Q_{ECF} が低いことと一致する。したがって、hiBBB を用いることで、BBB/PBPK 法に使用するための適切なヒト BBB 透過性パラメータが得られることが期待される。また、BBB モデルを用いることで、時間と労力を要する動物実験や複数のトランスポーター発現系を必要とする従来のいくつかのアプローチと比べて圧倒的に容易であり、汎用的であることも特筆すべき点である。

以上より、本研究で得られた結果は、ヒト脳内薬物濃度予測の新たなアプローチとして、BBB/PBPK 法の開発を強く促進するものである。しかしながら、BBB/PBPK 法の信頼性をより高めるためには、今後 *in vitro* ヒト BBB モデルにおけるトランスポーター発現量の定量化、CNS-PBPK モデルの最適化など、様々な課題に取り組む必要がある。特に、予測が困難なトランスポーター基質を含めた予測法を確立する上で、今後より多くのトランスポーター基質を用いた IVIVC 解析結果の蓄積は優先度の高い課題である。今回の研究では、8 種類の薬物のうち、トランスポーター基質に分類されるものは 3 種類のみであり、トランスポーター基質に対する BBB/PBPK 法の応用性を厳密に評価するには十分な数ではない。また、BCRP 基質であるメトトレキサートのプロットは、明確な理由は不明ではあるものの、線形回帰曲線からわずかに外れていた。したがって、ヒト臨床データの入手には多くの制約があるものの、今後はトランスポーター基質を含む多様な薬物の IVIVC データを追加収集することにより、BBB/PBPK 法の実現可能性と有用性を詳細に検討する必要がある。これらの研究を推進する上で、より精度の高い結果を得るためには、サンプリングポイント、投与タイミングおよび患者情報など、可能な限り関連する多くの臨床情報を収集することが望ましいと思われる。

以上、第 3 章では BBB/PBPK 法の実現可能性について検討した。私が知る限り、このような検証は今回が初めての試みである。今回、検討した薬物数は限られるものの、 Q_{ECF} 値と Pe 値の間には高い相関があり、*in vitro* ヒト BBB モデルを用いることで BBB/PBPK 法に使用可能な BBB 透過性パラメータが得られることが示唆された。

総括

本研究では、新たな *in vitro* ヒト BBB モデルの確立およびそのモデルを用いて薬物の脳移行性パラメータに関する IVIVC を明らかとすることにより、BBB/PBPK 法を用いた新たなヒト脳内薬物濃度予測法構築の基盤を確立することを目的とした。第 1 章では、汎用性および高い分化形質を保持したヒト不死化アストロサイト HASTR/ci35 を樹立した。第 2 章では、汎用性に優れた 3 種のヒト不死化 BBB 細胞を用いて *in vitro* ヒト不死化 BBB 共培養モデル hiBBB を構築した。hiBBB は、BBB としての基本的な機能であるバリア機能や、P-gp および BCRP などの薬剤排出トランスポーター機能を保持し、これらの機能により、複数の薬物の BBB 透過性を判別可能であることが明らかとなった。第 3 章では、hiBBB を用いて BBB 透過性に関するヒト IVIVC を検討した。その結果、8 種の薬剤において、それらの *in vitro* BBB 透過速度と、文献情報を基に CNS-PBPK モデルにより算出した *in vivo* ヒト脳移行速度との間には、高い相関関係が認められた ($R^2 = 0.96$)。したがって、*in vitro* ヒト BBB モデルを用いた透過性試験により、BBB/PBPK 法に使用可能な *in vivo* ヒト BBB 透過性パラメータを得られることが明らかとなった。

今回の研究結果は、ヒトにおける脳内薬物濃度予測のための有望なアプローチとして、BBB/PBPK 法の開発を後押しするものであると考えられる。今後、hiBBB の更なる機能特性解明と機能改良のための研究が必要ではあるものの、hiBBB は中枢薬開発における薬物の中枢移行性評価に有用なツールとなる可能性が考えられ、BBB/PBPK 法を用いた高精度な脳内薬物濃度予測法の開発を通じて、中枢薬開発の促進に大きく貢献すると期待される。

謝辞

本論文の作成にあたり、多くの方々に御指導、御鞭撻を賜りました。

本研究の遂行にあたり、終始に渡り御指導、御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 個別化薬物治療学教室 降幡知巳教授に厚く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、御助言と御協力を賜りました東京薬科大学薬学部 個別化薬物治療学教室 森尾花恵助教に感謝申し上げます。

