

学位論文（博士）

Intravenous injection of cyclophilin A realizes the transient
and reversible opening of barrier of neural vasculature
through basigin in endothelial cells

（Cyclophilin A の静脈内投与は血管内皮細胞の Basigin
を介して神経系血管バリアーの一過性かつ可逆的な開口
を実現させる）

氏名 本田 成美

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 病理形態学講座

令和4年1月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 目的	2
4. 方法	2
5. 結果	5
6. 考察	10
7. 結語	12
8. 謝辞	12
9. 参考文献	12
10. 補足データ	15

1. 要旨

全身に投与された治療薬が脳組織実質に到達するには、神経組織の血管により形成される血液脳関門を通過する必要がある。そのため、組織への損傷を最小限に抑えて血液脳関門を開くことができれば、難治性神経疾患の治療法開発に大きな進展をもたらすことが期待される。本研究では、血液脳関門を形成する血管内皮細胞に発現する Basigin に着目し、その内因性リガンドである Cyclophilin A (CypA) を用いて、血液脳関門機能を人為的に制御することを目的とした。マウス脳血管内皮細胞株を用いた *in vitro* 解析およびマウス中枢神経組織の血管における *in vivo* 解析により、CypA の投与が Basigin を介して血液脳関門機能を低下させること、それにより脳実質へ効率的に薬物を送達できることを示した。単層培養された血管内皮細胞において、CypA はタイト結合構成分子の一つである Claudin-5 を一過性かつ可逆的に細胞膜から消失させて、バリアー機能を低下させることを見出した。また、マウスへの CypA の単回静脈内投与では血液脳関門が一定期間開いた後、自発的に元の状態へ回復することが示され、そしてその限定された期間において、全身投与された水溶性薬物 Doxorubicin が脳組織実質へ送達されることが明らかとなった。本研究の結果は、CypA の静脈内投与によって、脳実質への薬物送達を自在にコントロールできることを示しており、難治性神経疾患に対する治療法確立に向けた重要な成果であると考えられる。

2. 研究の背景

血液から脳組織実質への分子の移動は、神経組織の血管が有する血液脳関門機能によって厳密に制限されている。多細胞生物は、神経細胞が正常に機能しうる最適な微小環境を維持するために、この血管脳関門機能を獲得した^{1,2)}。しかしながら、医学の進歩とともに中枢神経疾患に対する薬物治療が試みられるようになると、血液脳関門はその治療を困難にさせる負の側面を見せるようになった。すなわち、血液脳関門は全身に投与された治療薬の脳実質への送達を妨げる文字通りの障壁であり^{2,3)}、神経疾患の創薬研究において克服すべき重要な課題である。血液脳関門を人為的に、かつ適切に通過させる手段を確立できれば、様々な難治性神経疾患に対して幅広い応用が可能となり、画期的な治療法につながることを期待される。

我々はこれまで、血液脳関門には、タイト結合の形成に不可欠な膜タンパク質である Claudin-5⁴⁾の内皮細胞膜への局在が重要であることを明らかにしてきた⁵⁾。さらに、組織の低酸素状態や炎症性サイトカインなどの病的な刺激が、血管内皮細胞膜から Claudin-5 を消失させることで、血液脳関門機能を障害することを見出し、さらにその Claudin-5 の局在制御に関わる分子として ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 12、ADAM17、Basigin の3つの細胞膜貫通型タンパク質を特定した^{6,7)}。ADAM12 と ADAM17 は、主として低酸素状態による血液脳関門機能喪失に関与すること、一方、Basiginは様々な病的刺激による血液脳関門機能の喪失に共通して関与する必須分子であることが示された。また、我々は糖尿病網膜症モデルにおいて障害された血液脳関門機能を、Basigin 阻害剤の投与によって回復させることができることを示した。これは、Basigin機能を標的とした薬物が、血液脳関門機能の人為的制御に利用可能であることを示す興味深い知見である⁷⁾。そのような背景のもと、本研究では、Basigin を標的とし

て、閉じた状態の血液脳関門を人為的に開く手法を確立することを目的とした。具体的には、Basigin の内因性リガンドである Cyclophilin A (CypA) に着目した。

CypA は peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPIase) 活性を有する Cyclophilin ファミリーに属するタンパク質である⁸⁾。細胞質に多く存在しており、そもそもは免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CsA) の細胞内受容体として同定された分子である⁹⁾。CsA は CypA と複合体を形成することでカルシニューリンを阻害し、それによって T 細胞活性化が抑制されて免疫抑制に至ることが分かっている¹⁰⁾。そのほか、細胞内シグナル伝達、タンパク質フォールディング、タンパク質輸送、転写制御など、細胞内 CypA は様々な細胞機能に重要な役割を果たすことが判明している¹¹⁾。近年、CypA の細胞内における機能とともに、CypA が細胞外に分泌され様々な生理現象や病態に関与することが見出された。CypA は血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど様々な細胞から分泌され、標的細胞表面の Basigin と結合することで、炎症や心血管疾患などの病態を制御することが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。

3. 目的

我々はこれまで、脳微小血管内皮細胞における Basigin が、Claudin-5 の細胞膜局在を制御することで血液脳関門機能の低下に寄与することを明らかにしてきた⁵⁻⁷⁾。本研究では、Basigin のリガンドである CypA の血液脳関門機能への関与を解析することを目的とした。

4. 方法

細胞培養

マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 は American Type Culture Collection 社 (Manassas, VA) から入手し、10%ウシ胎児血清を含む高グルコース (4500 mg/l) タイプのダルベッコ改変イーグル培地 (Sigma-Aldrich 社, St.Louis, MO) にて、37°C、5%CO₂ 下で培養した。すべての実験は、7 日間コンフルーエントな状態 (単層状態) を維持した細胞を用いて実施した。PPIase 活性を保持した Cyclophilin A (CypA) および PPIase 活性を喪失した Cyclophilin A (CypA/PPIase⁻) は、それぞれ BioVendor research and diagnostic products 社 (Brno, Czech Republic) および Abcam 社 (Cambridge, UK) から購入した。細胞への CypA 刺激は、200、300、400 ng/ml の濃度および 1、3、6、9、12 時間のインキュベート処理で実施した。

ウェスタンブロット分析

0.5% Triton X-100、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、 HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA) を含む Phosphate-buffered saline (PBS) で細胞を溶解し、得られた細胞抽出液に 2-mercaptoethanol を 5% 添加した Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories 社, Hercules, CA) を加えて煮沸処理を施した。総タンパク質量 10 μg を含むサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、PVDF 膜であるイモビロン P 膜 (Millipore 社, Billerica, MA) に転写した。

