

氏名（本籍）	いとう りょう 伊藤 涼（大阪府）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 378 号
学位授与の日付	令和 4 年 7 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 降幡 知巳 教授 井上 勝央 教授 根岸 洋一 教授 山折 大

論文内容の要旨

中枢神経系（central nervous system, CNS）疾患に対する治療薬開発は他の疾患領域と比べ著しく困難である。その主な要因に血液脳関門（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脳内の薬物濃度予測が困難であることが挙げられる。

BBB は、脳毛細血管内皮細胞（brain microvascular endothelial cells, BMEC）とそれを取り囲むアストロサイトおよびペリサイトから成る脳血管構造を実体とし、その関門機能により、薬物の脳移行を厳密に制限している。そのため、薬剤に薬理作用があっても十分量脳内に届かないがために治療効果を得られず、開発中段に至る薬剤も多い。このように、中枢薬開発においては、如何にしてヒトにおける脳内薬物濃度を予測するかが新薬開発成功の鍵を握る。一方で、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 試験や脳脊髄液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、医薬品開発において、候補化合物の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 モデルが提唱されている。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、汎用性と予測精度を併せ持つ特徴を持つ。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。

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、文献情報を利用可能である。一方で、ヒト *in vitro* で脳薬物動態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、このモデルを用いることにより、薬物のヒト脳内移行に関する情報を得ることができる。したがって、既知の生体情報と *in vitro* ヒト BBB モデルから得られる薬物の脳移行性パラメータに基づき、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考えられる（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。

そこで本研究では、新たな *in vitro* ヒト BBB モデルの構築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ヒト 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 ヒト不死化アストロサイトの樹立とその機能解析¹⁾

上述のように、*in vitro* ヒト BBB モデルは薬物の脳移行性を評価するための有用な *in vitro* ツールとして期待されているが、一方でモデル構築に用いられるヒト初代培養細胞の安定供給は困難であり、また細胞増殖能が低くかつ高額で汎用性に乏しいため、創薬現場での実用化には至っていない。そこで、その課題を解決するためにこれまでに、汎用性に優れたヒト不死化 BBB モデルの構築に向けて、BBB 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は樹立されているが、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。そこで第 1 章では、ヒト不死化アストロサイトを樹立し、その分化形質を明らかにすることを目的とした。

ヒト初代培養アストロサイトに 2 種の不死化遺伝子を導入し、ヒト不死化アストロサイト human astrocyte / conditionally immortalized clone 35 (HASTR/ci35) を樹立した。HASTR/ci35 は優れた増殖能を有し、長期継代培養も可能であることから汎用性に優れた細胞であることが明らかとなった。また、培養条件を最適化して HASTR/ci35 が 24 時間の短時間で分化誘導可能な培養条件を見出した。細胞機能解析の結果、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を有し、アストロサイトとしての重要な機能を保持していた。したがって、HASTR/ci35 は汎用性かつ分化形質を保持する新たな *in vitro* ヒトアストロサイトモデルであり、*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²⁾

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。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 細胞を組み合わせて構築される 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 (Fig.1)、その機能特性を明らかとすることを目的とした。

hiBBB には、細胞間接着因子や P-糖蛋白質 (P-glycoprotein, P-gp) および乳癌耐性蛋白質 (breast cancer resistance protein, BCRP) などの薬物排出トランスポーターの発現および機能が認められた。これらの働きにより、hiBBB は細胞間非透過性マーカーに対するバリア機能や P-gp 基質 (ローダミン 123) および BCRP 基質 (ダントロレン) に対する薬物排出能など、薬物の中枢移行性評価に必要な基本的な BBB 機能を併せ持つことが明らかとなった (Fig. 2)。またその機能性は、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) と同程度であった。

そこで、hiBBB の薬物脳移行性評価への応用性を明らかとするため、既知の複数の BBB 透過性/非透過性薬物を用いた *in vitro* 透過性試験を行った。その結果、期待通り BBB 透過性薬物 (受動拡散透過型薬物・カチオン輸送体基質) では高い脳移行速度 P_e (permeability coefficient) 値を示した。一方で、BBB 非透過性薬物 (P-gp/BCRP 基質・細胞間非透過マーカー) では低い P_e 値を示した。また、評価感度の指標である P_e 値のダイナミックレンジは最大 450 倍と優れていることが明らかとなった (Fig. 3)。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と考えられた。そのうえ、不死化細胞の利点である優れた汎用性を兼ね備えていることから、hiBBB は BBB/PBPK 法の妥当性を検証するうえで適切なモデルであると考えられた。