本研究に関し、有益な御助言と御協力を賜りましたエーザイ株式会社 グローバル薬物動態研究部の皆様に感謝申し上げます。

本研究に関し、快く実験に参加頂き、データを提供頂きました東京薬科大学薬学部 個別化薬物治療学教室の研究員の皆様に感謝申し上げます。

本研究に理解を示し、支援を賜るとともに、社内において研究の機会を与えて頂きました小野薬品工業株式会社の皆様に感謝申し上げます。

研究生生活を終始に渡り応援し、支えて頂いた家族に心より感謝致します。

最後に、ここに全ての方の御名前を挙げることはできませんでしたが、これまで私を支えて頂いた全ての方々に心より感謝申し上げます。研究面に限らず、私の周りには志が高く寛大な諸先輩方を始め、共に学び競い合える同志の存在があり、私はとても恵まれた環境にいると心から実感しております。これからも皆様への感謝の気持ちを忘れることなく、多くの縁を結びながら、より成長していきたいと思えます。

引用文献

- 1) R Booth, H Kim, *Lab Chip.*, 24;12(10):1784-92 (2012).
- 2) R Cecchelli, V Berezowski, S Lundquist, M Culot, M Renftel, M Dehouck, L Fenart, *Nat Rev Drug Discov.*, 6(8):650-61 (2007).
- 3) N J Abbott, A A K Patabendige, D E M Dolman, S R Yusof, D J Begley, *Neurobiol Dis.*, 37(1):13-25 (2010).
- 4) W A Banks, *Nat Rev Drug Discov.*, 15(4):275-92 (2016).
- 5) N J Abbott, *J Inherit Metab Dis.*, 36(3):437-49 (2006).
- 6) W N Pardridge, *Drug Discovery Today.*, 37(1):13-25 (2010).
- 7) H C Helms, N J Abbott, M Burek, R Cecchelli, P Couraud, M A Deli, C Förster, H J Galla, I A Romero, E V Shusta, M J Stebbins, E Vandenhoute, B Weksler, B Brodin, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 36(5):862-90 (2016).
- 8) W M Pardridge, *NeuroRx.*, 2(1):3-14 (2005).
- 9) K Shimomura, T Okura, S Kato, P Couraud, J Schermann, T Terasaki, Y Deguchi, *Fluids Barriers CNS.*, 26;10(1):8 (2013).
- 10) Y Yamamoto, M Danhof, E C M de Lange, *AAPS J.*, 19(4):891-909 (2017).
- 11) R Ito, K Umehara, S Suzuki, K Kitamura, K Nunoya, Y Yamaura, H Imawaka, S Izumi, N Wakayama, T Komori, N Anzai, H Akita, T Furihata, *Mol Pharm.*, 4;16(11):4461-4471 (2019).
- 12) K Umehara, Y Sun, S Hiura, K Hamada, M Itoh, K Kitamura, M Oshima, A Iwama, K Saito, N Anzai, K Chiba, H Akita, T Furihata, *Mol Neurobiol.*, 55(7):5993-6006 (2018).
- 13) FE Parkinson, W Xiong, CR Zamzow, *Neurol Res.*, 27:153-160 (2005).
- 14) HW Nam, SR McIver, DJ Hinton, MM Thakkar, Y Sari, FE Parkinson, PG Haydon, and DS Choi, *Alcohol Clin Exp Res.*, 36:1117-1125 (2012).
- 15) C Grewer, A Gameiro, T Rauen, *Pflugers Arch.*, 466:3-24 (2014).
- 16) P J Gaillard, A G de Boer, *Eur J Pharm Sci.*, 12(2):95-102 (2000).
- 17) I Megard, A Garrigues, S Orłowski, S Jorajuria, P Clayette, E Ezan, A Mabondzo, *Brain Res.*, 15;927(2):153-67 (2002).