0.1%Tween20 含有 Tris-buffered saline (TBS-T) で溶解した 5%スキムミルクを用いて、タンパク質を転写した PVDF 膜上の非特異的結合をブロッキングした後、Basigin に対するウサギポリクローナル抗体 (Scrum 社に委託作製, Tokyo, Japan) と 4°C で一晩反応させた。TBS-T で洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Dako 社, Copenhagen, Denmark) と室温で 1 時間インキュベートした。ハウスキーピングタンパク質として β -アクチンをウェスタンブロットで検出して Basigin バンドの標準化に用いた。 β -アクチンはマウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich 社, Inc.MO, USA) およびその 2 次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (Dako 社) と反応させた。2 次抗体反応後は TBS-T で洗浄し、メーカーのプロトコルに従い、化学発光検出試薬 Amersham ECL start または ECL prime (GE Healthcare 社, Uppsala, Sweden) で反応させ、Amersham Imager 600 (GE Healthcare 社) を用いて、目的のバンド由来の発光を検出した。

免疫蛍光染色

免疫染色に供する bEnd.3 細胞は、PBS で洗浄後、100%メタノールで 5 分間、室温で固定した。その後、抗体の非特異的結合をブロックするために、10%正常ヤギ血清 (Invitrogen 社, Carlsbad, CA) で細胞を 30 分間インキュベートした。続いて、Claudin-5 に対するウサギポリクローナル抗体 (Invitrogen 社) と 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Molecular probes 社, Eugene, OR) を用いて、遮光のもと室温で 1 時間インキュベートした。染色した細胞を Fluoromount (Diagnostic BioSystems 社, Pleasanton, CA) で封入し、Zeiss LSM5 Pascal 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena, Germany) で観察した。Claudin-5 タンパク質の発現量に相当する蛍光強度を定量的に解析するために、LSM5 Pascal に搭載されたアプリケーションソフトを用いて、細胞膜上の Claudin-5 の蛍光強度を測定した^{6,7)}。培養皿をランダムに撮影し、各写真に 5 本の直線を引き、それらと細胞膜が交差する位置における蛍光強度を約 80 点測定した。それらの蛍光強度の平均値を、各 bEnd.3 細胞層における細胞膜上の Claudin-5 の発現レベルとして算出した。すべての実験は独立して 3 回実施した。

Small interfering RNA (siRNA) のトランスフェクション

陰性対象としての非サイレンシング siRNA と、マウス Basigin に特異的な 2 種類の siRNA (ID : s63099 および s63100、Basigin siRNAs #1 および #2 として表記) は、Applied Biosystems 社 (Foster City, CA) から購入した。siRNA は Lipofectamine RNAiMAX および無血清培地 Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、メーカーの推奨プロトコルに従い、各 siRNA を最終濃度 20 nM で細胞にトランスフェクションした。培養後 48 時間の細胞を各実験に供した。

経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance; TEER) の測定

単層培養した bEnd.3 細胞が形成するバリアー機能は、電気抵抗値を測定することで評価した。フィブロネクチンをコートされたインサート (孔径 0.4 μm) 上で bEnd.3 細胞を単層培養し、インサートの電気抵抗を Millicell ERS Voltohmmeter (Millipore 社, Billerica, MA) で測定した⁵⁻⁷⁾。bEnd.3 細胞層の TEER は、細胞を播種していないブランクのインサートにお

る抵抗値を差し引き、差し引いた値にインサートの表面積を乗じることで算出した。各実験は独立して3回実施した。

動物実験

本研究では7週齢になる雄のC57BL/6Jマウス（日本SLC社、静岡）を用いた。すべての実験手順は、山口大学のIACUC（Institutional Animal Care and Use Committee）で承認されており、動物の愛護及び管理に関する法律（法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省告示第88号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第71号）の定めるところに従って実施した。

網膜 flat-mount 標本の免疫蛍光染色

マウス網膜の flat-mount 標本を4%paraformaldehyde(PFA)で30分間、室温にて固定した後、1%BSA および0.5%Triton X-100を含むPBSで1時間、室温で処理して抗体の非特異的結合のブロッキングおよび組織の透過処理を行なった。その後、Claudin-5に対するウサギポリクローナル抗体（Invitrogen社）を4℃で一晩反応させた。TBS-Tで洗浄した後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG（Molecular Probes社）と3時間、室温にてインキュベートした。PBSで洗浄後、蛍光マウント剤で封入し、Zeiss LSM5 Pascal 共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss社）で観察した。

網膜血管の透過性評価

CypA が生体内の血液脳関門機能に及ぼす影響を調べるため、CypA または陰性対照としての溶媒コントロールをマウス静脈に単回投与し、3、6、24時間後に網膜血管の透過性を以下の手法で評価した。100 μg/ml のHoechst 染色液 H33258（分子量534Da、Sigma-Aldrich社）と1 mg/ml のテトラメチルローダミン結合リジン修飾デキストラン（分子量10,000Da、Thermo Fisher Scientific社）を含む500 μl のPBSを左心室に注入した。蛍光色素を注入した後、眼球を摘出し、直ちに4%PFAで15分間、室温にて固定し、網膜 flat-mount 標本を作製した⁵⁻⁷⁾。これを蛍光マウント剤で封入し、Zeiss LSM510 META 共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss社）で観察した。実験は少なくとも3回独立して実施した。

脳浮腫の評価

CypA 投与による血液脳関門の開放が、脳浮腫を引き起こさないかを確認するために、CypA あるいは溶媒のみ（陰性対照）を注射してから3時間後と24時間後の脳の水分含有率%を、脳の湿重量と乾燥重量を測定し、以下の計算式で算出した。

$$\text{水分含有率(\%)} = 100 \times (\text{湿重量(g)} - \text{乾燥重量(g)}) / \text{湿重量(g)}$$

乾燥重量は、110℃で72時間かけて脳の水分を蒸発させて測定した。

Doxorubicin の検出

マウスにCypA（200 μg/kg）または溶媒のみを静脈内投与し、3時間後にDoxorubicin 塩酸塩（富士フイルム和光純薬、大阪）6.25 mg/kgを尾静脈に投与した。さらに3時間後にマウスから大脳、肝臓、腎臓を摘出し、凍結切片作製用包埋剤 OCT コンパウンド（サクラファインテッ

ク社, 東京) 中で凍結させた。厚さ $10\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し, LSM710 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 社) で観察した。Doxorubicin の蛍光は 488nm のアルゴンレーザーで励起し, その蛍光を 530nm のロングパスフィルターで観察した^{14,15)}。検出された蛍光強度の定量解析のために, 大脳, 肝臓, 腎臓から 3 つの切片を作製し, $20\times$ 対物レンズを用いて 1 切片あたり 3 つの領域をランダムに選択した。各部位の蛍光強度を LSM710 共焦点レーザー顕微鏡のアプリケーションソフト上のプログラムを用いて定量し, 9 部位の平均値を算出して 1 サンプルあたりの定量値とした。独立した 3 回の実験を実施した。

統計処理

すべてのデータは $\text{means}\pm\text{SD}$ で示した。本研究で比較対象としたグループ間では, F 検定で分散が等しいことが示されたため, Student's *t* 検定でデータを比較した。差異については, $p<0.05$ で統計的に有意であると判断した。