Fig.1 Immortalized cell-based human BBB model (hiBBB model)

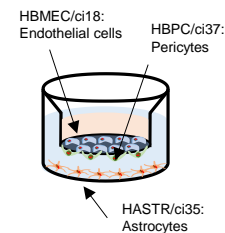


Fig. 2 Characterization of the BBB functionalities in the hiBBB and the hprBBB models

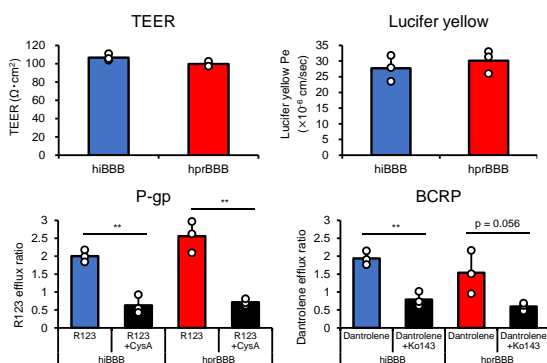
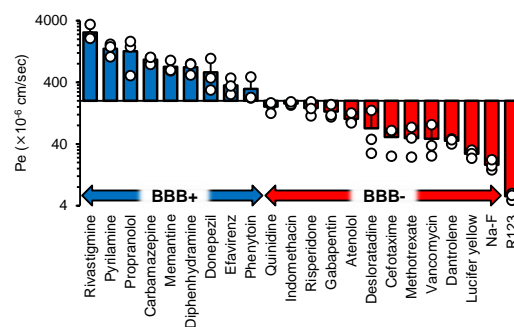


Fig. 3 Characterization of the BBB permeabilities of BBB permeable (BBB+) and non-permeable (BBB-) drugs and compounds in the hiBBB model



第3章 CNS-PBPK モデルの構築およびヒト IVIVC 解析³⁾

第3章では、第2章で構築した hiBBB を代表的な *in vitro* ヒト BBB モデルとして使い、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。

まず、各薬物のヒト臨床データの文献情報を基に、中枢移行動態を数式で記述した CNS-PBPK モデルを構築した。複数のモデル診断プロットを用いた解析から、構築した CNS-PBPK モデルは各薬物の PK プロファイルを適切に記述可能であることが明らかとなった (Fig. 4)。次に、構築した CNS-PBPK モデルを用いて、8 種の薬物 (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、セフトキシム、メソトレキセート) における *in vivo* ヒト BBB 透過速度 (Q_{ECF}) を算出した。 Q_{ECF} は血中から脳細胞外液 (Brain_{ECF}, brain extracellular fluid) へのクリアランスを示し、*in vivo* における BBB 透過速度として用いられるパラメータである。最後に、算出した *in vivo* ヒト脳移行速度 (Q_{ECF}) と hiBBB で得られた *in vitro* ヒト BBB 透過速度 (Pe 値) との相関を解析した結果、両者の間には高い相関係数 ($R^2 = 0.96$) が認められた (Fig. 5)。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。

Fig. 4 Visual predictive check of the CNS-PBPK modeling

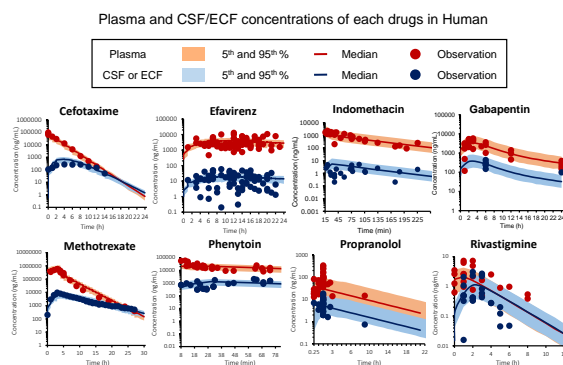
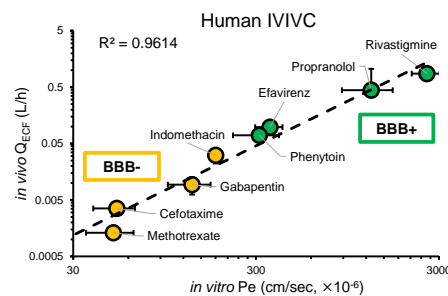


Fig. 5 Correlation analysis between *in vitro* Pe values obtained from the hiBBB model and *in vivo* Q_{ECF} estimated by CNS-PBPK modeling using human clinical data



以上、本研究では、新たな *in vitro* ヒト BBB モデルとして hiBBB を構築し、hiBBB を用いて薬物の脳移行性パラメータに関する IVIVC を明らかとした。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。

【研究結果の掲載誌】

- (1) T Furihata, R Ito, et al., Establishment and characterization of a new conditionally immortalized human astrocyte cell line. *J Neurochem.*, 136:92-105 (2016).
- (2) R Ito, *et al.*, 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).
- (3) R Ito, *et al.*, *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).