- 18) S Syvänen, O Lindhe, M Palner, B R Kornum, O Rahman, B Långström, G M Knudsen, M Hammarlund-Udenaes, *Drug Metab Dispos.*, 37(3):635-43 (2009).
- 19) Y Uchida, S Ohtsuki, Y Katsukura, C Ikeda, T Suzuki, J Kamiie, T Terasaki, *J Neurochem.*, 117(2):333-45 (2011).
- 20) M S Warren, N Zerangue, K Woodford, L M Roberts, E H Tate, B Feng, C Li, T J Feuerstein, J Gibbs, B Smith, S M de Moraes, W J Dower, K J Koller, *Pharmacol Res.*, 59(6):404-13 (2009).
- 21) NA Oberheim, T Takano, X Han, W He, JH Lin, F Wang, Q Xu, JD Wyatt, W Pilcher, JG Ojemann, BR Ransom, SA Goldman, M Nedergaard, *J Neurosci.*, 29:3276-3287 (2009).
- 22) V Josserand, H Pélerin, B de Bruin, B Jégo, B Kuhnast, F Hinnen, F Ducongé, R Boisgard, F Beuvon, F Chassoux, C Daumas-Duport, E Ezan, F Dollé, A Mabondzo, B Tavitian, *J Pharmacol Exp Ther.*, 316(1):79-86 (2006).
- 23) O Lacombe, O Videau, D Chevillon, A Guyot, C Contreras, S Blondel, L Nicolas, A Ghetas, H Bénech, E Thevenot, A Pruvost, S Bolze, L Krzaczkowski, C Prévost, A Mabondzo, *Mol Pharm.*, 6;8(3):651-63 (2011).
- 24) A Mabondzo, M Bottlaender, A Guyot, K Tsaouin, J R Deverre, P V Balimane, *Mol Pharm.*, 4;7(5):1805-15 (2010).
- 25) K Hatherell, P Couraud, I A Romero, B Weksler, G J Pilkington, *J Neurosci Methods.*, 15;199(2):223-9 (2011).
- (2018).
- 26) D E Eigenmann, G Xue, K S Kim, A V Moses, M Hamburger, M Oufir, *Fluids Barriers CNS.*, 22;10(1):33 (2013).
- 27) B Poller, H Gutmann, S Krähenbühl, B Weksler, I Romero, P Couraud, G Tuffin, J Drewe, J Huwyler, *J Neurochem.*, 107(5):1358-68 (2008).
- 28) T Ide, *Yakugaku Zasshi.*, 126(11):1087-115 (2006).
- 29) Y Tabuchi, Y Arai, S Ohta, H Shioya, R Takahashi, M Ueda, N Takeguchi, S Asano, M Obinata, *Cell Struct Funct.*, 27(2):71-9 (2002).
- 30) M A Saleem, M J O'Hare, J Reiser, R J Coward, C D Inward, T Farren, C Y Xing, L Ni, P W Mathieson, P Mundel, *J Am Soc Nephrol* :13-25 (2010).

- 31) L Roybon, NJ Lamas, A Garcia-Diaz, EJ Yang, R Sattler, V Jackson-Lewis, YA Kim, CA Kachel, JD Rothstein, S Przedborski, H Wichterle, CE Henderson, *Cell Rep.*, 4:1035-1048 (2013).
- 32) MC McKenna, *Front Endocrinol.*, 4:191 (2013).
- 33) H Tani, CG Dulla, Z Farzampour, A Taylor-Weiner, JR Huguenard, RJ Reimer, *Neuron.*, 81:888-900 (2014).
- 34) O Bar-Peled, H Ben-Hur, A Biegon, Y Groner, S Dewhurst, A Furuta, JD Rothstein, *J Neurochem.*, 69:2571-2580 (1997).
- 35) A Furuta, JD Rothstein, LJ Martin, *J Neurosci.*, 17:8363-8375 (1997).
- 36) J Wu, MR Lee, S Choi, T Kim, DA Choi, *Alcohol Clin Exp Res.*, 34:1110-1117 (2010).
- 37) I Guéna, B Mignotte, *FEBS Lett.*, 374:384-386 (1995).
- 38) FJ Lovicu, JW McAvoy, *Development.*, 128:5075-5084 (2001).
- 39) RS Herbst, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 59:21-26 (2004).
- 40) MF McManus, LC Chen, I Vallejo, M Vallejo, *J Neurosci.*, 19:9004-9015 (1999).
- 41) S Matsuura, Y Ikegaya, MK Yamada, N Nishiyama, N Matsuki, *Glia.*, 37:178-182 (2002).
- 42) A Adornetto, V Pagliara, GD Renzo, R Arcone, *FEBS Open Bio.*, 3:459-466 (2013).
- 43) M Montminy, *Annu Rev Biochem.*, 66:807-822 (1997).
- 44) BM Burgering, JL Bos, *Trends Biochem Sci.*, 20:18-22 (1995).
- 45) M Kurino, K Fukunaga, Y Ushio, E Miyamoto, *J Neurochem.*, 67:2246-2255 (1996).
- 46) PJ Stork, JM Schmitt, *Trends Cell Biol.*, 12(6):258-66 (2002).
- 47) M V Sofroniew, *Nat Rev Neurosci.*, 16 (5), 249-263 (2015).
- 48) A D Wong, M Ye, A F Levy, J D Rothstein, D E Bergles, P C Searson, *Front Neuroeng.*, 30:6:7 (2013).