5. 結果

脳微小血管内皮細胞のバリアー機能に対する CypA の影響

血液脳関門の *in vitro* モデルとして, マウス脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 を用いた。コンフルエントの状態での 7 日間培養することで, Claudin-5 が細胞膜にのみ発現した血管内皮細胞の単層培養層を得ることができる。本系ではバリアー機能の指標となる経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance; TEER) の増加を確認した bEnd.3 細胞による単層培養層を用いた^{5-7,16)}。まず, 本モデルにおける bEnd.3 単層細胞膜に発現する Basigin タンパク質をウェスタンブロット法で解析した。Basigin は 2 つの異なる形態で発現しており, *N*-結合型グリコシル化を阻害するツニカマイシン処理によって, その 2 つのバンドが消失すると共に, より低分子量側へシフトしたバンドの増加が確認された。このことから, 先の 2 つのバンドは Basigin の高糖化体と低糖化体に対応していることが分かった (図 1a, 補足図 S1)。次に, bEnd.3 細胞層に対する CypA の作用を解析するため, 異なる濃度 (200, 300, 400 ng/ml) の CypA で 3 時間処理を行なった。その後, 細胞膜に局在する Claudin-5 の発現レベルを免疫染色にて定量解析し, bEnd.3 細胞層のバリアー機能については TEER を測定することで評価した^{6,7)}。細胞膜に局在する Claudin-5 の発現量および bEnd.3 細胞層 TEER は, CypA の濃度に依存して減少した。これらの結果より, CypA は bEnd.3 細胞層の細胞膜における Claudin-5 を減少させ, バリアー機能を減弱させることが示された (図 1b-d)。CypA は PPIase 活性を有しているが, これまでの報告から, CypA によって引き起こされる生物学的現象には, PPIase 活性に依存するものと依存しないものが知られている^{11,13,17)}。そこで, bEnd.3 細胞層のバリアー機能低下における CypA の作用機序を理解するため, CypA 作用における PPIase 活性の寄与を調べた。PPIase 活性を欠いた CypA (CypA/PPIase⁻) で bEnd.3 細胞層を処理したところ, PPIase 活性を持つ CypA で処理した場合と同等に, 細胞膜に局在する Claudin-5 の発現レベルと単層の TEER が低下することが分かった (図 1e-g)。これらの結果から, CypA による bEnd.3 細胞層のバリアー機能の低下は PPIase 活性とは無関係であることが示された。

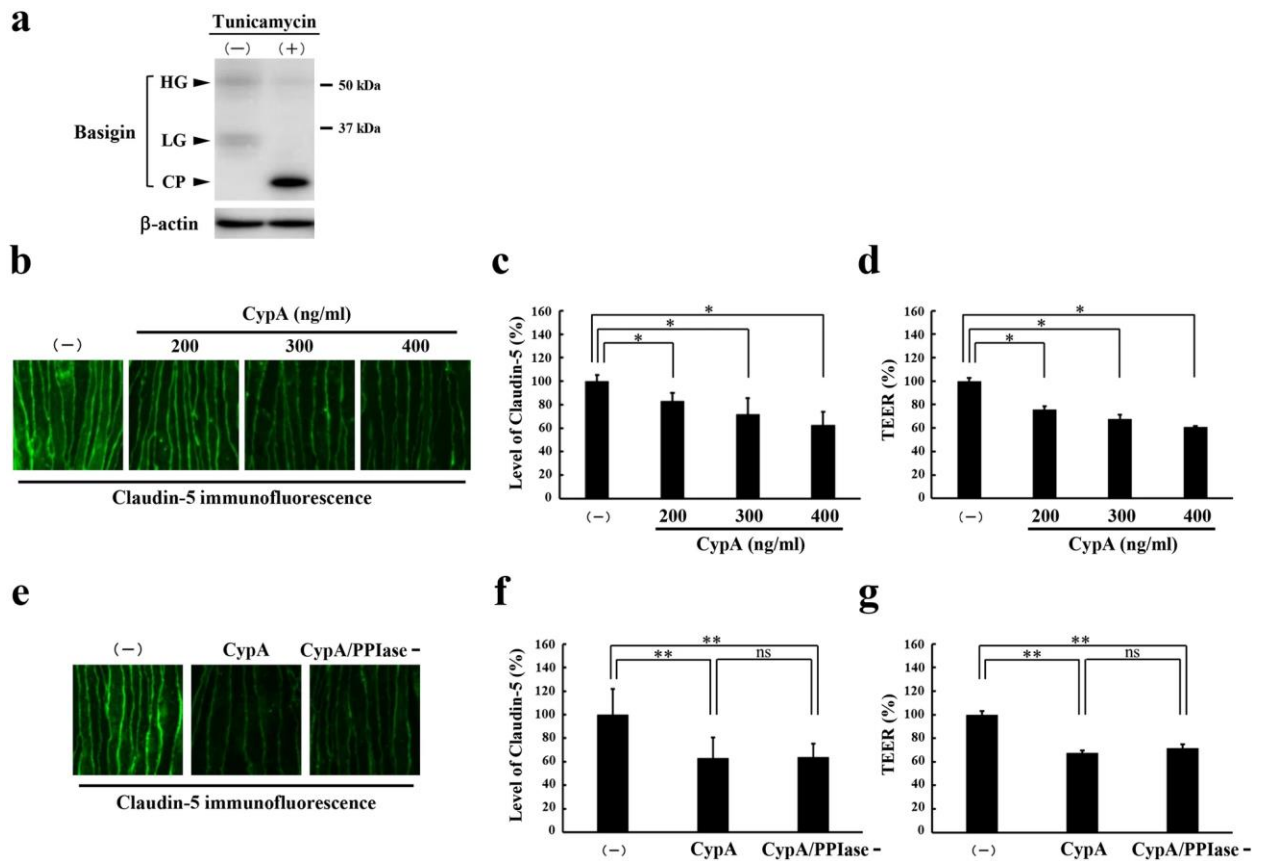


図1. 脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 における Claudin-5 の発現に対する CypA の効果

(a) bEnd.3 細胞層には、2つの異なるグリコシル化形態の Basigin が発現している。(トリミング処理前のプロット原図は補足図 S1 に示す。)(b-d) bEnd.3 細胞層を CypA で 200, 300, 400 ng/ml の濃度で刺激し、細胞膜に局在する Claudin-5 の発現レベル(b, c)とバリアー機能(d)を、それぞれ免疫蛍光染色(b)とその定量解析(c)および TEER(d)によって評価した。CypA で処理した bEnd.3 細胞層では、細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルが全ての濃度で有意に低下し、bEnd.3 細胞層の TEER の低下と密接に関連していることが示された。(e-g) bEnd.3 細胞層を CypA または PPIase 活性を持たない CypA/PPIase で処理した。免疫蛍光染色 (e) とその定量解析 (f) および TEER の測定 (g) から、CypA による細胞膜局在化 Claudin-5 の減少は PPIase 活性とは無関係であることが示された。(c, d, f, g) のデータは、3 回の独立した実験の平均 \pm SD として示されている。HG 高糖化型、LG 低糖化型、CP コアタンパク質。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, not significant.

