

**Establishment and characterization of spinal
cord microvascular endothelial cell lines:
A new *in vitro* blood-spinal cord barrier (BSCB)
model**

(脊髄微小血管内皮細胞株の樹立とその細胞
学的特徴:新たな血液脊髄関門 *in vitro* モデル)

申請者氏名：前田 敏彦

申請者所属：山口大学大学院医学研究科神経内科学

作成年月：平成 26 年 1 月 13 日

目次

要旨	3
研究の背景	
1. 血液脊髄関門 (BSCB)	3
2. BSCB と神経疾患	4
3. BSCB の構成細胞	4
4. バリア構成内皮の特徴	4
5. SCMEC の培養, 不死化	5
目的	5
方法	6
結果	10
考察	18
結語	20
参考文献	21

要旨

血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier : BSCB) は脊髄実質の内部環境を維持するバリアーシステムである。多発性硬化症や外傷性脊髄障害では BSCB が破綻するとされ、BSCB の保護が治療ターゲットになり得る。バリアー破綻の病態を分子レベルで詳細に明らかにするためには、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系が有用であるが、研究が先行している血液脳関門 (blood-brain barrier) に比べ、BSCB についてはこれまで *in vitro* モデルが樹立されたことがなく、BBB と対比したバリアーの特性は明らかになっていない。今回我々は BSCB の首座である脊髄微小血管内皮細胞 (spinal cord microvascular endothelial cell : SCMEC) の細胞株を樹立し、その細胞学的特性を解析した。

ラット頸髄から SCMEC を単離した。温度感受性 SV40 large T 抗原をレトロウイルスベクターを用いて導入し細胞の不死化を行い安定して増殖するコロニーを単離し、rBSCB-1 と命名した。rBSCB-1 は特徴的な細胞形態 (spindle fiber morphology) を呈し、vWF, VE-cadherin, PECAM-1 などの内皮細胞マーカーを発現した。また、培養温度依存的な増殖速度とバリアー機能を示した。免疫染色で occludin, claudin-5, ZO-1 などの tight junction 関連分子の細胞境界への分布がみられ、p-gp の阻害剤を用いることで rhodamine123 の細胞内への取り込みが増加した。脳由来内皮細胞と比べ、同程度の電気抵抗値と、FITC-dextran (MW=4kDa) に対する高い透過性を示した。アストロサイトとの共培養で tight junction 分子の増加を伴ってバリアー機能が強化された。これらより、得られた細胞株は中枢神経バリアーの特徴を保持し十分なバリアー機能を有していることが確認された。この細胞株は、脊髄疾患の病態解明に有用なツールとなり得る。

研究の背景

1. 血液脊髄関門

中枢神経は脳と脊髄から構成され、栄養素や代謝産物など物質の外界とのやり取りは、それぞれ血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) および血液脊髄関門 (blood-spinal cord barrier, BSCB) を介して行っている。ここでは内皮細胞が、隣接する細胞間で tight junction を構成し、物質の自由な往来を制限している¹⁾。またバリアー構成内皮細胞は種々の transporter を発現し、栄養素を中枢神経内に取り込んだり、神経毒性のある物質を血管内に排出するなどして、積極的、能動的に中枢神経の恒常性を維持している^{2,3)}。

これまで BSCB は BBB と全く同じバリアー機能を担っていると考えられてきた。しかし近年の研究で、中枢神経の場所によって、バリアー特性に違いが存在することが指摘されるようになった^{4,5,6)}。電子顕微鏡を使った検討で、脊髄の微小血管内皮細胞内には glycogen deposits が存在するが脳微小血管由来内皮細胞には存在しないことが報告されている⁷⁾。また動物実験により、BBB に比較し BSCB は物質の透過性が高いと考えられており、Prockop らは、ウサギに投与した D-mannitol と Inulin の組織移行性を検討し、脳よりも

脊髄でこれらの物質の組織移行性が高いことを報告している⁸⁾。また、Panらは放射能標識したIFN- α 、IFN- γ 、TNF- α をマウスに静注後、これらのサイトカインの組織移行性を検討し、頸髄への組織移行が最も強く、続いて腰仙髄、胸髄となるが、脳への組織移行性は極めて低いことを示した⁹⁾。

このように、BSCBとBBBを構成する血管に構造的な相違が存在し、BSCBがBBBに比べ脆弱なバリア機能を有することは、病的環境という状況下で、脳と脊髄間の病態の違いとして現れる可能性が考えられる。実際に、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)では、脳よりも脊髄により強い炎症を生じることが指摘されており、BSCBの脆弱性との関連が想定されている¹⁰⁾。

2. BSCBと神経疾患

EAEの検討で、病変部やその周囲の血管にはoccludin, claudin-1, claudin-3, claudin-5などのtight junction分子の発現低下がみられる¹¹⁻¹³⁾。MRIの検討で、BBBやBSCBの破綻は、その後の炎症細胞の浸潤や脱髄に先行する発症の最初ステップであることが知られている¹⁴⁾。

外傷性脊髄損傷では、損傷時の機械的メカニズムによりBSCBの破綻を生じる^{15,16)}。基底膜が分断化されることで、炎症細胞の脊髄実質への侵入が促進される¹⁷⁾。また微小血管の小胞輸送の促進と内皮細胞間のtight junctionの緩みが電顕で観察されている⁷⁾。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)剖検例の脊髄組織を用いた定量的PCRの検討で、ALSの脊髄では、occludin, ZO-1の発現量が正常者に比べ有意に低いことが報告されている¹⁸⁾。

このように、脊髄障害をきたす多くの疾患でBSCBの破綻や透過性の異常が病態に深く関わっていると考えられる。従って、BSCBの破綻する分子メカニズムを解明し、その修復を促す方法が明らかとなれば、多くの難治性脊髄疾患の画期的な治療法の開発が期待できる。

3. BSCBの構成細胞

BSCB機能は脊髄の毛細血管に存在し、管腔に面した内層から順に血管内皮細胞(spinal cord derived microvascular endothelial cell, SCMEC)、ペリサイト、アストロサイトとそれらを取り囲む基底膜により構成されており、基本構成はBBBと同じである。バリアの本体として働くのは血管内皮細胞であるが、血管内皮細胞のバリア機能維持にはペリサイトとアストロサイトから放出される液性因子が必須であることが近年明らかになった¹⁹⁾。

4. バリア構成内皮の特徴

一般臓器の毛細血管内皮細胞は有窓構造を有し、小胞輸送を発達させて細胞間・細胞内の物質往来を自由にする一方で、血漿から組織への必要物質の取り込みと老廃物の回収を

能率よく行っている。一方、バリア構成内皮は無窓で、小胞輸送が未発達であり、内皮細胞は互いに tight junction によって強固に密着している。この tight junction を構成する蛋白として occludin, claudin-5, ZO-1 などが同定され、各々の相互作用によって intact な tight junction が形成されると考えられている^{19,20}。特に claudin-5 は BBB でのバリア機能の key molecule とされ、KO マウスでは 800Da 以下の物質が tight junction を透過し、脳内へ蓄積することが報告されている²¹。また、Ohtsuki らの報告では血管内皮細胞に claudin-5 を強発現させることで、バリア機能が上昇するとされる²²。

このようにバリア構成内皮には、claudin-5 を中心とする各種の tight junction 関連分子が発現・機能することで物質の透過を厳密に制限している。また、BBB を構成する内皮細胞には種々の transporter を用いた物質の選択的な輸送システムが存在し、血管内外への物質輸送を行っていると考えられる²³。

5. SCMEC の培養, 不死化

BBB には多数の *in vitro* モデルが存在する一方で、SCMEC の単離培養に関する報告は初代培養系の 1 報告のみで、不死化 BSCB モデルは樹立されていなかった²⁴。SCMEC は脳微小血管由来内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells: BMEC) で代用できると考えられてきたからである。しかし、SCMEC と BMEC の細胞学的特性に明確な違いが存在するならば、BSCB を研究する目的のために BMEC は代用できない。BSCB 研究には SCMEC の安定的供給を要するが、SCMEC の初代培養では細胞を安定して増やすことが難しく、有用な *in vitro* のツールとするには不死化細胞株の樹立が必須である。

