

「脳を守る」
平成10年度採択研究代表者

寺崎 哲也

(東北大学未来科学技術共同研究センター 教授)

「脳関門排出輸送に基づく中枢解毒」

1. 研究実施の概要

血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞同士が密着結合し、さらにその周囲に周皮細胞及び星状膠細胞が覆っている。脳毛細血管内皮細胞と周皮細胞及び星状膠細胞は細胞間相互作用により、血液脳関門の機能を維持している。脳全体の0.1%しか存在しないラットの脳毛細血管内皮細胞を用いると多数の動物が必要となるが、遺伝子改変ラットを用いて条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株、周皮細胞株及び星状膠細胞株の作製に成功した。さらに、脳毛細血管内皮細胞株と星状膠細胞株の共培養により、ヘキソース輸送系、GLUT1の発現量が約100倍誘導された。生体により近い血液脳関門実験系の構築が可能となった。これまで、血液脳関門には脳内神経伝達物質を脳から血液中へ排出する輸送系が機能していることを明らかにしてきた。今回、特に、酸性アミノ酸を排出する輸送系が機能していること及びセロトニン、ノルエピネフリン、 γ -アミノイソブチル酸を運ぶ輸送担体として、SERT, NET, BGT1が血液脳関門で発現していることを明らかにした。共培養系による機能解析及び血液脳関門に発現している遺伝子をノックアウトしたマウスを作成することで、血液脳関門が「脳を守る」重要な役割を果たしていることが証明できる。

2. 研究実施内容

- (1) 血液脳関門組織を構築している細胞及び他の関門組織細胞の細胞株を樹立する事及び血液脳関門組織の再構築を目的とした。温度感受性SV40T抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス及びラットから各細胞を単離し、33℃で培養し、T抗原を活性化することで不死化させた。各細胞特有のマーカー発現を解析することでクローニングを行い、各細胞株を樹立した。樹立した脳毛細血管内皮細胞、星状膠細胞、脳周皮細胞、脈絡叢上皮細胞、骨髓由来内皮細胞、網膜毛細血管内皮細胞はT抗原が発現しており、33℃で細胞が増殖し、37℃及び39℃では細胞増殖が抑制される条件的不死化細胞株であることが示された。脳毛細血管内皮細胞株と脳星状膠細胞株の共培養系を構築したところ脳毛細血管内皮細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ及び γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性が5倍上昇した。さらに、グルコース輸送担体GLUT1のmRNAの発現が

100倍誘導された。

- (2) 脳内に過剰に存在すると毒性を示す脳神経伝達物質である酸性アミノ酸の血液脳関門から排出輸送についてBrain Efflux Index法を用いて解析した。L-アスパラギン酸及びL-グルタミン酸は脳から循環血液中へ未変化体で排出されており、その排出速度はL-アスパラギン酸がL-グルタミン酸より7倍早いことを明らかにした。さらに、神経細胞に存在する酸性アミノ酸輸送系ではL-アスパラギン酸と同様に基質として輸送されるD-アスパラギン酸は脳から排出しないことを明らかにした。血液脳関門には酸性アミノ酸を排出する輸送系が機能していることを明らかにし、その輸送系は神経細胞に存在する酸性アミノ酸輸送系とは異なることを明らかにした。
- (3) 温度感受性SV40T抗原遺伝子導入トランスジェニックマウスから樹立した条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞株(TM-BBB)から調整したRNAよりRT-PCR法解析を用いて脳神経伝達物質であるセロトニン、ノルエピネフリン、 γ -アミノイソブチル酸輸送担体のmRNA、SERT、NET、BGT1が発現していることを明らかにした。さらに、抗NET及びBGT1抗体を用いたWestern blot法及び免疫染色法によりマウス脳毛細血管内皮細胞にNET、BGT1が発現していることを明らかにした。さらに、脳内では合成されないが血液中濃度に比べて200倍も高濃度に脳内に存在するクレアチンを運ぶ輸送担体が血液脳関門に発現していることを明らかにした。これらの研究成果は、脳を守る為に、血液脳関門が神経伝達物質やエネルギー蓄積物質を輸送する働きがあることを初めて明らかにしたものである。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

K. Hosoya, M. Sugawara, H. Asaba, T. Terasaki: Blood-brain barrier produces significant efflux of L-aspartic acid, but not D-aspartic acid: In vivo evidence using the brain efflux index method, *J. Neurochem.*, 73: 1206-1211(1999).

T. Terasaki, K. Hosoya: The brain efflux index method (BEI) IN: *Brain barrier Systems, Alfred Benzon Symposium 45*, O.B. Paulson, G. M. Knudsen, T. Moos (Ed), Munksgaard, Copenhagen, (1999) pp114-123.

寺崎哲也、細谷健一：血液脳関門研究における最近の進歩, *薬事新報*, 2050: 331-337 (1999).

T. Kitazawa, K. Hosoya, T. Takahashi, Y. Sugiyama, T. Terasaki: In-vivo and in-vitro evidence of a carrier-mediated efflux transport system for oestrone-3-sulfate across the blood-cerebrospinal fluid barrier, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 281-288(2000).

高長ひとみ、森しのぶ、徳田典代、大槻純男、細谷健一、寺崎哲也：薬物動態を決定する機能蛋白質；血液脳関門と血液脳脊髄液関門, *月刊薬事*, 42: 761-776 (2000).