CypA は Basigin 以外にも結合相手が存在するため、次に CypA 処理によるバリアー機能低下が Basigin を介した機序であるかを調べた。Basigin に特異的な siRNA を bEnd.3 細胞に導入して Basigin の発現を抑制した後⁷⁾、300 ng/ml の CypA で 3 時間処理した。Basigin の発現が抑制された bEnd.3 細胞層では、細胞膜に局在する Claudin-5 の発現や TEER のレベルが CypA を処理しても減少せず、CypA のバリアー機能への影響が Basigin の発現抑制で喪失することが示された(図 2)。これらの結果から、Basigin は CypA による血液脳関門の開口に不可欠な分子であることが示唆された。

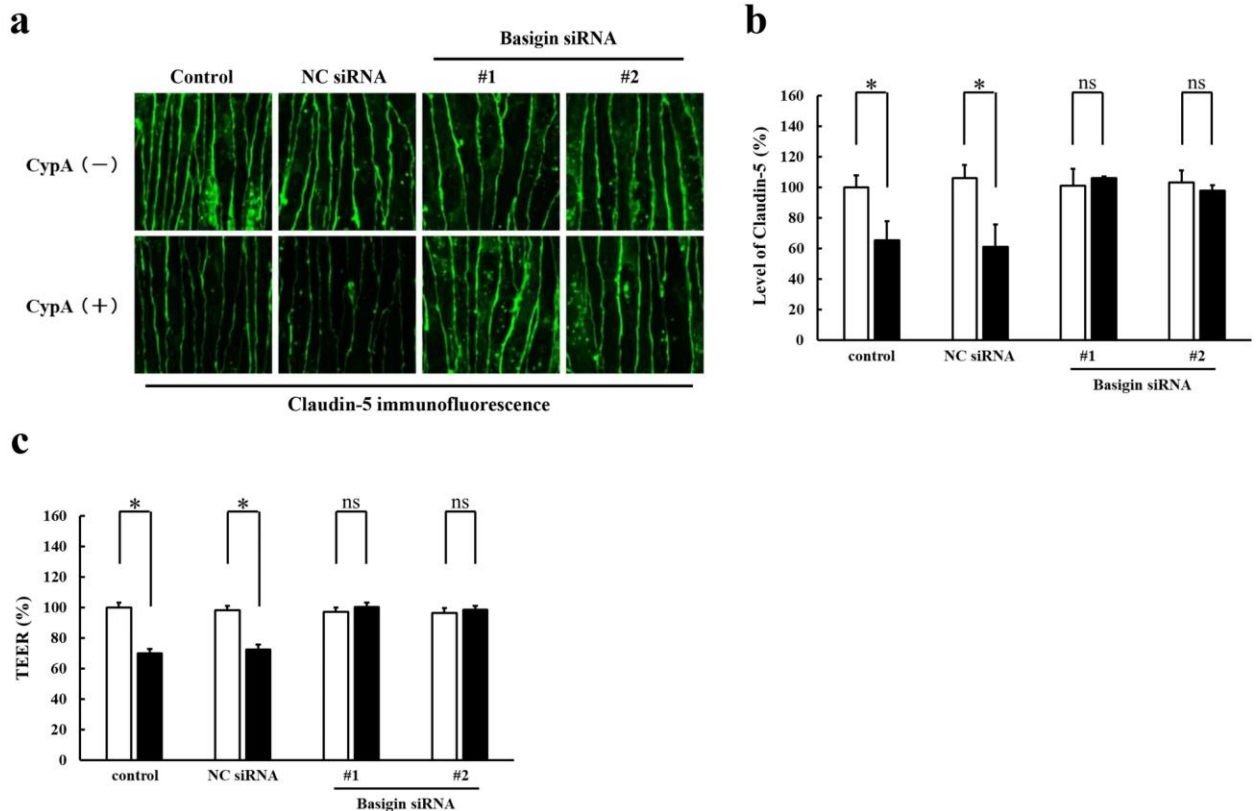


図2. CypAによって誘導される脳微小血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞膜からの Claudin-5 消失に対する Basigin の関与

免疫蛍光染色 (a) とそれに対応する定量解析 (b)、および TEER の測定 (c) により、CypA による bEnd.3 細胞層の細胞膜からの Claudin-5 の消失および TEER の低下が、Basigin 特異的な siRNA (#1 および #2) による Basigin 発現抑制によって阻害されることが示された。NC siRNA (negative control siRNA) には非サイレンシング siRNA を用いた。* $P < 0.01$; ns, not significant.

CypA 処理による一過性かつ可逆的なバリアー機能の低下

bEnd.3 細胞層に対する CypA 処理の影響について経時変化を調べるために、bEnd.3 細胞層に 300 ng/ml の CypA を添加し、様々な時間インキュベートした。その結果、細胞膜に局在する Claudin-5 の発現レベルおよび bEnd.3 細胞層の TEER のいずれにおいても、CypA 処理 3 時間後に有意な減少が見られ、9 時間後には自発的に無刺激時のレベルに戻った (図 3)。この興味深いデータは、CypA による bEnd.3 細胞層のバリアー機能低下が一過性かつ可逆的であること、また自発的な回復が可能な機序であることを示している。