近年、Takahashi らにより温度感受性 SV40T 抗原 (tsA58) を有する transgenic rat が作成され²⁵、この rat から種々の条件的不死化細胞株が確立された²⁶。この細胞株は 33 度で培養すると tsA58 が活性化され容易に不死化される。一方で 37 度で培養すると tsA58 が不活化し *in vivo* の性質を保持した状態となる^{27,28}。この tsA58 を導入することで、SCMEC を *in vivo* の機能を有したまま不死化することが期待できる。

目的

SCMEC の安定細胞株を樹立することは、脊髄疾患のバリア破綻の分子レベルでの病態解明に大きく寄与するものと考えられる。これにより、脊髄への BSCB の保護戦略や drug delivery system の開発など、難治性の脊髄疾患に対して新たな治療ターゲットを提示できる可能性がある。

本研究では、ラット SCMEC を単離し、これに tsA58 をレトロウイルスベクターを用いて導入することで、ラット SCMEC の不死化細胞株を樹立した。得られた細胞株が、バリア構成内皮として十分な機能を有しているかどうかについて検討した。また、BBB 由来内皮細胞はアストロサイトの作用によりバリア機能が強化することが知られている。アストロサイトとの共培養系を用いて、樹立した SCMEC のバリア特性がアストロサイトの影響

を受けるかについても検討した。

方法

1. 抗体, 試薬

今回用いた抗体, 試薬は以下の通りである。抗 occludin, Zonula occludens-1 (ZO-1), claudin-5 抗体は Zymed (San Francisco, CA, U.S.A) から購入した。抗 p-glycoprotein (p-gp) 抗体は Calbiochem (Darmstadt, Germany) から購入した。抗 von Willebrand factor (vWF) 抗体は Dako (A/S, Denmark) から購入した。抗 PECAM-1 抗体, 抗 VE-cadherin 抗体は Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, U.S.A) から購入した。

抗 SV40T 抗原抗体は Calbiochem から購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated secondary antibodies は Zymed から購入した。レトロウイルスベクター (pDON-AI) はタカラバイオ (Otsu, Japan) から購入した。Rhodamine123, FITC-labeled dextran (molecular weight 4 kDa), hydrocortisone は Sigma (St. Louis, MO, U.S.A) から購入した。Verapamil は Wako (Osaka, Japan) から購入した。COS-7 はヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。

2. 培養液

endothelial cell growth medium として, EBM-2 培地 (Cambrex, Walkersville, MD, U.S.A) に 20% fetal bovine serum (FBS) (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), 100 µl/ml streptomycin (Sigma), 25 ng/ml amphotericin B (Invitrogen, Grand Island, NY, U.S.A) を添加して使用した。内皮細胞が confluent になった後は, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma) に 10% FBS を添加した培地を使用した。

3. SCMEC の分離, 培養

本研究は山口大学の実験動物の管理と使用に関する指針に準拠して行った。安楽死させた 5 週齢の雄ウィスターラットより素早く脊柱を切り出し, 氷冷した DMEM 溶液中で, 脊柱から脊髄 (頸髄) を分離した。髄膜を剥離した後, カミソリで細かく刻み, ホモジネートした後に, 0.005% dispase (Sigma) 溶液で 37°C, 3 時間消化した。これを遠心 (800g, 5 分) した後に, ペレットを 15% dextran 溶液へ混合し 4°C, 5000g で 10 分間遠心した。ペレットを Hanks' balanced salt solution (HBSS) で洗浄した後, 190 µm ナイロンメッシュフィルター (Tetko Inc., Briarcliff Manor, NY, U.S.A) を通過させて太い血管成分を除去した。フィルターを通過した小血管を含む成分を 0.1% collagenase/dispase 溶液で 37°C, 1 時間消化した。洗浄, 遠心後, ペレットを DMEM 混濁液として 15 µm cell strainer (Tetko Inc.) を通過させ赤血球等の細胞成分を除去した。フィルターに補捉された微小血管を含む成分を type I collagen-coated dish (Iwaki, Tokyo, Japan) に播種し, 37°C (5% CO₂, 95% 窒素) の条件で培養を行った。

4. SCMEC の不死化, クローニング

細胞を播種して 10 日後に, pDON-AI/tsA58 (温度感受性 SV40T 抗原を組み込んだレトロウイルスベクター) を培養液に混合した. 24 時間後に細胞を HBSS で洗浄し, 33°C のインキュベーターで培養を開始した. 内皮細胞が十分に増殖した後に, クローニングカップを用いて内皮細胞を含むコロニーを単離した. 途中, 線維芽細胞やアストロサイト, ペリサイトなどが増殖した場合には, ラバーポリスマンを用いてこれらを機械的に剥離した. 5 回クローニングを行った後に内皮細胞のみからなる数個のコロニーを単離した. この中で最も安定して増殖するコロニーを選択し, "rBSCB-1" と命名した.

5. SCMEC の同定

SCMEC の内皮細胞としての同定には, ①spindle-fiber shaped morphology を示す ②抗 von Willebrand factor 抗体, 抗 PECAM-1 抗体, 抗 VE-cadherin 抗体による免疫反応性 ③acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) 取り込み の 3 つの条件を採用した. Ac-LDL の処理には, 培養液中に最終濃度 10 μ g/ml となるように 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3', tetramethyl indocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) (Biogenesis, Poole, UK) を混合し, 33°C で一晩培養を行った. 培養後, 蛍光顕微鏡下で細胞を観察し, rBSCB-1 の細胞質に Dil-Ac-LDL が取り込まれることを確認した.

6. Cell growth study

rBSCB-1 を 35mm dish に 5.0×10^3 cell ずつ播種し, 33°C の条件で 3 日間培養した. その後, 33°C, 37°C, 39°C の 3 つの温度条件に変更して培養を継続した. 培養開始 24 時間毎に, トリプシンで細胞を剥離し血球計算盤を用いて細胞数を計測した.

7. 免疫染色

rBSCB-1 を 4%パラホルムアルデヒド(Wako)を用い室温で 15 分間固定した. 次に 0.1% Triton-X (Sigma) で室温 10 分の条件下で作用させた. 1%FBS でブロッキングを行い von Willbrand factor antibody, claudin-5, occludin, ZO-1, PECAM-1, VE-cadherin 抗体を 1 次抗体として 100 倍希釈して作用させた後, FITC ラベルされた 2 次抗体を作用させ, fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) で観察した.

8. mRNA 抽出及び reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ラット脊髄, rBSCB-1 の total RNA は, RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した. Total RNA から single-stranded cDNA への RT と, そこからの PCR は, StrataScript First Strand Synthesis System (STRATAGENE®, Cedar

Greek, TX, U.S.A.)と TAKARA PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ)を用いた。RT-PCR は特異的なプライマー(Table 1)を用いて増幅 (反応条件: 94°C 5分→94°C 1分, 55-65°C 1分, 72°C 1分を 40 cycles)し, 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドを含む 2%アガロースゲルを用い電気泳動を行った。