【論文審査の結果の要旨】

伊藤涼氏の博士学位申請論文は、ヒト *in vivo* における脳内薬物濃度を *in vitro* から予測する方法として *in vitro* ヒト血液脳関門 (blood-brain barrier, 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新たな予測アプローチ (BBB/PBPK 法) に着目し、その妥当性を明らかにすることを目的に行われた研究である。

第1章では、BBB を構成する細胞のうちアストロサイトを対象として、その条件的不死化細胞の樹立に取り組んだ。ヒト初代培養アストロサイトに2種類の不死化遺伝子を導入し、増殖能に優れた複数のクローンを得た。これらに対して10種以上のアストロサイトマーカー遺伝子の発現量を解析し、総合してそれらを最も高く発現するクローンを同定し、これを human astrocyte / conditionally immortalized clone 35 (HASTR/ci35) とした。さらに HASTR/ci35 の機能解析を進め、本細胞がグルタミン酸取り込み活性やアデノシン取り込み活性など、多彩なアストロサイト機能を保持することを明らかとした。したがって、HASTR/ci35 は *in vitro* ヒト BBB モデル構築に有用な細胞であると考えられた。

第2章では、BBB を構成する3種のヒト不死化細胞を共培養した BBB モデル (human immortalized BBB model, hiBBB) を構築し、その薬物脳移行性評価における機能特性を検討した。その結果、hiBBB モデルは細胞間接着によるバリア機能に加え、P-糖蛋白質や乳癌耐性蛋白質による薬物排出トランスポーター機能など、基本的な BBB 機能を有することが明らかになった。そこで、本モデルの薬物脳移行性評価への適応性を明らかとするため、市販薬物を含む複数の化合物を用いた *in vitro* BBB 透過性試験を行った。その結果、BBB 透過性化合物では高い透過性値 (Permeability coefficient, P_e) が、非透過性化合物では低い P_e が認められた。したがって、hiBBB モデルを用いた透過性試験により化合物の BBB 透過性を評価することが可能であることが明らかとなり、本モデルは目的とする BBB/PBPK 法の妥当性検証のためのツールとして有用であると考えられた。

第3章では、ヒト脳内濃度予測に対する BBB/PBPK 法の妥当性を検証する第一段階として、hiBBB モデルから得られる薬物 P_e (*in vitro*) とヒト臨床データから PBPK モデルを用いて推定される薬物脳移行性 (*in vivo* QECF) の相関解析 (*in vitro*-*in vivo* correlation, IVIVC) を行った。まず、薬物の脳内動態を数式で記述可能な PBPK モデルを構築し、文献情報に基づくヒト臨床データから8種の薬物における *in vivo* QECF を推定した。次に、これら QECF と第2章にて得られた P_e と比較した結果、両者の間には高い相関係数 ($R^2 = 0.96$) が認められた。この IVIVC の結果は、ある薬物に対し、hiBBB モデルから得られた P_e を QECF の代替として用いて PBPK モデルを構築することで、理論上その薬物の脳内濃度を予測し得ることを示唆しており、BBB/PBPK 法の妥当性を支持するものと考えられる。

以上、伊藤涼氏は、本研究において、ヒト不死化アストロサイト HASTR/ci35 を樹立し、これと BBB を構成する他の不死化細胞を組み合わせることにより、新たな *in vitro* ヒト BBB モデル (hiBBB) を構築した。複数の薬物を用いた透過性試験から、hiBBB モデルは薬物の脳移行性 (P_e) を評価することが可能であること、さらにそれら P_e 値と、PBPK モデルから推定するヒト *in vivo* の薬物脳移行性 (QECF) との間に高い相関が認められることを明らかとした。本研究成果は、ヒト脳内薬物濃度予測に向けたアプローチとしての BBB/PBPK 法の妥当性を初めて実証したもの

であり、今後、本法の確立と中枢神経系疾患治療薬開発への応用を強く後押しするものとなると期待される。したがって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。