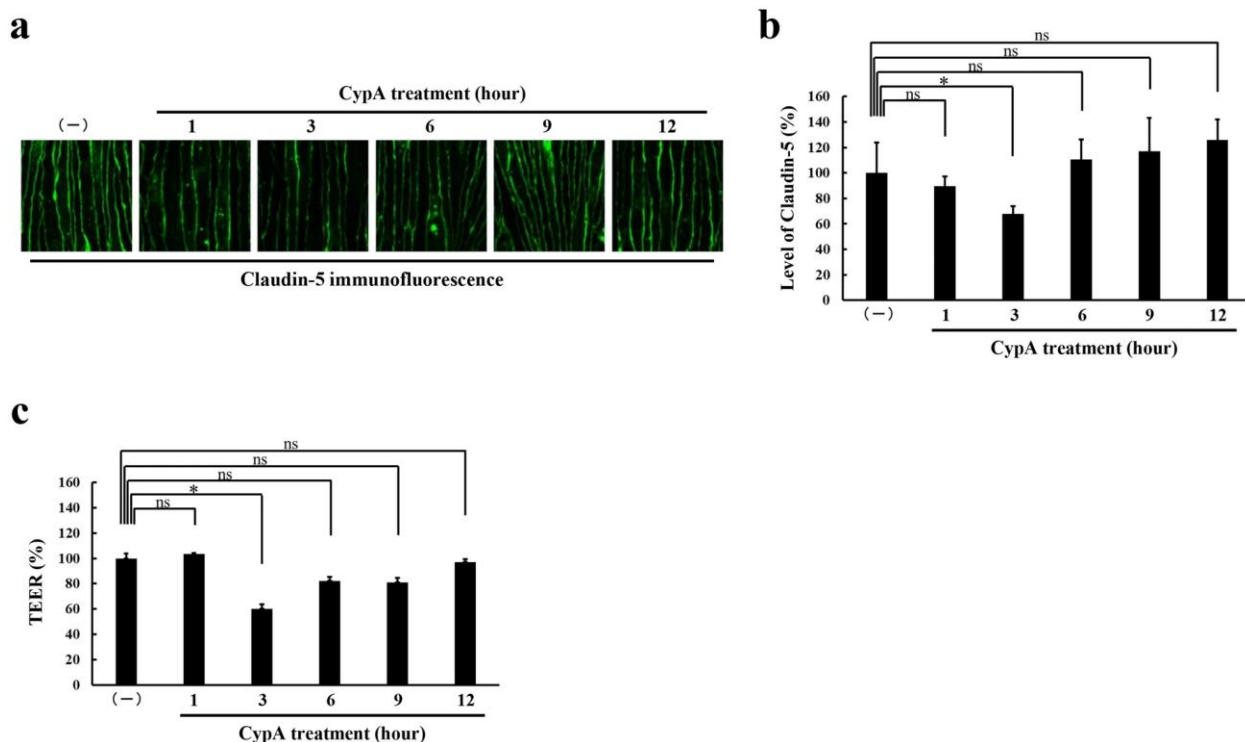


図3. 脳微小血管内皮細胞 bEnd. 3 細胞層におけるバリアー機能の CypA 刺激による一過性かつ可逆的な低下

細胞膜に局在する Claudin-5 の免疫蛍光染色 (a) とそれに対応する定量分析 (b) により、細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルは、CypA 刺激の 3 時間後に有意に減少し、刺激の 9 時間後には刺激前のレベルに回復することが示された。bEnd. 3 細胞層の TEER (c) は、細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルと密接に相関した。*P < 0.05; ns, not significant.

続いて、CypA による血管内皮細胞のバリアー開口能力が、臨床における脳神経組織を標的としたドラッグデリバリーに応用可能かを検討するため、*in vivo* での検証を行なった。まず、尾静脈から CypA を単回投与したマウスにおける、網膜組織の血管内皮細胞膜に局在する Claudin-5 と血管透過性の変化を解析した。図 4a に示すように、末梢微小血管内皮細胞の細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルは、CypA の静脈内投与後 3 時間で減少し、24 時間後には生理的なレベルに回復することがわかった。本処置を行なったマウスにおいては、脳の湿重量と乾燥重量から評価した有意な脳浮腫 (補足図 S2) や、有意な神経学的徴候は認められなかった。

CypA の前投与による脳実質への薬物送達の促進

静脈内への CypA 単回投与によって、網膜血管における血管バリアーが一過性かつ可逆的に開くことが示されたため、次に CypA の前投与が、脳組織実質への薬物送達を可能にするかを検討した。CypA の前投与あるいは未投与のマウスに、それぞれ Doxorubicin を静脈内投与し、大脳および肝、腎における実質組織への取り込みを解析した。Doxorubicin は蛍光特性を有する分子であるため、共焦点レーザー顕微鏡にて実質組織における Doxorubicin の直接的な観察が可

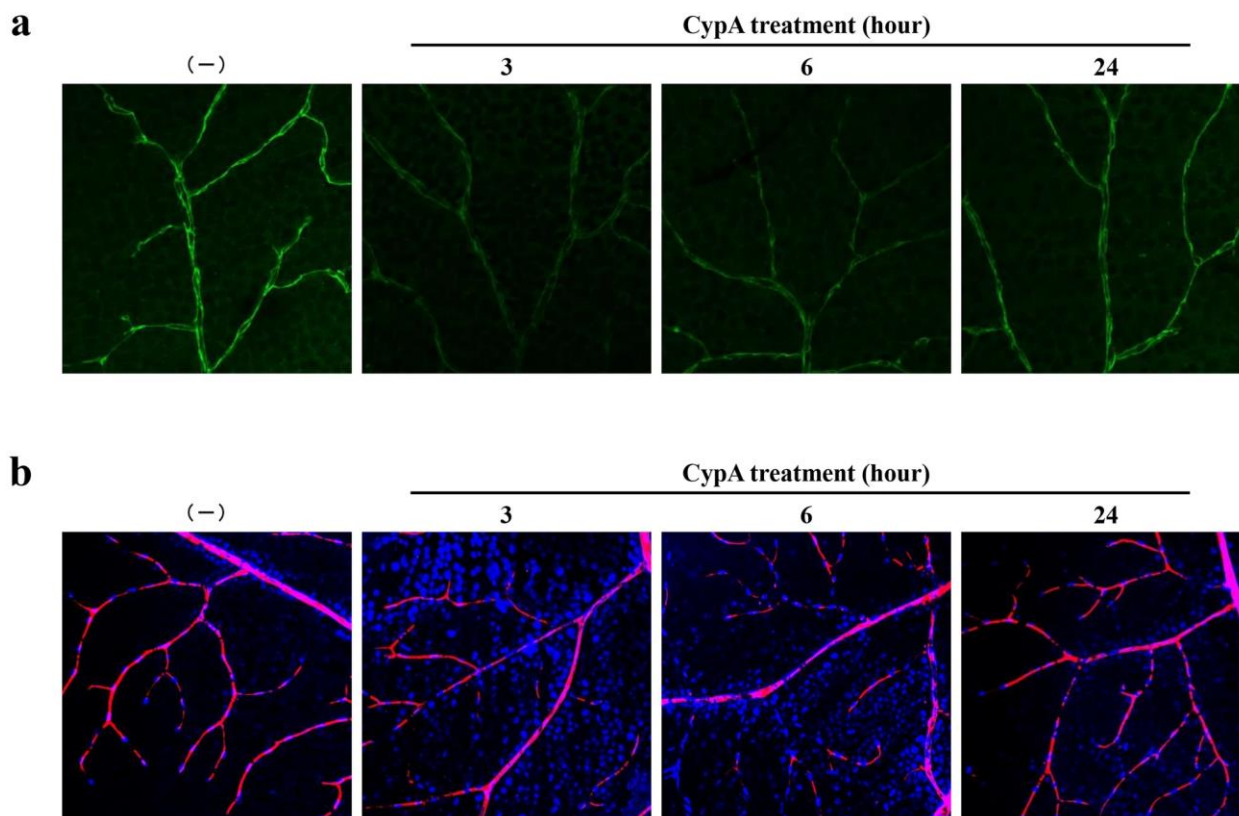


図 4. CypA を静脈内投与したマウスにおける一過性かつ可逆的な網膜血管バリアー機能の喪失
 CypA を静脈内投与したマウスの網膜血管における Claudin-5 の発現 (a) と血管透過性 (b) を、免疫蛍光染色 (a) と、蛍光色素である Hoechst 染色 (青) およびデキストラン (赤) を用いた透過性試験 (b) によって評価した。各パネルは投与前および投与 3、6、24 時間後に測定した結果を示す。CypA 投与 3 時間後には、網膜血管内皮細胞の細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルが著しく低下し、Hoechst 染色 (青) の著しい滲出が観察された。CypA 投与後 24 時間では、細胞膜に局在する Claudin-5 のレベルと血管透過性のいずれも生理的なレベルに戻った。