Table1. rat and human primer pairs utilized in RT-PCR analysis

molecule	sense	antisense	reference
Rat			
<i>occludin</i>	5'-GCC TTT T GCTTCATCGCTTC-3'	5'-AACAAGATTAAGCAAAGCCAC-3'	Hosoya et al. (2000) ²⁹
<i>occludin</i> <i>real time PCR</i>	5'-TGGGCAGTCGGTTGACT-3'	5'-GGGCATCATGGTGTTCATG-3'	Yang et al. (2007) ³⁰
<i>claudin-1</i>	5'-AGG TCTGGCGACATTAGTGG-3'	5'-CGTGGTGTTGGGTAAGAGGT-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>claudin-3</i>	5'-CATCTGCTGCGCCCTTCG-3'	5'-CCTGATGATGTTGTTGGCCGAC-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>claudin-5</i>	5'-CGACAGTACAGGGCACATGC-3'	5'-TAGTTCCTCTTGTCGTAATCGCC-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>claudin-5</i> <i>real time PCR</i>	5'-CAGCCCCAACCCACAGC-3'	5'-CACCCAGCCTACCA GACACA-3'	Hayashi et al. (1997) ³¹
<i>claudin-12</i>	5'-GCGGCCGCGACAGGCTGTTGGAGAA-3'	5'-GCGGCCGCGACTGATGGGTAAGGAACA-3'	Ohtsuki S et al. (2007) ²
<i>JAM1</i>	5'-ACAGCCATGAGGTCAGAGGC-3'	5'-ACCTAGAAGACATGAAGGCATC-3'	Tomi and Hosoya (2004) ³²
<i>ZO-1</i>	5'-GCGAGGCATCGTTCCTAATAAG-3'	5'-TCGCCACCTGCTGTCTTTG-3'	Shi and Zheng. (2005) ³³
<i>Mdr 1</i>	5'-ACAGA AACAGAGGATCGC-3'	5'-CGTCTTGATCATGTGGCC-3'	Tomi and Hosoya (2004)
<i>ABCG2</i>	5'-CAATGGGATCATGAAACCTG-3'	5'-GAGGCTGATGAATGGAGAA-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>Mrp 1</i>	5'-CTGGCTTGGTGTGAACGTAT-3'	5'-AGGCCTTGGCTTGGCTCTAT-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>VWF</i>	5'-GCC TCTACCAGTGAGGTTTGAAG-3'	5'-ATCTCATCTCTCTCTCTGCTCCAGC-3'	Hosoya et al. (2000)
<i>GAPDH</i>	5'-TGATGACATCAA GAAGTGGTGAAG-3'	5'-TCCTTGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	Ohtsuki et al. (2005) ³⁴
Human			
<i>occludin</i>	5'-TGGGAGTGAACCCAACTGCT-3'	5'-CTTCAGGAACCGCGTGGAT-3'	Ghessemifar et al. (2003) ³⁵
<i>claudin-1</i>	5'-CTGCCCACTGAGGATTTA-3'	5'-CAATGACAGCCATCCACATC-3'	Peng et al. (2011) ³⁶
<i>claudin-3</i>	5'-AACACCAATATCCGGGACTCT-3'	5'-CGCGGAGTAGACGACCTTG-3'	Schwerk et al. (2012) ³⁷
<i>claudin-5</i>	5'-CTGTTTCCATAGGCAGAGCG-3'	5'-AAGCAGATCTTAGCCCTCC-3'	Varley et al. (2006) ³⁸
<i>JAM-A</i>	5'-GACACGGGAAGACACTGGGACA-3'	5'-ATGCGCACAGCATTGAA GTCA-3'	Ghessemifar et al. (2003)
<i>ZO-1</i>	5'-TTTAAAGCCAGCCTCTCAACA-3'	5'-CTGCTGGCTGTGTTCTCTAC-3'	Ghessemifar et al. (2003)
<i>Mdr 1</i>	5'-GCCTGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT-3'	5'-CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT-3'	Weksler et al. (2005) ³⁹
<i>ABCG2</i>	5'-TGGCTGTCAATGCTTACATA-3'	5'-GCCACGTGATCTTCCACAA-3'	Weksler et al. (2005)
<i>Mrp 1</i>	5'-ACCAAGACGTATCAGGTGGCC-3'	5'-CTGTCTGGGCATCCAGGAT-3'	Weksler et al. (2005)
<i>GAPDH</i>	5'-GTCAACGGATTTGGTCTGTAT-3'	5'-AGTCTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	Zhang et al. (2006) ⁴⁰

9. リアルタイム PCR による定量解析

定量的 PCR 解析には, Stratagene's Mx3000P (Stratagene) と FullVelocity SYBR Green QPCR master mix (Stratagene) を使用し, メーカーのプロトコールに従って, occludin, claudin-5, ZO-1, Mdr1 (Table1) について解析した. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部スタンダードとし, 各サンプルは PCR 反応(95°C 10分→95°C 15秒, 60°C 1分を 40 cycle)の後, MxProTM software program (Stratagene)を用いて, 各分子の相対量を計算した。

1 0. 電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance : TEER) の測定

TypeI コラーゲンを塗布した culture insert (孔径 $0.4\ \mu\text{m}$, 表面積 0.3cm^2 , Becton-Dickinson) の上面に 1×10^4 cells/insert の密度で細胞を播種した後, confluent になった insert を実験に用いた. Millicell electrical resistance apparatus (Endohm-6 and EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, U. S. A) を用い TEER を測定した. 陽性コントロールとしてヒト脳由来バリア構成血管内皮である TY10 を使用した. TY10 は既に報告されている TY08, TY09 と同様のバリア機能を持つ細胞である^{41,42)}. 陰性コントロールとして claudin-5 を発現しておらずバリア機能が低いとされる TR-BBB を使用した²⁹⁾.

1 1. 透過性試験

rBSCB-1, TY10, TR-BBB を TypeI コラーゲンを塗布した cell culture insert (孔径 $0.4\ \mu\text{m}$, 表面積 0.3cm^2 , Becton-Dickinson) の上面に 1×10^4 cells/insert の密度で播種した. confluent になった insert を実験に用いた. 24well plate の各 well に $1000\ \mu\text{l}$ の培養液を入れ, FITC-labeled dextran (4kDa) を $1\text{mg}/\text{dl}$ の濃度に調整した $250\ \mu\text{l}$ の培養液を各 cell culture insert 内に加えた. 各 cell culture insert を培養液の入った 24well plate の中に設置し, 37°C の water bath で培養を開始した. 培養開始から 20, 40, 60 分の各時点で下部 chamber から培養液を採取し, cleared volume を MX3000P (stratagene) を用いて測定した. 得られた cleared volume を時間に対してプロットし, 直線回帰をすることで傾きを求めた. 傾きは透過係数 (permeability surface area product : PS) を表す. 各内皮細胞を介した透過クリアランス (PeS) は次式を用いて算出した.

$$1/\text{PeS} = 1/\text{PtotalS} - 1/\text{PfilterS}$$

PtotalS は細胞を培養した cell culture insert の透過クリアランス, PfilterS は細胞を培養していない insert の透過クリアランスをそれぞれ示す. PeS は用いた insert の表面積 (0.3cm^2) で除すことで, 膜透過係数 (permeability coefficient) となる.

1 2. 内皮細胞とアストロサイト共培養

内皮細胞との共培養には, ラット脳由来アストロサイトの条件的不死化細胞株 (TR-AST)⁴³⁾ を使用した. TR-AST を TypeI コラーゲンを塗布した 24well plate の各 well に 2×10^4 cells/insert の密度で播種し confluent まで培養した. 同時に, 内皮細胞を cell culture insert 上に 1×10^4 cells/insert の密度で播種し confluent になった時点で, cell culture insert を TR-AST が培養された 24 well plate 上に設置して, 48 時間共培養を行った. その後, TEER 測定や 4kDa dextran の透過性試験を行った.

1 3. Western blot analysis

ラット脊髄, rBSCB-1, TY10, TR-BBB より lysis buffer buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 150mM NaCl and complete protease inhibitor mixture)を用い蛋白を抽出した. 10 μ g の蛋白を 2-mercaptoethanol 100 $^{\circ}$ C 5分 で処理後, SDS-PAGE を用い電気泳動し, nitrocellulose membrane (Amersham, Chalfont, UK) に移した. blocking buffer (5% skimmed milk in 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 125 nM NaCl, 0.5% Tween 20)でブロッキング後, 種々の一次抗体を 100 倍希釈し 1時間室温で作用させ, 2次抗体を 2000 倍希釈で作用させた. membrane を化学発光検出試薬 (ECL-Prime, Amersham, UK) で処理して, バンドを検出し ChimiDocXRS (BioRad, California, U.S.A) で撮像し, NIH Image J を用いて, 定量解析した.