- 49) L B Thomsen, A Burkhart, T Moos, *PLoS One.*, 4;10(8):e0134765 (2015).
- 50) S Nakagawa, M A Deli, H Kawaguchi, T Shimizudani, T Shimono, A Kittel, K Tanaka, M Niwa, *Neurochem Int.*, 54(3-4):253-63 (2009).
- 51) B D Gastfriend, S P Palecek, E V Shusta, *Curr Opin Biomed Eng.*, 5:6-12 (2018).
- 52) F Sivandzade, L Cucullo, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 38(10):1667-1681
- 53) Diane M Wuest 1, Kelvin H Lee, *Biotechnol J.*, 7(3):409-17 (2012).
- 54) E S Lippmann, A Al-Ahmad, S M Azarin, S P Palecek, E V Shusta, *Sci Rep.*, 24;4:4160 (2014).
- 55) S Won, I Sayeed, B L Peterson, B Wali, J S Kahn, D G Stein, *PLoS One.*, 27;10(3):e0122821 (2015).
- 56) F Chen, T Hori, N Ohashi, A Baine, C B Eckman, J H Nguyen, *Hepatology.*, 53(4):1294-305 (2011).
- 57) S Jiang, R Xia, Y Jiang, L Wang, F Gao, *PLoS One.*, 14;9(2):e86407 (2014).
- 58) A D Marco, O G Paz, I Fini, D Vignone, A Cellucci, M R Battista, G Auciello, L Orsatti, M Zini, E Monteagudo, V Khetarpal, M Rose, C Dominguez, T Herbst, L Toledo-Sherman, V Summa, I Muñoz-Sanjuán, *Mol Pharm.*, 6;16(5):2069-2082 (2019).
- 59) B P Daniels, L Cruz-Orengo, T J Pasieka, P Couraud, I A Romero, B Weksler, J A Cooper, T L Doering, R S Klein, *Neurobiol Dis.*, 37(1):13-25 (2013).
- 60) M S Thomsen, S Birkelund, A Burkhart, A Stensballe, T Moos, *J Neurochem.*, 140(5):741-754 (2017).
- 61) K Kitamura, R Ito, K Umehara, H Morio, K Saito, S Suzuki, M Hashimoto, Y Saito, N Anzai, H Akita, K Chiba, T Furihata, *J Pharmacol Sci.*, 137(4):350-358 (2018).
- 62) I Sá-Pereira, D Brites, M A Brito, *Mol Neurobiol.*, 45(2):327-47 (2012).
- 63) B Engelhardt, S Liebner, *Cell Tissue Res.*, 355(3):687-99 (2014).
- 64) A D Wong, M Ye, A F Levy, J D Rothstein, D E Bergles, Pe C Searson, *Front Neuroeng.*, 30;6:7. (2013).
- 65) L Aarons, *Br J Clin Pharmacol.*, 60(6):581-3 (2005).