能である。大脳の実質組織において、CypA 未投与のマウスでは蛍光シグナルがほぼ検出されなかったが (図 5b)、CypA 前投与のマウスでは、有意な Doxorubicin 由来蛍光シグナルが認められた (図 5f)。また、大脳組織において CypA 投与の有無による明らかな病理組織学的変化は見られなかった (図 5a, e)。一方、肝と腎における実質組織では、CypA 投与の有無に関わらず、Doxorubicin の蛍光シグナルが強く検出された (図 5c, d, g, h)。肝や腎の血管系は、血液脳関門に匹敵するバリアー機能を持たないことが要因だと考えられる。これらの結果は、定量的な分析によっても確認された (図 5i-k)。以上の結果は、CypA を単回で前投与することで、Doxorubicin を脳組織の実質部分に到達させることを示している。

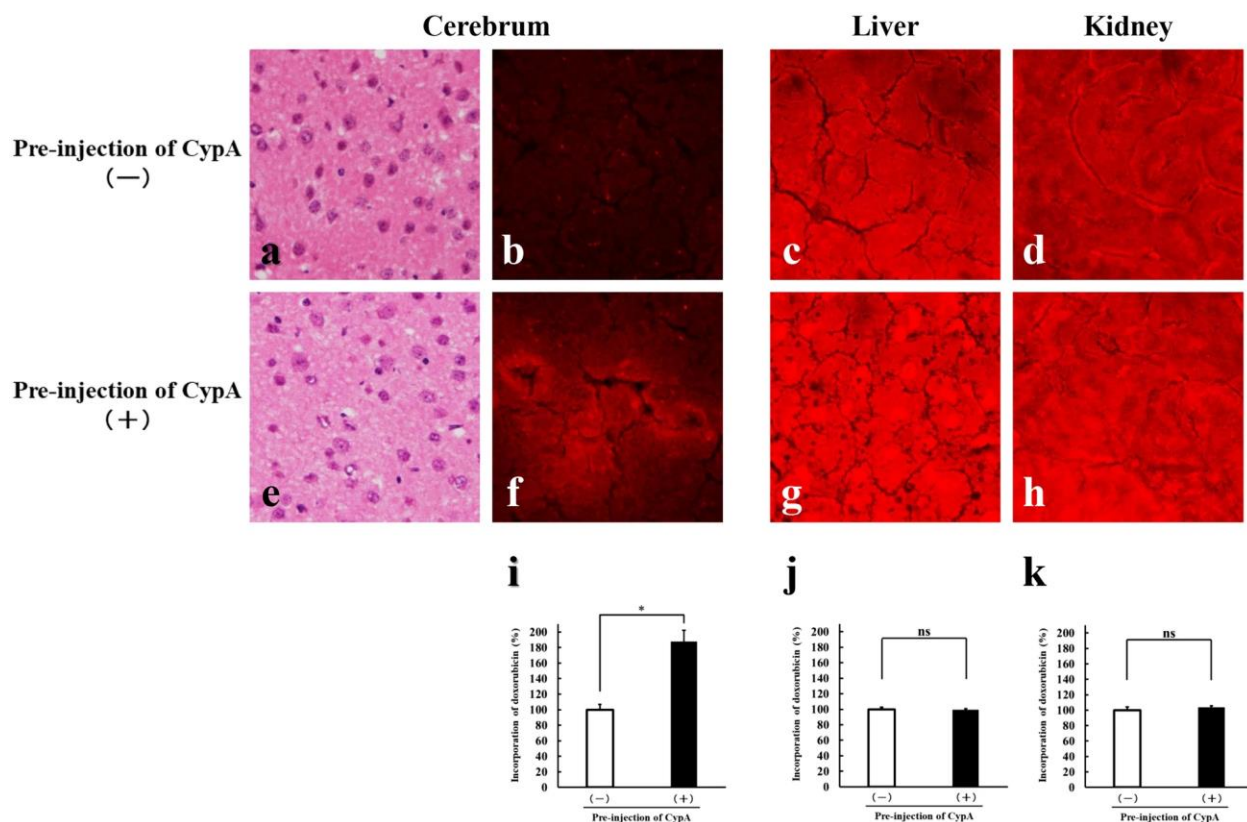


図5. CypAの前投与によるDoxorubicinの脳組織実質への送達

CypAを未投与 (a-d) および前投与 (e-h) したマウスに、Doxorubicinを静脈内投与した。それらのマウスにおける大脳および肝、腎の実質部分へのDoxorubicinの取り込みを可視化 (赤) し (b-d, f-h)、その蛍光性を利用して定量化した (i-k)。CypA前投与マウスでは、脳組織実質 (f) でDoxorubicinの蛍光シグナルが顕著に増強されているのに対し、CypA未投与マウスの大脳では蛍光シグナルがほぼ検出されなかった (b)。ヘマトキシリン-エオジン染色により、大脳の組織学的解析を行った結果、CypA投与の有無で変化は見られなかった (a, e)。肝 (c, g) および腎 (d, h) においては、CypA投与の有無にかかわらず、Doxorubicinの蛍光シグナルが強く検出された。*P < 0.05; ns, not significant.

6. 考察

血液脳関門の機能は静的なものではなく、血管系が晒される状況に応じて動的に制御されている^{18,19}。血液脳関門は、虚血や炎症などの様々な刺激下で開いた状態になることが知られている。種々の神経疾患における血液脳関門機能低下の仕組みについては、これまでに多くの報告がなされている²⁰⁻²³。それらの研究では、マトリックスメタロプロテアーゼ9のようなタンパク質分解酵素によるバリアー形成分子の分解を基盤とした構造的破壊に着目したことが多い²⁴⁻²⁶。一方、我々の研究室では、血液脳関門の機能を人為的に制御することを終着点としているため、血液脳関門機能の生理学的適応応答に関与する分子を標的とすることが望ましいとの考えのもと、血液脳関門の調節機構を解析してきた。その結果、血液脳関門機能の本体を担う血管内皮細胞に発現し、組織の低酸素状態やサイトカインなどに応答した血液脳関門の開口に関与