1 4. Drug accumulation study

TypeI コラーゲンを塗布した 24well plate に内皮細胞を播種し confluent になるまで培養した. その後, PBS で 3 回洗浄し, p-gp の阻害剤である verapamil (100 μ M) の有無の条件にわけ, 37 $^{\circ}$ C 30 分培養した. 次に p-gp の基質である rhodamine123 (10 μ M) well に混合し 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた. 反応後に細胞を PBS で 3 回洗浄し, 1%Triton X-100 を用いて細胞を可溶化した. 可溶化液に含まれる蛍光色素を MX3000P を用いて測定した.

1 5. 統計解析

各実験データは平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で示した. 比較検定には, Student's t-test あるいは Welch's t-test を用いて有意差を検定した.

結果

ラット脊髄微小血管内皮細胞株の樹立.

温度感受性 SV40T 抗原をレトロウイルスベクターを用いてトランスフェクトすることで, ラット脊髄微小血管内皮細胞の不死化に成功した. この細胞株を” rBSCB-1” と命名した. rBSCB-1 はバリア構成内皮細胞の特徴である紡錘状の形態を呈していた (Fig.1. A). 血管内皮細胞の特異的マーカーである vWF, VE-cadherin, PECAM-1 の遺伝子・蛋白発現と Dil-Ac-LDL の取り込みを全ての細胞に認め (Fig.1. B-F), 100%の純度からなる細胞集団であった.

Fig.1

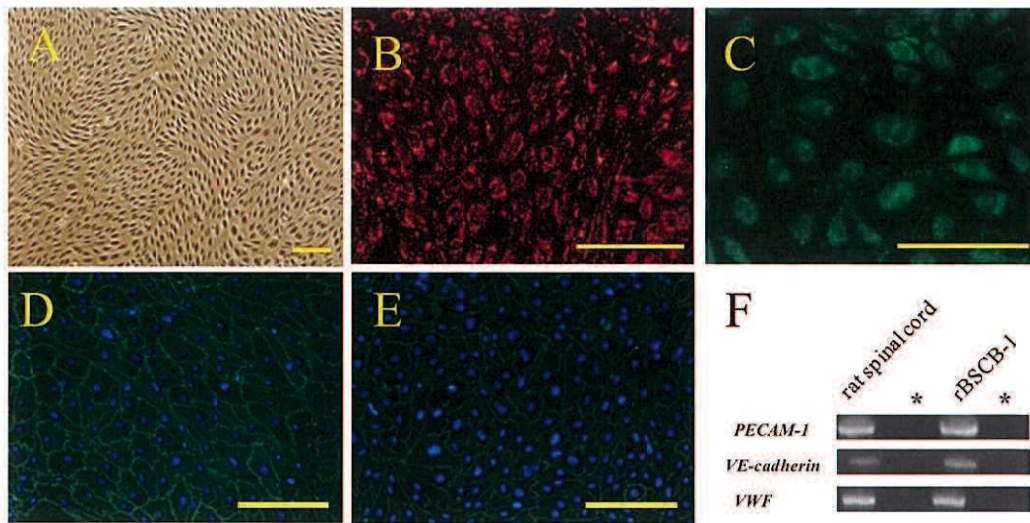


Fig. 1. 得られた rBSCB-1 は紡錘状の形態をしていた (A). その全ての細胞で Dil-Ac-LDL の取り込みを確認し (B), 免疫染色ですべての細胞が抗 von Willebrand factor (vWF) 抗体で染色され (C), VE-cadherin (D) と PECAM-1 (E) の細胞境界への分布を認めた. RT-PCR で, VE-cadherin, PECAM-1, vWF の遺伝子発現を確認した (F).
スケールバー : 100 μ m.

rBSCB-1 は tsA58 を発現し, 培養温度に依存した細胞増殖とバリア機能を有している.

ウエスタンブロット法で SV40T 抗原の存在を確認した (Fig.2. A). rBSCB-1 は, 培養温度が 37 $^{\circ}$ C や 39 $^{\circ}$ C では, 33 $^{\circ}$ C と比べて SV40 のタンパク量が著明に減少した. 33 $^{\circ}$ C の培養条件では rBSCB-1 の倍加時間は約 2 日であり (Fig.2. B), 30 回の継代後でも紡錘状の形態を保っていた. しかし, 培養温度を 37 度にすると, その 2 日後には細胞増殖が停止し, 39 度では減少した (Fig.2. B). また, 培養温度を 33 $^{\circ}$ C から 37 $^{\circ}$ C にすると 2 日後から電気抵抗値が上昇した. rBSCB-1 は SV40T 抗原を発現し, 温度感受性の性質を有していると考えた.

Fig.2A

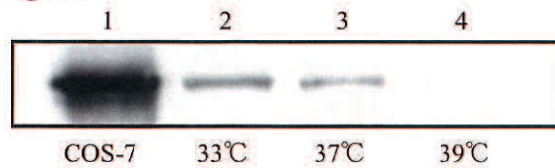


Fig.2B

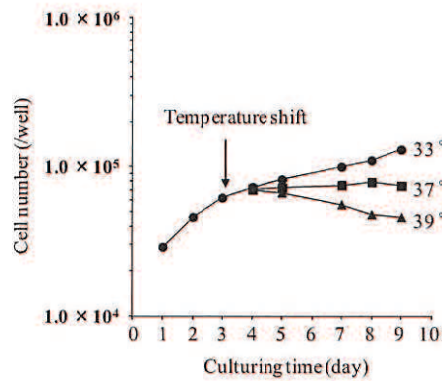


Fig.2C

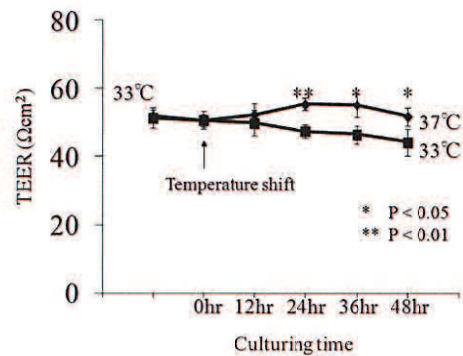


Fig. 2. (A) rBSCB-1 を 33°C (Lane2), 37°C (Lane3), 39°C (Lane4) の各条件で 24 時間培養し, 抗 SV40T 抗体を用いてウェスタンブロットを行った. 陽性コントロールとして COS-7 (Lane1) を用いた.

(B) rBSCB-1 の培養条件を 33°C から 37°C へ変更すると, 細胞増殖が停止し, 39°C では減少した. (C) 培養温度を 33°C から 37°C へ変更すると 24 時間後から, バリア機能の指標である電気抵抗値が上昇した. rBSCB-1 は温度感受性の性質を有していた.

rBSCB-1 は主要な tight junction 関連分子と transporter を発現している.

BBB 構成内皮において重要な tight junction 分子とされている claudin-1, claudin-3, claudin-5, claudin-12, JAM-A, ZO-1 は rBSCB-1 においても発現していることを RT-PCR 法で確認した (Fig.3.A). また, 主要な transporter として知られる Mdr1, Mrp1, ABCG2 の遺伝子発現を認めた (Fig.3.B). ウェスタンブロット法により, claudin-5, occludin, ZO-1 の蛋白量について, ヒトおよびラットの脳由来内皮細胞株と rBSCB-1 を比較したところ, claudin-5 と ZO-1 については脳由来内皮細胞と rBSCB-1 とで違いはなかったが, occludin は脳由来内皮細胞株に比べ rBSCB-1 で有意に低値であった (Fig.3.C).

