

プレスリリース

報道機関各位



2019年10月23日

可逆的不死化細胞によるヒト血液脳関門モデルの開発に成功

～ヒトに投与せずともヒト脳に薬が届くかわかる未来へ～

【ポイント】

- 本研究では、創薬に応用できる新たな細胞モデル（ヒト血液脳関門モデル）を構築しました。
- 本モデルは、独自に樹立した三種の可逆的不死化細胞を用いることにより、従来モデルを圧倒する汎用性と優れたヒト血液脳関門機能の両立を実現する、世界でも類のないモデルです。
- 本モデルを用いることにより、ヒトに投与することなくヒト脳への薬の移行を容易に評価することが可能になると期待され、中枢神経系疾患に対する新薬の創出に大いに貢献しうると期待されます。

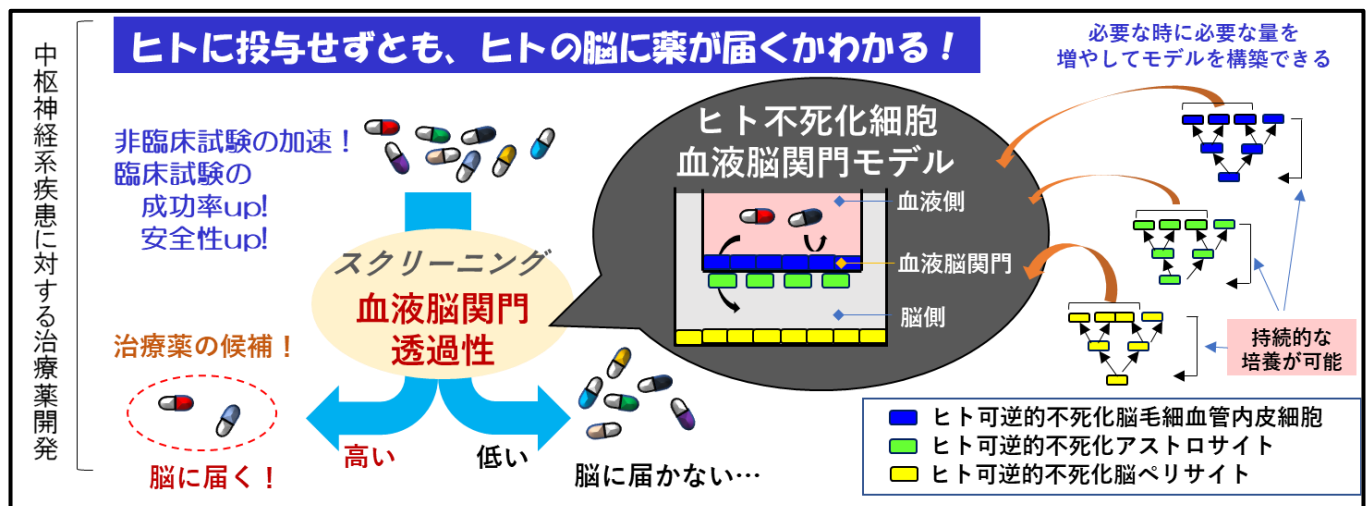
【概要】

脳疾患の治療薬は、脳に届いてはじめてその治療効果を発揮します。そのため薬を開発する過程では、薬や薬剤キャリアが血液脳関門を越えて脳内に届くか評価できる細胞モデル（ヒト血液脳関門モデル）が必要とされています。しかし現在、創薬で幅広く活用されているモデルはありません。これに対し本研究では、ヒト可逆的不死化細胞に着目することにより、創薬に応用しうる新たなヒト血液脳関門モデルを開発しました。

本研究では、この新たなヒト血液脳関門モデルを用いることにより、薬がヒト脳に届くか否かを、ヒトに投与することなく実験室レベルで評価することが可能となることを明らかにしました。さらに、本研究で開発したモデル半永久的に使えることから、これまで不可能であった大量の候補薬のスクリーニングや、試行錯誤を要する実験を行うことが可能になります。このヒト血液脳関門機能と汎用性の両立は創薬に不可欠であり、これを実現する本モデルは世界でも類のないヒト血液脳関門モデルです。