する分子として、ADAM12 および ADAM17、Basigin を特定した^{6,7)}。これらの分子は、生理的条件下において既に神経組織の血管内皮細胞に発現している膜貫通型分子であるため、何らかの遺伝子を新たに転写・翻訳することなく速やかに血液脳関門機能を変化させることが可能と考えられる。我々は、血液脳関門を人為的に開口させる手法を確立するための標的としてBasiginに着目した。Basiginは免疫グロブリンスーパーファミリーの膜貫通分子で、マトリックスメタロプロテアーゼの誘導、炎症の調節、血液脳関門機能の調節など、様々な生理的・病的プロセスに関与する可能性が示されている。そのため、Basiginは細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ誘導因子 (EMMPRIN)、CD147、HT7 など複数の別称を持つ²⁷⁾。血液脳関門機能との関連においては、Basigin はニワトリにおける糖タンパク質 HT7 として報告された²⁸⁾。血管内皮細胞に関してはバリアーを形成する内皮細胞にのみ発現していることから、血液脳関門機能に関与する可能性が指摘されていた。しかしながら、Basiginの発見以来、遺伝子ターゲティングを含む多くの研究がなされたにもかかわらず、血液脳関門における Basigin の関与は明らかにされていなかった。そのような中、我々は最近、バリアーを形成する血管内皮細胞に発現する Basigin が、血液脳関門の維持ではなく開口のための必須分子であること、さらに、神経疾患で開いた状態になった血液脳関門を閉じた状態に回復させるための標的分子になりうることを報告した⁷⁾。本研究では、Basigin が、血液脳関門を人為的に開いた状態にして治療薬の脳組織実質への送達を促進するための標的となることを示し、病的に開いた状態にある血液脳関門を人為的に閉じた状態にするための標的としてだけでなく、閉じた状態の血液脳関門を人為的に開いた状態にするための標的としても有用であるという別の利用価値を示すことに成功した。すなわち、Basigin のリガンドである CypA を細胞外から投与し血管内皮細胞に作用させることにより、血液脳関門を人為的に開口できることを、*in vitro* および *in vivo* の実験で明らかにした。さらに、CypA による血液脳関門の人為的開口は一過性であり時間の経過と共に自発的に回復し、有意な神経学的徴候を伴わないことは注目に値する。CypA は、様々な分子との相互作用によって炎症プロセスを調節するメディエーターとして知られている^{11, 29-31)}。しかしながら、Basigin 特異的な siRNA を用いた我々のデータは、CypA の血液脳関門の開口には Basigin が不可欠であることを示している。また、我々は CypA がそれ自身の PPIase 活性とは無関係にバリアーを開くという興味深い結果を得ている。このことから、PPIase 活性欠損型 CypA を用いることで、PPIase 活性を必要とするような CypA のバリアー機能調節以外の作用、すなわち副作用を軽減させた形で CypA の利用が可能であり、臨床応用を考える上では大きなメリットとなる。

親水性薬物を脳組織実質に送達することの難しさは、様々な神経疾患患者の予後を改善するために解決すべき最も重要な問題の一つである³²⁾。本研究では、静脈内投与された Doxorubicin が、CypA 未投与のマウスでは脳組織実質ではほとんど取り込まれないのに対し、CypA 前投与のマウスでは明確に取り込みが促進されることが示された。しかしながら、神経細胞が正常に機能するためには、最適な組織微小環境が維持される必要があり、血液脳関門の開いた状態が過度に維持されることは危険な状態を招く可能性が高い。そのため、単にバリアーが開くだけでなく、必要時以外はバリアーが閉じていること、すなわち血液と組織実質間の分子移動は適切に制限されることが不可欠だと考えられる。この観点から、CypA の前投与による血液脳関門の開口が、本研究のトレーサーを用いた透過性アッセイにより、一過性であると同時に可逆的であることが示されたことは注目に値する。このように、CypA による Basigin を介した血液脳関

門の一過性開口は、脳組織の細胞に薬物を効率的に送達できるデリバリーシステムとして画期的であり、様々な難治性神経疾患患者の予後改善に向けた新たな治療法戦略候補として大きく期待される。

7. 結語

マウス脳血管内皮細胞株を用いた *in vitro* 解析により、CypA はタイト結合構成分子の一つである Claudin-5 を一過性かつ可逆的に細胞膜から消失させることで、血管内皮細胞層のバリア機能を低下させること、その CypA の作用発現には CypA の受容体である Basigin を介する機序が関わることを明らかとした。また、マウスの網膜血管や神経系血管における *in vivo* 解析により、CypA の末梢静脈からの前投与によって、血液脳関門が一過性に開口し、その間に全身投与された水溶性薬物を脳組織実質へ効率的に送達させられること、さらに開いたバリアーは自発的に元の状態へ戻ることを示した。CypA による Basigin を介した血液脳関門の人為的開口は、必要な期間にのみ脳組織実質に薬物を届けることを可能とし、様々な難治性神経疾患患者の予後を改善するための新たな治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究全般にわたりご指導ご鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科病理形態学講座の池田栄二教授に深く感謝申し上げます。また、実験の遂行やデータ解析にご指導を頂きました崔丹准教授、諸事においてご協力くださいました同講座スタッフの皆様にも厚く御礼申し上げます。

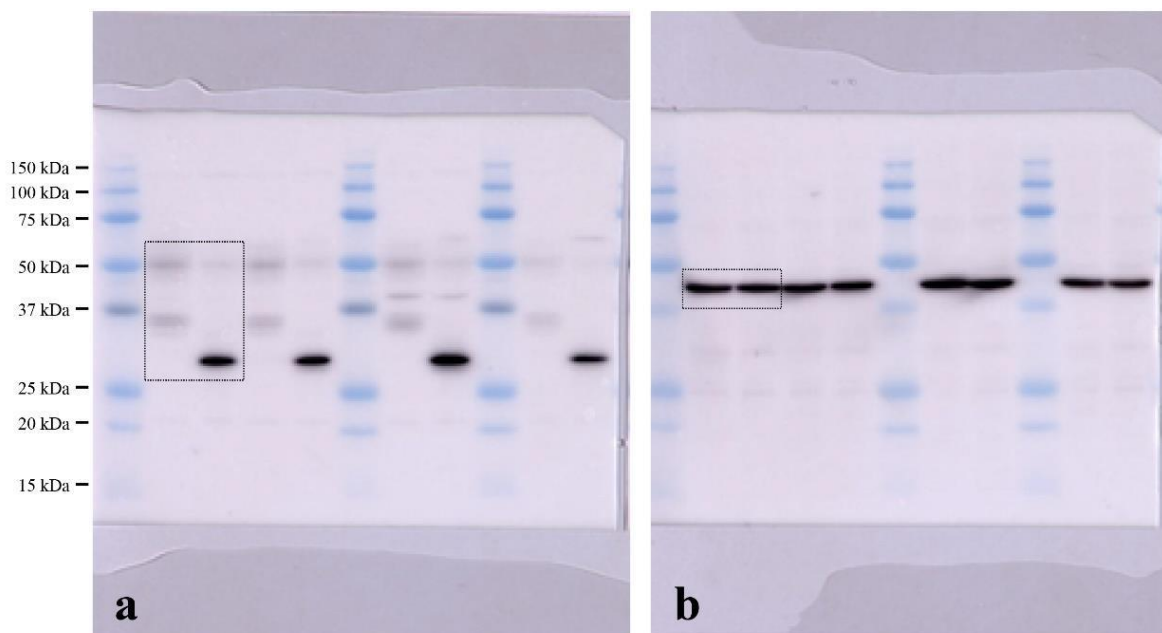
9. 参考文献

1. Luissint, AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9: 23.
2. Greene C, Campbell M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers* 2016; 4: e1138017.
3. Park TE, *et al.* Hypoxia-enhanced blood-brain barrier chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat Commun.* 2019; 10: 2621.
4. Nitta T, *et al.* Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003; 161: 653-660.
5. Koto T, *et al.* Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol.*