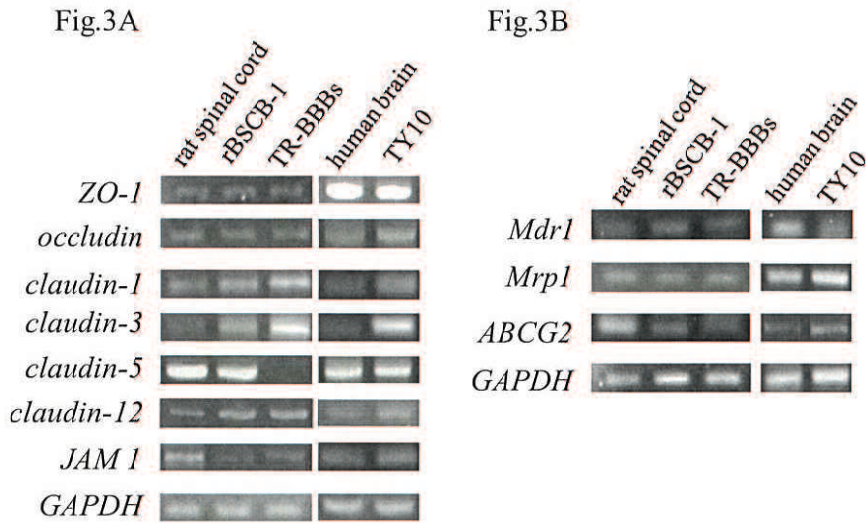


Fig. 3. RT-PCR を用いて tight junction 関連分子と transporter の発現を確認した。rBSCB-1 には ZO-1, occludin, claudin-1, claudin-3, claudin-5, claudin-12, JAM1, が発現していた (A)。また主要な transporter である Mdr1, Mrp1, ABCG2 遺伝子発現を確認した (B)。コントロールとして、ラット脊髄, ラット脳微小血管由来内皮細胞株 (TR-BBBs), ヒト脳微小血管由来内皮細胞株 (TY10) を使用した。

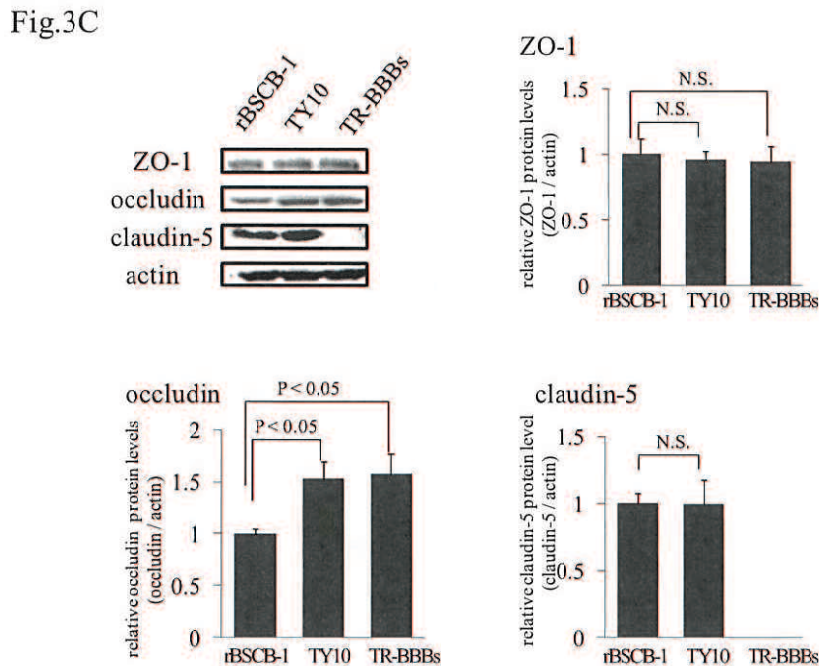


Fig. 3. (C) rBSCB-1, TY10, TR-BBBs 間での tight junction 分子の蛋白レベルの比較。それぞれの細胞株を confluent になるまで培養した後, 蛋白を回収しウエスタンブロット法で tight junction 分子の蛋白量を比較した。rBSCB-1 と脳由来内皮細胞株間で, ZO-1 と claudin-5 に差はみられないが, occludin の蛋白量は rBSCB-1 で有意に低値であった。

rBSCB-1は十分なバリア機能を有している。

rBSCB-1は、BBB構成内皮として十分なバリア機能を持つTY10と比較して^{41,42)}、同程度のTEER値を示したが、FITC-dextran (MW=4kDa)の透過係数はrBSCB-1で高い値を示した(Fig.4. A,B)。一方、claudin-5を持たず、バリア機能を有しないとされるTR-BBBと比較すると、rBSCB-1はFITC-dextranの低い透過性と高いTEER値を示した。

hydrocortisoneでrBSCB-1を処理すると、TEER値が著明に上昇し(Fig.4.C)、透過性が低下した(Fig.4.D)。これらよりrBSCB-1は、4kDaサイズの分子に対する透過性はTY10よりもやや劣るものの、バリア構成内皮として十分な機能を有し、ステロイドの作用によりバリア機能を上昇させる能力を持つことが明らかとなった。

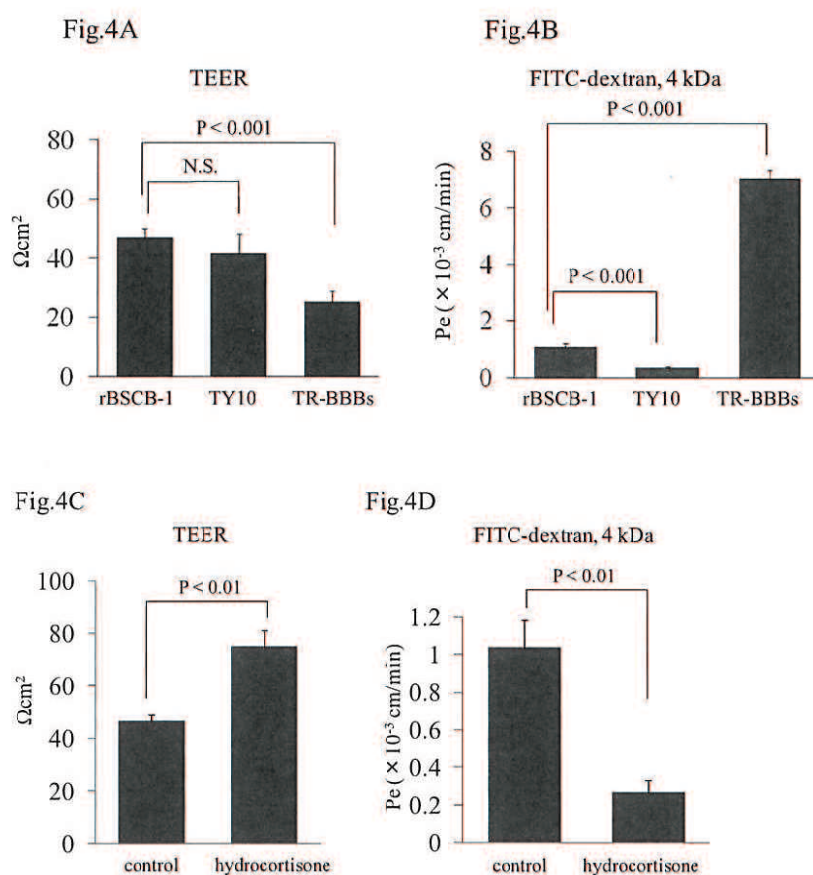


Fig. 4 rBSCB-1, TY10, TR-BBBs を用いて TEER (A) と FITC-dextran (B) の透過性を検討した。rBSCB-1 の電気抵抗値は、TY10 と同程度であり、TR-BBB よりずっと高い値であった (A)。rBSCB-1 は TR-BBB と比較してより低い透過性を示したが、TY10 に比べるとやや透過性が高かった (B)。rBSCB-1 に hydrocortisone (150nM) を作用させると、電気抵抗値が著明に上昇し (C)、透過性が低下した (D)。