今後、本モデルを創薬現場で応用することにより、薬物のヒト脳への移行を早期に予測することや、薬剤を効果的に脳へ送達させるキャリアの開発が可能になることから、本モデルは中枢神経系疾患に対する治療薬の開発を飛躍的に促進させるとともに、画期的な新薬の創出にもつながると期待されます。

なお、本成果は、産学共同研究および日本医療研究開発機構の支援により得られました。

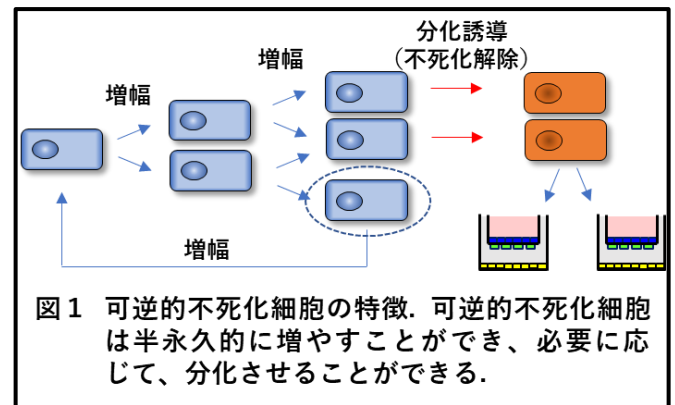


【背景】

中枢神経系疾患（以下、脳疾患）は、治療薬の開発が非常に難しい疾患領域です。この原因の一つに、血液脳関門¹⁾の存在があります。血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞²⁾を実体とし、アストロサイト³⁾や脳ペリサイト⁴⁾とともに構築される脳特有の血管構造であり、血液中の有害物質が脳内に侵入することを防ぐ“バリア”の役割を担っています。しかし、このバリアは薬に対しても働いてしまいます。薬にいくら薬理作用があっても、脳内に入らなければ治療薬として効果が発揮されません。そのため、血液脳関門を越えて脳に届く薬を見出すこと、薬を効果的に脳内へと運ぶキャリア⁵⁾を開発することが、脳疾患に対する治療薬の開発における喫緊の課題となっています。これらの課題の解決に向け、血液脳関門を実験室レベルで再現した細胞モデル（血液脳関門モデル）が創薬現場では必要とされています。

これまでの血液脳関門モデルは、主に動物初代培養細胞⁶⁾を用いて構築されてきました。しかしながら、ヒトと動物の血液脳関門機能には遺伝情報の違いに基づく種差が存在するため、ヒトの治療薬を開発するには、ヒトという種を反映したモデルが必要となります。一方、血液脳関門モデルが試行錯誤を要する創薬現場で活用できる実験ツールとなるためには、際限なく使えなくてはなりません。しかし、ヒト初代培養細胞は希少であり、十分に実験するために必要な量を確保することは不可能に近いのが現状です。そのため、これまでに創薬ニーズに沿うヒト血液脳関門モデルの確立には至っていません。

このような現状に対し、これまでに私達はヒト可逆的不死化細胞⁷⁾を用いたヒト血液脳関門モデルの開発に取り組み、ヒト可逆的不死化脳毛細血管内皮細胞（HBMEC/ci18）、ヒト可逆的不死化アストロサイト（HASTR/ci35）、ヒト可逆的不死化ペリサイト（HBPC/ci37）を樹立しました。不死化とは、文字通り死滅することのない細胞であり、そのため長期培養や繰り返し利用が可能です（図1）。さらに、樹立した細胞の不死化特性には可逆性が付与されており、そのため実験時に不死化シグナルを解除することで、それぞれ由来とする細胞本来の機能を高く発現します。したがって、ヒト可逆的不死化細胞を用いることにより、必要な時に必要な量のヒト血液脳関門モデルを、安価に簡便に構築することが可能になると期待されます。



【研究内容】

今回の研究では、三種のヒト可逆的不死化細胞（HBMEC/ci18、HASTR/ci35、HBPC/ci37）をトランスウェルカルチャーシステム⁸⁾の中でヒト生体の血液脳関門と同じ順で配置して培養することにより、ヒト血液脳