- 66) I Nestorov, *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 3(2):235-49 (2007).
- 67) X Liu, B J Smith, C Chen, E Callegari, S L Becker, X Chen, J Cianfrogna, A C Doran, S D Doran, J P Gibbs, N Hosea, J Liu, F R Nelson, M A Szewc, J V Deussen, *J Pharmacol Exp Ther.*, 313(3):1254-62 (2005).
- 68) N Tsamandouras, A Rostami-Hodjegan, L Aarons, *Br J Clin Pharmacol.*, 79(1):48-55 (2015).
- 69) N S Veszelka, A Tóth, F R Walter, A E Tóth, I Gróf, M Mészáros, A Bocsik, É Hellinger, M Vastag, G Rákhely, M A Deli, *Front Mol Neurosci.*, 22;11:166 (2018).
- 70) Y Yamamoto, P A Väilitalo, D van den Berg, R Hartman, W van den Brink, Y C Wong, D R Huntjens, J H Proost, A Vermeulen, W Krauwinkel, S Bakshi, V Aranzana-Climent, S Marchand, C Dahyot-Fizelier, W Couet, M Danhof, J G C van Hasselt, E C M de Lange, *Neurobiol Dis.*, 37(1):13-25 (2010).
- 71) R Nau, H W Prange, P Muth, G Mahr, S Menck, H Kolenda, F Sörgel, *Antimicrob Agents Chemother.*, 37(7):1518-24 (1993).
- 72) B M Best, P P Koopmans, S L Letendre, E V Capparelli, S S Rossi, D B Clifford, A C Collier, B B Gelman, G Mbeo, J A McCutchan, D M Simpson, R Haubrich, R Ellis, I Grant, CHARTER Group, *J Antimicrob Chemother.*, 66(2):354-7 (2011).
- 73) A Mannila, E Kumpulainen, M Lehtonen, M Heikkinen, M Laisalmi, T Salo, J Rautio, J Savolainen, H Kokki, *J Clin Pharmacol.*, 47(1):94-100 (2007).
- 74) E Ben-Menachem, L I Persson, T Hedner, *Epilepsy Res.*, 11(1):45-9 (1992).
- 75) J O Blakeley, J Olson, S A Grossman, X He, J Weingart, J G Supko, New Approaches to Brain Tumor Therapy (NABTT) Consortium, *J Neurooncol.*, 91(1):51-8 (2009).
- 76) L Gaohua, S Neuhoff, T N Johnson, A Rostami-Hodjegan, M Jamei, *Drug Metab Pharmacokinet.*, 31(3):224-33 (2016).
- 77) E A Taylor, D Jefferson, J D Carroll, P Turner, *Br J Clin Pharmacol.*, 12(4):549-59 (1981).
- 78) J V Gobburu, V Tammara, L Lesko, S S Jhee, J J Sramek, N R Cutler, R Yuan, *J Clin Pharmacol.*, 41(10):1082-90 (2001).
- 79) M Fridén, S Winiwarter, G Jerndal, O Bengtsson, H Wan, U Bredberg, M Hammarlund-Udenaes, M Antonsson, *J Med Chem.*, 22;52(20):6233-43 (2009).

- 80) S W Paine, K Ménochet, R Denton, D F McGinnity, R J Riley, *Drug Metab Dispos.*, 39(6):1008-13 (2011).
- 81) K Sadeghi, F Hadi, A Ahmadi, H Hamishehkar, M Beigmohammadi, A Mahmoodpoor, M R Rouini, S Farhudi, N Hendoui, A Najafi, M Mojtahedzadeh, *J Res Pharm Pract.*, 2(3):105-9 (2013).
- 82) G H Evans, A S Nies, D G Shand, *J Pharmacol Exp Ther.*, 186(1):114-22 (1973).
- 83) D Dickens, S D Webb, S Antonyuk, A Giannoudis, A Owen, S Rädisch, S S Hasnain, M Pirmohamed, *Biochem Pharmacol.*, 1;85(11):1672-83 (2013).
- 84) H Nakanishi, A Yonezawa, K Matsubara, I Yano, *Eur J Pharmacol.*, 15;710(1-3):20-8 (2013).

主論文目録

本研究の内容は以下の論文に発表した。

第 1 章

T Furihata, R Ito, A Kamiichi, K Saito and K Chiba.

Establishment and characterization of a new conditionally immortalized human astrocyte cell line.

J Neurochem., 136(1):92-105 (2016).

第 2 章

R Ito, K Umehara, S Suzuki, K Kitamura, K Nunoya, Y Yamaura, H Imawaka, S Izumi, N Wakayama, T Komori, N Anzai, H Akita and T Furihata.

A Human Immortalized Cell-Based Blood-Brain Barrier Triculture Model: Development and Characterization as a Promising Tool for Drug-Brain Permeability Studies.

Molecular Pharmaceutics., 16, 4461-4471 (2019).

第 3 章

R Ito, H Morio, T Baba, Y Sakaguchi, N Wakayama, R Isogai, Y Yamaura, T Komori and T Furihata

In Vitro-In Vivo Correlation of Blood-Brain Barrier Permeability of Drugs: A Feasibility Study Towards Development of Prediction Methods for Brain Drug Concentration in Humans.

Pharm Res., 39, 1575-1586 (2022).