アストロサイトからの液性因子が rBSCB-1 の tight junction の発現や分布に影響を与え、バリア機能を強化している。

内皮細胞のバリア特性に及ぼすアストロサイトの影響について検討した。rBSCB-1 と TY10 はともに単独培養に比べて、アストロサイトとの共培養により TEER 値が上昇し (Fig.5. A), FITC-dextran の透過性が低下した (Fig.5. B)。アストロサイトの培養上清の作用により、rBSCB-1 では claudin-5, occludin とともに遺伝子発現・蛋白量が増加した (Fig.5. C,E,F,G, Table 2) が ZO-1 に変化はなかった (Fig.5. C,D)。TY10 では claudin-5, occludin の遺伝子発現と claudin-5 の蛋白量は増加したが occludin の蛋白量に変化はなく (Fig.5. C,E,F, Table 2)、アストロサイトの影響は内皮細胞株の種類によって異なる結果を示した。

また、rBSCB-1 の単独培養では tight junction 分子の発現分布は、細胞境界に波打つような歪んだパターンを示したが、アストロサイト培養上清を作用させると、細胞境界に安定した直線状の分布として観察された (Fig.5. H)。

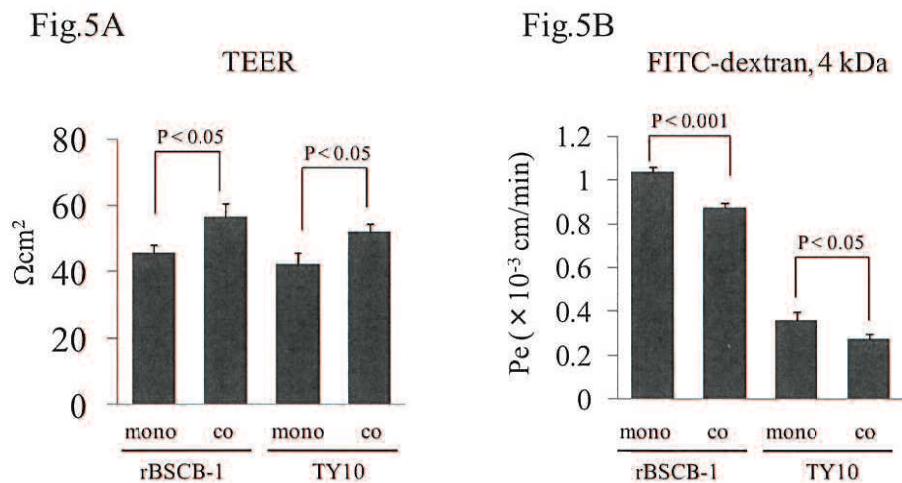


Fig.5. (A) (B) rBSCB-1, TY10 を用いて、アストロサイト共培養による TEER (A) と FITC-dextran (B) の透過性を検討した。rBSCB-1 と TY10 はともに単独培養 (mono) に比べて、アストロサイトとの共培養(co)により TEER 値が上昇し FITC-dextran の透過性が低下した。

Fig.5C

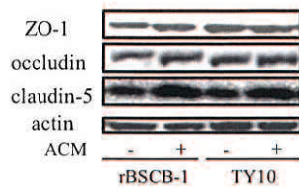


Fig.5D

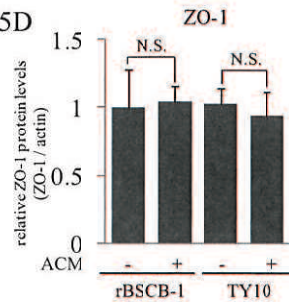


Fig.5E

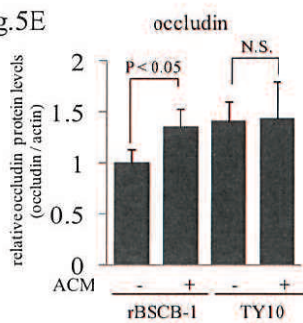


Fig.5F

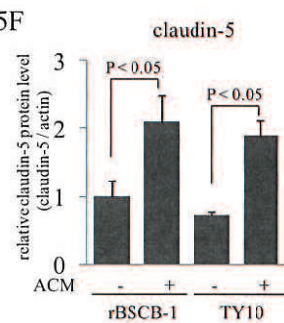


Fig.5.C アストロサイト培養上清 (ACM) による tight junction 分子の蛋白量への影響をウエスタンブロット法で検討した. ACM での 2 日間の培養により, rBSCB-1 では claudin-5, occludin の蛋白量が増加した. TY10 では claudin-5 は増加したが, occludin に変化はなかった. ZO-1 の蛋白量に変化はなかった (D).

Table 2. アストロサイト上清による tight junction 分子, Mdr1 の mRNA 発現への影響
rBSCB-1 と TY10 をコントロールメディウム (CM) あるいは, ACM にて 2 日間培養の後, リアルタイム PCR を用いて, claudin-5, occludin, ZO-1, Mdr1 の mRNA 量を定量比較した. CM で培養した時の値を 1 と設定した. rBSCB-1, TY10 とともに ACM での培養により, occludin, claudin-5, Mdr1 の mRNA 発現が増加したが, ZO-1 の変化はなかった.

* P < 0.05, ** P < 0.01, N.S., not significant

	rBSCB-1 / ACM		TY10 / ACM	
<i>ZO-1</i>	1.30 ± 0.23	N.S.	1.17 ± 0.28	N.S.
<i>occludin</i>	1.82 ± 0.11	**	2.54 ± 0.19	**
<i>claudin-5</i>	2.47 ± 0.25	**	1.86 ± 0.41	*
<i>Mdr1</i>	1.66 ± 0.16	*	3.25 ± 0.34	**

Fig.5G

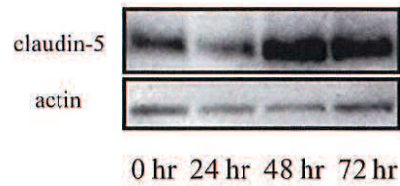


Fig.5H

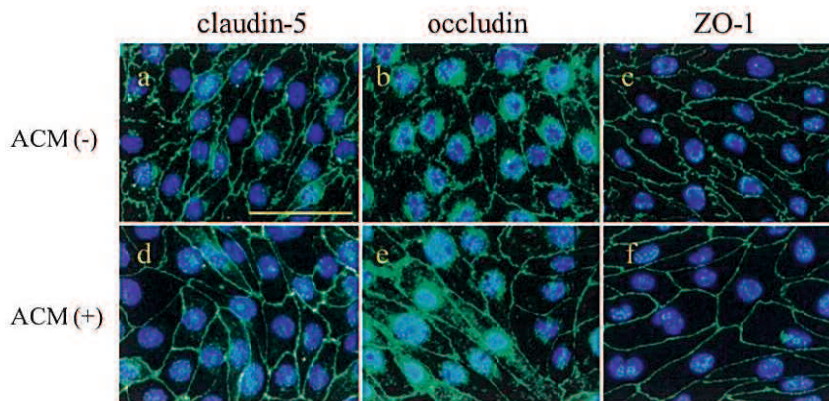


Fig.5 (G) ACMによる培養48時間後にはrBSCB-1のclaudin-5の蛋白量が増加した。

(H) rBSCB-1の単独培養(上段)では, claudin-5, occludin, ZO-1は, 波打つような不安定な発現分布を示すが, ACMの2日間の作用により(下段), 細胞境界に安定した直線状の分布となる。スケールバー: 50 μ m。

p-gpはrBSCB-1の細胞外への物質排出に関与している

rBSCB-1, TY10ともにウエスタンブロット法で同程度のp-gpの蛋白量を示した(Fig.6. A) p-gpの阻害剤であるverapamilにより, rBSCB-1, TY10ともにp-gpの基質であるrhodamine123の取り込みが増加した(Fig.6. B)。rBSCB-1はTY10と同様にp-gpがefflux transporterとして十分に機能していることが示された。次にアストロサイトによるp-gpの発現, 機能への影響を検討した。ACMの作用によりrBSCB-1, TY10ともにp-gpの遺伝子・蛋白量が増加したが(Fig.6. A, Table2), ACMはこれらの細胞のrhodamine123の取り込み量には影響を与えなかった(Fig.6. B)。