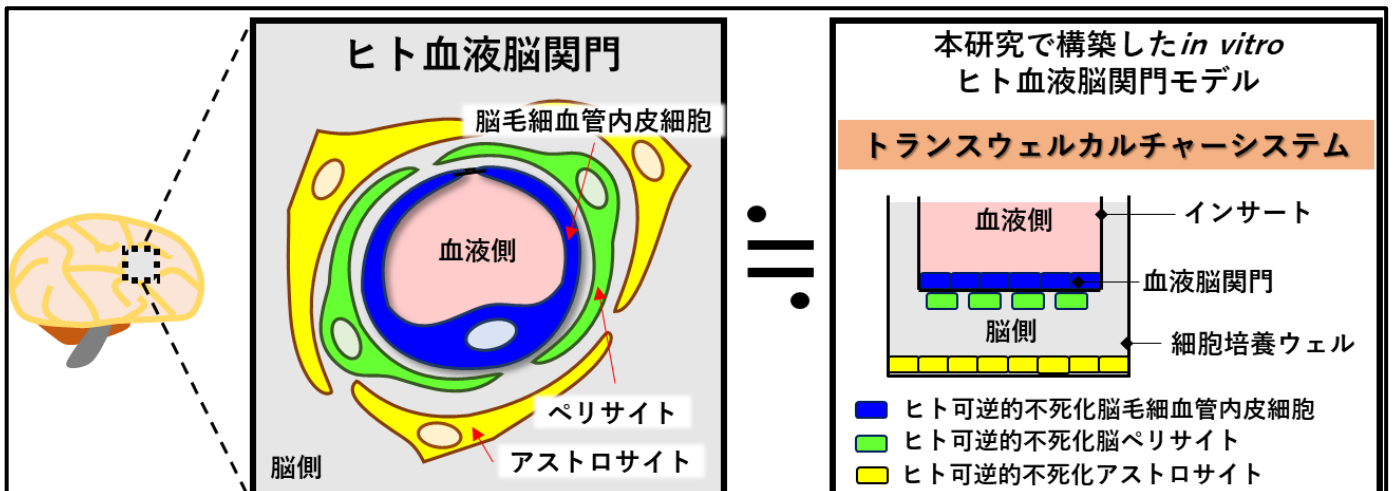
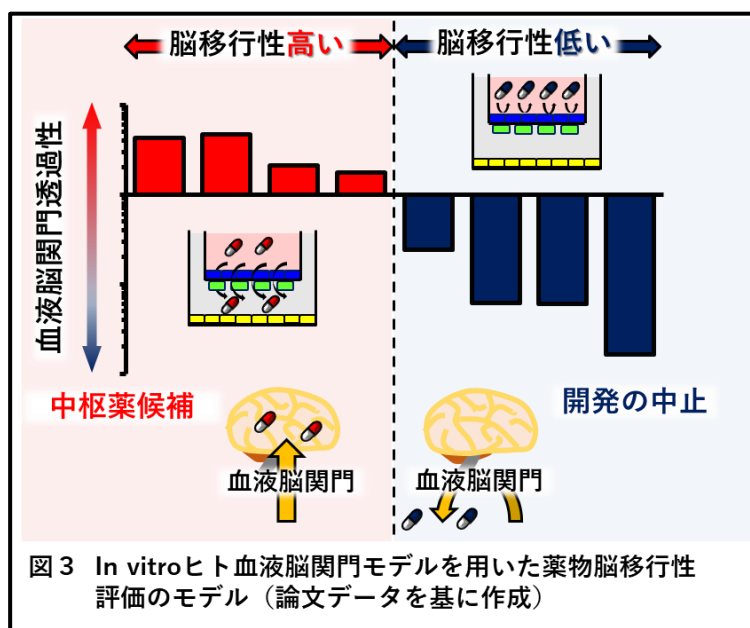


図2 ヒト生体の血液脳関門の模式図と本研究で構築したトランスウェルカルチャーシステムによる *in vitro* ヒト血液脳関門モデル

関門を再構築しました（図2）。このモデルでは、血液脳関門機能を担う細胞間結合⁹⁾と薬物排出トランスポーター¹⁰⁾の発現および機能が認められ、これら以外にも血液脳関門に特徴的な多くの遺伝子の発現が認められました。したがって、本モデルはヒト血液脳関門としての特徴をしっかりと保持していることが明らかとなりました。