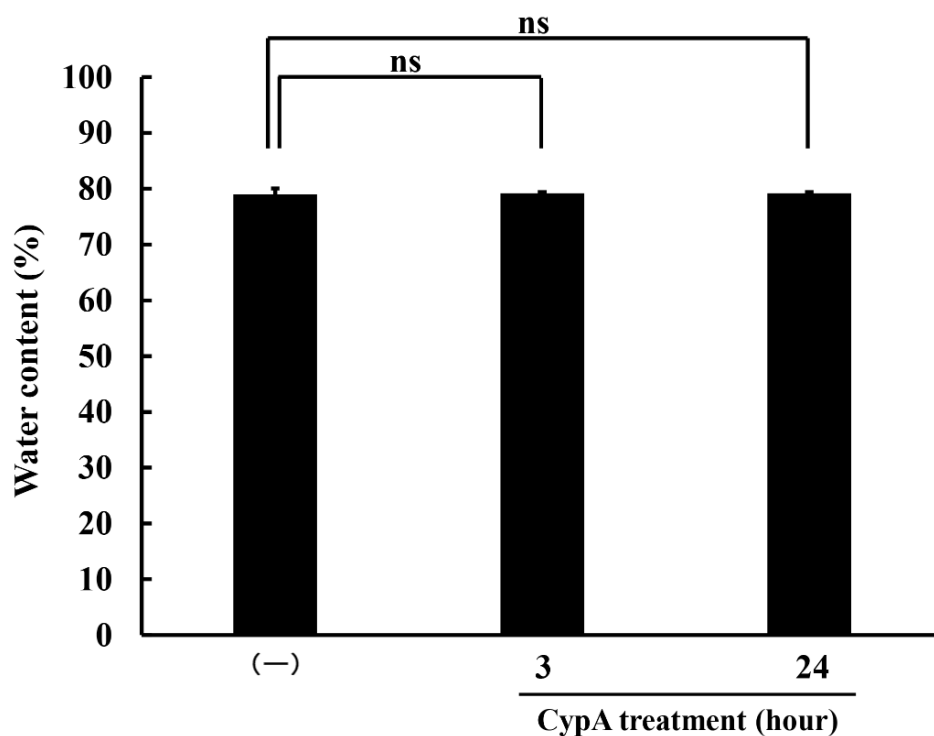
- 2007; 170: 1389-1397.
6. Cui D, *et al.* ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. *Sci Rep.* 2015; 5: 12796.
 7. Arima M, *et al.* Basigin can be a therapeutic target to restore the retinal vascular barrier function in the mouse model of diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2016; 6: 38445.
 8. Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 1989; 337: 473-475.
 9. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; 226: 544-547.
 - 1 0. Dawar FU, *et al.* Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion. *J Leukoc Biol.* 2017; 102: 989-992.
 - 1 1. Xue C, Sowden MP, Berk BC. Extracellular and intracellular cyclophilin A, native and post-translationally modified, show diverse and specific pathological roles in diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018; 38: 986-993.
 - 1 2. Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* 2006; 117: 301-309.
 - 1 3. Yurchenko V, *et al.* Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22959-22965.
 - 1 4. Shen F, *et al.* Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324: 95-102.
 - 1 5. Bredlau AL, *et al.* Localized delivery of therapeutic doxorubicin dose across the canine blood-brain barrier with hyperthermia and temperature sensitive liposomes. *Drug Deliv.* 2018; 25: 973-984.
 - 1 6. Cui D, Arima M, Hirayama T, Ikeda E. Hypoxia-induced disruption of neural vascular barrier is mediated by the intracellular induction of Fe(II) ion. *Exp Cell Res.* 2019; 379: 166-171.
 - 1 7. Song F, *et al.* Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: Direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147. *J Biol Chem.* 2011; 286: 8197-8203.
 - 1 8. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015; 282: 4067-4079.
 - 1 9. Villabona-Rueda A, Erice C, Pardo CA, Stins MF. The evolving concept of the blood brain barrier (BBB): From a single static barrier to a heterogeneous and dynamic relay center. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 405.
 - 2 0. Hornig CR, Busse O, Dorndorf W, Kaps M. Changes in CSF blood-brain barrier parameters in ischaemic cerebral infarction. *J Neurol.* 1983; 229: 11-16.
 - 2 1. Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The biphasic opening of the blood-

- brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 1985; 68: 122-129.
- 2 2. Greene C, *et al.* Dose-dependent expression of claudin-5 is a modifying factor in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2018; 23: 2156-2166.
- 2 3. Liebner S, *et al.* Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018; 135: 311-336.
- 2 4. Pan P, *et al.* Cyclosporine A alleviated matrix metalloproteinase 9 associated blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage in mice. *Neurosci Lett.* 2017; 649: 7-13.
- 2 5. Rashad S, *et al.* Early BBB breakdown and subacute inflammasome activation and pyroptosis as a result of cerebral venous thrombosis. *Brain Res.* 2018; 1699: 54-68.
- 2 6. Higashida T, *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1alpha, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2011; 114: 92-101.
- 2 7. Agrawal SM, Yong VW. The many faces of EMMPRIN-roles in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 213-219.
- 2 8. Seulberger H, Lottspeich F, Risau W. The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J.* 1990; 9: 2151-2158.
- 2 9. Yurchenko V, Constant S, Eisenmesser E, Bukrinsky M. Cyclophilin-CD147 interactions: A new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin Exp Immunol.* 2010; 160: 305-317.
- 3 0. Bukrinsky M. Extracellular cyclophilins in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 2087-2095.
- 3 1. von Ungern-Sternberg SNI, Zerneck A, Seizer P. Extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN (CD147) in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 25.
- 3 2. Dong X. Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* 2018; 8: 1481-1493.

10. 補足データ



補足図 S1 : 図 1a における PVDF 転写膜の完全長に相当する画像。四角で囲まれた画像の一部 (a, Basigin; b, β -actin) を図 1a 用に加工して用いた。



補足図 S2 : 図 4 において CypA を静脈内投与したマウスの脳の水分量。CypA 未投与および投与したマウスの脳の湿重量と乾燥重量を測定し、浮腫の形成を評価した。CypA 投与マウスの脳の水分量 ($100 \times (\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量}$) は、投与後 3 時間と 24 時間で有意な増加は認められなかった。データは独立した 3 回の実験の平均値 \pm SD で示した。ns, not significant.