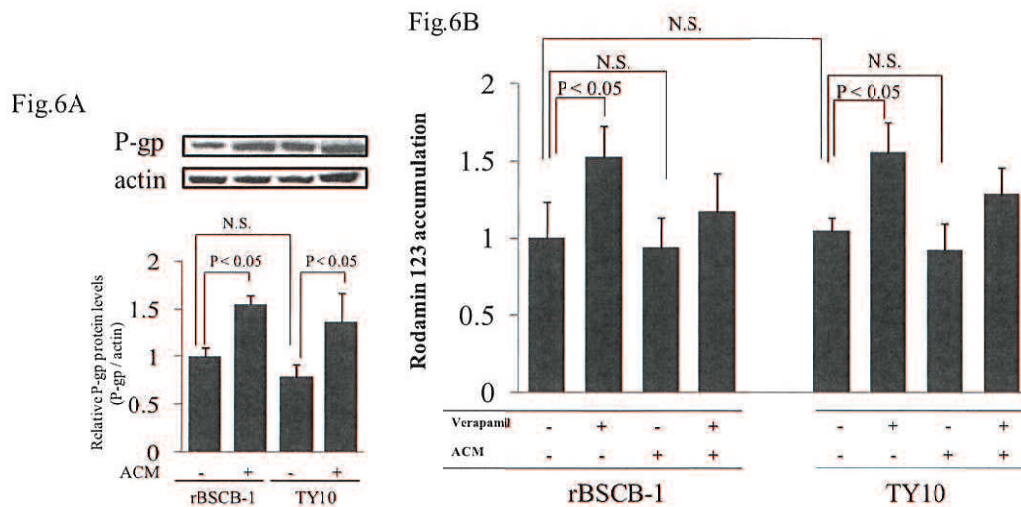


Fig. 6. (A) rBSCB-1, TY10 を用いてウエスタンブロット法で p-gp の蛋白量を検討した. 単独培養では rBSCB-1, TY10 とともに同程度の p-gp 蛋白量を保持していた. ACM での 2 日間の培養により, とともに p-gp の蛋白量が増加した.

(B) P-gp の阻害薬である verapamil と, p-gp の基質である rhodamine123 を用いて, rBSCB-1, TY10 の p-gp の薬物排出機能について検討した. rBSCB-1 と TY10 は同程度の rhodamin123 の取り込み量を示した. verapamil を作用させることで, 両細胞の rhodamine123 の取り込みが上昇した. rBSCB-1 に存在する p-gp は十分に機能していることが示された. ACM を作用させても rhodamine123 の取り込み量に変化はなかった.

考察

今回, 血液脊髄関門のバリア特性を明らかにするため, 血液脊髄関門の首座である内皮細胞の cell line を樹立し, rBSCB-1 と命名し細胞学的特性を検討した. rBSCB-1 は tsA58 を安定的に発現し, 温度感受性の性質を有していた. 33℃で培養すると細胞は安定して増殖するが, 一旦 37℃にすると増殖は停止し, 高い電気抵抗値を示した. rBSCB-1 は, げっ歯類の脊髄血管での発現が報告されている claudin-1, claudin-3, claudin-5, occludin, ZO-1 などの tight junction 分子をすべて保持していた. 透過性実験, 電気抵抗値を用いた検討により, rBSCB-1 は TY10 やこれまでに報告のある脳由来内皮細胞株に比べバリア機能が低いことが明らかになった. rBSCB-1 の電気抵抗値 (46.8Ωcm²) はヒト由来の TY10 とは同程度であったが, ラット (GPNP(66Ωcm²)) やマウス (TM-BBB(105-118Ωcm²)) 由来の内皮細胞株に比べ, 明らかに低い値を示した^{44,45)}. 4kDa-dextran の透過性についても, rBSCB-1(Pe=1.07×10⁻³cm/min)は TY10(Pe=0.34×10⁻³ cm/min), GPNT (Pe=0.975×10⁻³ cm/min), RBE4 (Pe=0.51×10⁻³ cm/min)などの脳由来の内皮細胞株のい

ずれと比べても高い透過性を示した⁴⁶⁾。BBBとBSCBのバリア機能の違いについての分子メカニズムは明らかにはなっていないが、GeらはマウスのBMECとSCMECの初代培養細胞を用いてバリア構成分子の蛋白量を比較検討し、SCMECはBMECに比べ、VE-cadherin, β -catenin, occludin, ZO-1が少ないことを報告している²⁴⁾。今回の検討でも、rBSCB-1は脳由来の内皮細胞であるTY10に比べ、claudin-5とZO-1の蛋白レベルは同程度であったが、occludinはrBSCB-1でより低値であった。これらから、血液脳関門(BSCB)が血液脳関門(BBB)と比べて脆弱な理由として、バリアの首座である内皮細胞のtight junctionやadherence junctionなどを構成するバリア構成分子の発現量の違いが要因である可能性が考えられた。rBSCB-1を用いることで、BBBとBSCBの違いを分子レベルでさらに明らかにすることができると考えられる。

アストロサイトはBBBのバリア機能を調節することが知られている⁴⁷⁾。BMECとアストロサイトの共培養の検討で、アストロサイトによりBMECのバリア機能が上昇することが示されている⁴⁸⁻⁵⁴⁾。今回我々はrBSCB-1を用いて、アストロサイトがBSCBのバリア機能とtight junction分子の発現にどのように影響するかを検討した。rBSCB-1とアストロサイトの共培養は、rBSCB-1の単独培養と比べて、高い電気抵抗値と4kDa-dextranの低い透過性を示した。アストロサイト培養上清(ACM)の作用により、rBSCB-1のclaudin-5とoccludinの遺伝子発現・蛋白量が増加し、rBSCB-1のtight junctionの発現パターンは、波打った不安定なパターンから、細胞境界への安定した太い直線状の分布に変化した。今回の検討で、BMECと同様にSCMECもアストロサイトによってバリア機能が調節されることが示され、アストロサイトからの未知の液性因子によって、rBSCB-1はtight junction分子の増加と細胞内分布の変化を介して、バリア機能が強化されることが考えられる。

脳において、p-gpやMRP-1, ABCG2などのABCトランスポーターは内皮表面の管腔側に存在し、毒性のある物質を細胞内から管腔側に汲み出すことで脳の恒常性を維持している²⁾。p-gpは脊髄微小血管に存在することが示されており⁵⁵⁾、Koszdinらはp-gpノックアウトマウスを用いた検討で脊髄からp-gpを介してactiveに薬物が血中に汲みだされていることを報告した⁵⁶⁾。我々は今回、*in vitro*モデルの検討で、rBSCB-1がp-gpを介して薬物を排出する能力があることを確認した。p-gpの蛋白量と機能はTY10と違いはなく、rBSCB-1のp-gpによる薬物排泄機能は脳由来内皮細胞と同程度であると考えられる。ACMの作用によりp-gpの遺伝子発現・蛋白量は増加したが、p-gpの機能に変化はなかった。過去の報告で、内皮細胞とアストロサイトを直接接触させて共培養することで、初めてp-gpの機能が高まることが指摘されており⁵⁷⁾、内皮細胞のp-gpの機能を十分に発揮するにはアストロサイトと内皮細胞の直接的な接触が必要かもしれない。

結語

今回新たに樹立した血液脊髄関門由来の rBSCB-1 は、バリア構成細胞に特徴的な tight junction 分子や様々な transporter を保持し、高いバリア機能を保持していた。BSCB 破綻のメカニズムを解析し、脊髄疾患の新たな治療法を開発するための有用なツールとなる。

本研究は「厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 免疫性神経疾患に関する調査研究」の助成によりおこなった。