そこで、創薬現場への応用を想定し、本モデルを用いて、薬物が血液脳関門を越えて脳内に届くか否かを判定する試験（血液脳関門透過性試験）を行いました。脳内に届くことが知られている薬物群（メマンチンやジフェンヒドラミンなど¹¹⁾）および脳内に届きにくい薬物群（デスロラタジンなど¹¹⁾）を用いて試験を行った結果、脳移行性薬物群では、非移行性薬物群に比べ高い値（即ち脳に移行しやすい性質があるとの結果）が得られ（図3）、その差は最大280倍ありました。この結果より、本モデルを用いることで、薬物がヒト脳に届くか否かを、ヒトに投与することなく見極めることが可能になりました。



一方、本研究で開発したヒト血液脳関門モデルは際限なく作ることが可能です。本研究においても、本モデルを繰り返し作って様々な試験を行うことにより、その特性と有用性を検証することができました。したがって、本モデルは多くの化合物の脳移行性について一度に解析することを可能にするだけでなく、短期間に繰り返し安定した条件で実験を行うことも可能とします。

以上、本モデルは血液脳関門機能と汎用性の双方を持つ世界でも類を見ないモデルであり、この特徴により、従来よりも圧倒的に創薬現場への実装性を持つモデルであると考えられます。この強みを持つヒト血液脳関門モデルは、ヒト可逆的不死化細胞を用いたからこそ構築することができたと言えます。

【今後の展望】

今回開発した可逆的不死化細胞によるヒト血液脳関門モデルが創薬現場で活用され、薬や薬剤キャリアがどれだけヒト脳に届くか予測することができるようになれば、その治療効果や副作用の予測も可能になります。即ち、ヒトへ投与することなくヒトでの効果や毒性を事前に見極めることが可能になることから、有効性の高い薬の開発を効率的に進めることができるとともに、未然に重大な副作用の回避が可能になると期待されます。これらにより、臨床試験における成功率と安全性の飛躍的な向上が期待されます。さらに、薬剤を効果的に脳へ送達させることが可能なキャリアが開発されれば、画期的な新薬の創出につながることを期待されます。

したがって、可逆的不死化細胞によるヒト血液脳関門モデルは、脳疾患に対する治療薬開発におけるこれまでの常識を変え、脳疾患の克服に大いに貢献しうる基盤技術となることを期待されます。

【論文情報】

この研究成果は、アメリカ化学会が発行する雑誌の一つである *Molecular Pharmaceutics* で、2019年10月1日に公開されました。

A human immortalized cell-based blood-brain barrier tri-culture model: development and characterization as a promising tool for drug brain permeability studies.

Ryo Ito, Kenta Umehara, Shota Suzuki, Keita Kitamura, Ken-ichi Nunoya, Yoshiyuki Yamaura, Haruo Imawaka, Saki Izumi, Naomi Wakayama, Takafumi Komori, Naohiko Anzai, Hidetaka Akita, Tomomi Furihata.

URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00519>

【用語説明】

1 血液脳関門：中枢神経系機能の維持と保護のために、脳内と循環血中の物質の行き来を制限する関門構造であり、脳血管の血管内皮細胞を実体とする。関門機能の分子実体は、脳血管内皮細胞同士の強固な結合（密着結合）および細胞に存在する薬物排出トランスポーターである。脳血管内皮細胞がこれら関門機能を発揮するためには、脳周皮細胞（ペリサイト）やアストロサイトなど他の脳内細胞による助けが必要とされる。

2 脳毛細血管内皮細胞：脳の毛細血管を構成している血管内皮細胞。脳全域に薬が行き渡るためには、薬は脳毛細血管内皮細胞による血液脳関門を透過する必要がある。そのため、中枢神経系疾患に対する治療薬開発や薬物治療を考える上では、薬の脳毛細血管内皮細胞による血液脳関門の透過性が重要である。

3 アストロサイト：中枢神経系に最も多く存在するとされる細胞。アストロサイトは多彩な生理機能を持ち、神経細胞と協調して神経活動を制御しているほか、突起状構造（エンドフィート）を伸ばして脳毛細血管を覆いながら、血液脳関門の機能にも必須の役割を担っている。

4 脳ペリサイト：脳血管の周囲に存在する細胞。血管平滑筋細胞と類似の性質も認められるものの、両者は異なる細胞種と考えられている。ペリサイトは全身の血管に認められるものの、血管に対するその存在比率は脳において最も高く、このことが血液脳関門の機能維持に重要であると考えられている。その他にも様々な生理機能を有すると推定されているものの、その詳細には不明な点が多い。

5 薬剤を効果的に脳内へと運ぶキャリア：高分子や構造改変が困難な薬剤を内包または結合することができ、かつ血液脳関門を突破する能力を持つ分子を指す。このようなキャリアを用いることで、様々な薬剤を脳内へと送達させることが可能になると期待されている。未だ実用化には至っていないものの、抗体やリポソームをベースとした脳指向性キャリアの開発が精力的に行われている。

6 初代培養細胞：生体組織より単離してバラバラにした直後、もしくはそれを初回に培養した細胞を指す。生体機能を最も保持する *in vitro* 用の研究試料として用いられるが、培養を始めると速やかに細胞本来の形質は失われていく。また、一般に増殖能力は乏しく、長期間やスケールの大きな実験には向かない場合も多い。

7 可逆的不死化細胞：ヒト不死化細胞は、ヒト初代培養細胞に不死化遺伝子の導入により作成することができる（動物由来細胞の場合は、不死化遺伝子のトランスジェニック動物から樹立する例もある）。この際、用いる条件に依存的して機能を発揮する不死化遺伝子を導入することで、可逆的不死化細胞を作成することができる。即ち、一定の条件下では永続的な増殖能を発揮するものの、その条件を解除すると不死化シグナルが消え、理論上は初代培養細胞の状態に戻る。不死化遺伝子の機能を限定的な条件下で発揮させる方法は複数あり、温度を用いる方法（本研究で使用）や遺伝子組み換えを用いる方法などが知られている。

8 トランスウェルカルチャーシステム：通常の細胞培養ウェルとインサートを組み合わせることで、培養空間を二相にわけて細胞を間接的に共培養する方法（図1）。インサートはウェルの側面上部に引っ掛け宙ぶり状態にする。インサート下面に多孔質膜が張られ、その膜上で細胞を培養することができる。インサート下面とウェル底面には隙間があり、ウェル底面の細胞とインサート上面の細胞が液性因子を介してコミュニケーションを取ることができる。

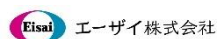
9 細胞間結合：一般に、細胞と細胞は複数のシステムを用いて接着し、お互いにコミュニケーションを取っている。そのうち、血液脳関門機能を担う細胞間結合として接着結合および密着結合が知られており（特に後者が重要）、これらが連携して強固に細胞同士を結合させることにより物質の細胞間隙透過を厳しく制限する。その結合は生体内で最も強固であるとされるが、これは血液脳関門に特徴的な分子から細胞間結合が構成されるためであると考えられている。

10 薬物排出トランスポーター：細胞膜に存在するトランスポーター（物質の輸送を担うタンパク質）のうち、様々な薬を認識して、薬を細胞の中から外へと排出するトランスポーターを指す。血液脳関門においては、血液脳関門を今まさに通り抜けようとする薬や細胞の中に入った薬を認識し、血中へと排出することにより、薬が脳内に到達することを阻んでいる。代表的な分子は、P-糖タンパク質および breast cancer resistance protein である。

11 メマンチンはアルツハイマー病治療薬であり、ジフェンヒドラミンは第1世代抗ヒスタミン薬であるとともに睡眠改善薬としても用いられている（脳でのヒスタミン H1 受容体の遮断は眠気を起こす）。つまりこれらはヒトにおいて脳に届く薬である。また、デスロラタジンは第2世代抗ヒスタミン薬であり、眠気がないタイプ、すなわちヒトにおいて脳に届きにくい薬である。

【本プロジェクトについて】

本研究は、東京薬科大学・エーザイ株式会社・小野薬品工業株式会社・千葉大学の4者共同研究、および日本医療研究開発機構「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療技術を応用した創薬支援基盤技術の開発）」の一環であり、その他、持田記念医学薬学振興財団による支援を受けて行われました。



【取材に関するお問い合わせ先】

東京薬科大学 総務部広報課

TEL:042-676-6711 mail:kouhouka@toyaku.ac.jp

【研究に関するお問い合わせ先】

東京薬科大学 薬学部個別化薬物治療学教室 教授 降幡知巳

TEL:042-676-8969 mail:tomomif@toyaku.ac.jp