参考文献

1. Poduslo JF, Curran GL, and Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91: 5705-5709.
2. Terasaki T, and Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx*. 2005. 2: 63-72.
3. Miller DS. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci*. 2010.31:246-254.
4. Bartels AL, Kortekaas R, Bart J, Willemsen AT, de Klerk OL, de Vries JJ, et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 2009.30:1818-1824.
5. Ji KA, Eu MY, Kang SH, Gwag BJ, Jou I, Joe EH. Differential neutrophil infiltration contributes to regional differences in brain inflammation in the substantia nigra pars compacta and cortex. *Glia*. 2008.56:1039-1047.
6. Kuntner C, Bankstahl JP, Bankstahl M, Stanek J, Wanek T, Stundner G, et al. Dose-response assessment of tariquidar and elacridar and regional quantification of P-glycoprotein inhibition at the rat blood-brain barrier using (R)-[(11)C]verapamil PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010.37:942-953.
7. Sharma HS. Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Curr Pharm Des*. 2005.11:1353-1389.
8. Prockop LD, Naidu KA, Binard JE, Ransohoff J. Selective permeability of [3H]-D-mannitol and [14C]-carboxyl-inulin across the blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in the rabbit. *J Spinal Cord Med*. 1995. 18: 221-226.
9. Pan W, Banks WA, Kastin AJ. Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. *J Neuroimmunol*. 1997.76:105-111.
10. Tonra JR. Cerebellar susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice: potential interaction of immunology with vascular anatomy. *Cerebellum*. 2002. 1: 57-68.
11. Pfeiffer F, Schäfer J, Lyck R, Makrides V, Brunner S, Schaeren-Wiemers N, et al. Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol*. 2011.122:601-614.
12. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, et al. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human

- glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2003. 105: 586-592.
13. Errede M, Girolamo F, Ferrara G, Strippoli M, Morando S, Boldrin V, et al. Blood-brain barrier alterations in the cerebral cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012.71:840-854.
 14. Schellenberg AE, Buist R, Yong VW, Del Bigio MR, Peeling J. Magnetic resonance imaging of blood-spinal cord barrier disruption in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Magn Reson Med.* 2007. 58:298-305.
 15. Popovich PG, Horner PJ, Mullin BB, Stokes BT. A quantitative spatial analysis of the blood-spinal cord barrier. I. Permeability changes after experimental spinal contusion injury. *Exp Neurol.* 1996. 142: 258-275.
 16. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma. I. The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest.* 1978.39:236-253.
 17. Takigawa T, Yonezawa T, Yoshitaka T, Minaguchi J, Kurosaki M, Tanaka M, et al. Separation of the perivascular basement membrane provides a conduit for inflammatory cells in a mouse spinal cord injury model. *J Neurotrauma.* 2010. 27: 739-51.
 18. Henkel JS, Beers DR, Wen S, Bowser R, Appel SH. Decreased mRNA expression of tight junction proteins in lumbar spinal cords of patients with ALS. *Neurology.* 2009. 72: 1614-1616.
 19. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008. 57: 178-201.
 20. Furuse M, and Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 2006. 16: 181-188.
 21. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003. 161: 653-660.
 22. Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, Kamoi M, Asashima T, Terasaki T. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2007. 210: 81-86.
 23. Terasaki T, and Ohtsuki S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology. *NeuroRx.* 2005. 2: 63-72.
 24. Ge S, Pachter JS. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord. *J Neuroimmunol.* 2006. 177: 209-214.
 25. Takahashi R, Hirabayashi M, Yanai N, Obinata M, and Ueda M. Establishment of SV40-tsA58 transgenic rats as a source of conditionally immortalized cell lines. *Exp Anim.* 1999. 48: 255-261.
 26. Obinata M. The immortalized cell lines with differentiation potentials: their

- establishment and possible application. *Cancer Sci.* 2007. 98: 275-283.
- 27.Sano Y, Shimizu F, Nakayama H, Abe M, Maeda T, Ohtsuki S, et al. Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells. *Cell Struct Funct.* 2007. 32: 139-147.
 - 28.Hosoya K, Hori S, Ohtsuki S, Terasaki T. A new *in vitro* model for blood-cerebrospinal fluid barrier transport studies: an immortalized choroid plexus epithelial cell line derived from the tsA58 SV40 large T-antigen gene transgenic rat. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004. 56:1875-1885.
 - 29.Hosoya KI, Takashima T, Tetsuka K, Nagura T, Ohtsuki S, Takanaga H, et al. mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines. a new *in vitro* BBB model for drug targeting. *J Drug Target.* 2000. 8: 357-370.
 - 30.Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007. 27: 697-709.
 - 31.Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia.* 1997. 19: 13-26.
 - 32.Tomi M, Hosoya K. Application of magnetically isolated rat retinal vascular endothelial cells for the determination of transporter gene expression levels at the inner blood-retinal barrier. *J Neurochem.* 2004. 91: 1244-1248.
 - 33.Shi LZ, Zheng W. Establishment of an *in vitro* brain barrier epithelial transport system for pharmacological and toxicological study. *Brain Res.* 2005. 1057: 37-48.
 - 34.Ohtsuki S, Tomi M, Hata T, Nagai Y, Hori S, Mori S, et al. Dominant expression of androgen receptors and their functional regulation of organic anion transporter 3 in rat brain capillary endothelial cells. comparison of gene expression between the blood-brain and -retinal barriers. *J Cell Physiol.* 2005. 204: 896-900.
 - 35.Ghassemifar MR, Eckert JJ, Houghton FD, Picton HM, Leese HJ, Fleming TP. Gene expression regulating epithelial intercellular junction biogenesis during human blastocyst development *in vitro*. *Mol Hum Reprod.* 2003. 9: 245–252.
 - 36.Peng, S., Rao, V.S., Adelman, R.A., and Rizzolo, L.J. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. 52: 1392–1403.
 - 37.Schwerk C, Papandreou T, Schuhmann D, Nickol L, Borkowski J, Steinmann U, et al. Polar invasion and translocation of *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus suis* in a novel human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLoS One.* 2012. 7: e30069
 - 38.Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, Hinley J, Trejdosiewicz LK, Southgate J. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol.* 2006. 208: 407–417.
 - 39.Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood–brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005. 19: 1872–1874.
 - 40.Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular

- endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006. 12: 4241–4245.
41. Sano Y, Shimizu F, Abe M, Maeda T, Kashiwamura Y, Ohtsuki S, et al. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood–brain barrier function. *J Cell Physiol.* 2010. 225: 519-528.
 42. Sano Y, kashiwamura Y, Abe M, Dieu LH, Huwyler J, Shimizu F, et al. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2012. 3: 1-12.
 43. Tetsuka K, Hosoya KI, Ohtsuki S, Takanaga H, Yanai N, Ueda M, et al. Acidic amino acid transport characteristics of a newly developed conditionally immortalized rat type 2 astrocyte cell line (TR-AST). *Cell Struct Funct.* 2001. 26: 197-203.
 44. Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, et al. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett.* 2003. 344: 112-116.
 45. Hosoya K, Tetsuka K, Nagase K, Tomi M, Saeki S, Ohtsuki S, et al. Conditionally immortalized brain capillary endothelial cell lines established from a transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *AAPS PharmSci.* 2000. E27: 1-11.
 46. Romero IA, Rist RJ, Aleshaiker A, Abbott NJ. Metabolic and permeability changes caused by thiamine deficiency in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* 1997. 756: 133-140.
 47. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006. 7: 41-53.
 48. Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP. Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *J Cell Sci.* 2003. 116: 693-700.
 49. Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem.* 2006. 97: 922-933.
 50. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 1987. 325: 253-257.
 51. Raub TJ, Kuentzel SL, Sawada GA. Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells *in vitro*: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp Cell Res.* 1992. 199: 330-340.
 52. Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res.* 2005. 1053: 162-174.
 53. Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem.* 2007. 101: 555-565.
 54. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci.* 1994. 107: 1347-1357.

55. Sugawara I, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK 16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord. *Jpn J Cancer Res.* 1990. 81: 727-730.
56. Koszdin KL, Shen DD, Bernards CM. Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of P-glycoprotein. *Anesthesiology.* 2000. 92: 156-163.
57. Gaillard PJ, van der Sandt IC, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG, et al. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Pharm Res.* 2000. 17: 1198-1205.