

学位論文（博士）

**Exploring lipophilic compounds  
that induce BDNF secretion in astrocytes  
beyond the BBB  
using a new multi-cultured human *in vitro* BBB model**  
(ヒト *in vitro* BBB モデルを用いたアストロサイト  
からの BDNF 分泌を促進させる脂溶性化合物の同定)

氏名 藤澤 美和子

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 臨床神経学講座

令和3年2月

## 目 次

1. 緒言	3
2. 要旨	6
3. 目的	7
4. 材料・方法	7
5. 結果	9
6. 考察と今後の展望	14
7. 結語	18
8. 謝辞	19
10. 参考文献	19

## 緒言

### 血液脳関門の概念

血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) は中枢神経 (central nervous system: CNS) の恒常性に重要な役割を担っている。BBB は脳微小血管内皮細胞 (endothelial cell: EC) とアストロサイト (astrocyte: AST), ペリサイト (pericyte: PCT) から構成される。EC はその外側を基底膜, PCT, AST に覆われている。AST はエンドフットを伸ばし, グリアリミタンス層を形成し物理的なバリアの一端を担っている。BBB のバリアの本体は特殊な構造と機能を持つ微小血管内皮細胞そのものであり, タイトジャンクション (tight junction: TJ) により EC 間は強固な接着をしている。BBB では, 不要な物質の CNS への流入を制限し, 必要な物質の CNS への移行を促進している (Engelhardt and Sorokin, 2009; Pardridge, 2007)。脳と循環血液間の物質輸送は, 脂溶性物質の自由拡散と経細胞的輸送 (transcellular transport) がある。分子量が 400Da 未満で, 水素基が 8 未満の物質は自由拡散により CNS への移行が比較的容易とされている (Pardridge, 2007)。Transcellular transport は大きく 3 つに分類され, carrier-mediated transport, active efflux transport, receptor-mediated transport があり, 厳密な制御がなされている (Pardridge, 2007)。AST と PCT は TJ をもたず, BBB の実体とはならないが, 成長因子, 神経栄養因子, 血管新生因子といった物質を分泌し, BBB 機能維持に関わっている (Abbott, 2002; Dohgu et al., 2005; Michinaga and Koyama, 2019; Shen et al., 2019; Shimizu et al., 2011b; Shimizu et al., 2012; Zhang et al., 2002; Zlokovic, 2008)。EC のみでは BBB は成立せず, EC が PCT と AST との相互作用 (クロストーク) をおこなうことが, BBB 形成に必要である (Abbott et al., 2010; Zlokovic, 2008)。

### 従来の *in vitro* BBB モデルの課題と新規モデルの確立

BBB の機能を詳細に解析するためには, *in vitro* 実験系の確立が必要である。BBB の根幹を担う脳微小血管内皮細胞は, *in vitro* モデルにした後, 継代を重ねる度に BBB 機能を損な

う。初代培養が最も BBB の機能を保持しており、ラット、マウス、ブタ、ウシから作成された初代培養細胞がよく使用されている (Wilhelm and Krizbai, 2014)。ヒト由来の脳微小血管内皮細胞の初代培養細胞は、健常ヒト検体を得にくいこと、ヒト組織であることによる取り扱いの困難さ、作成・維持にコストと技術を要することから汎用されていない。しかし、脳微小血管内皮細胞に発現する受容体には種差があることが判明しており (Pardridge, 2007)、ヒト由来の細胞株による *in vitro* モデルが望ましい。特に、創薬を念頭にした検討にはヒト由来であることが必要である。適切な EC 細胞株を得ることが課題であったが、当教室では、熱不安定性変異体シミアンウイルス 40 (simian virus 40: SV40) の温度感受性 tsA58 ラージ T 抗原遺伝子を導入した温度条件不死化ヒト由来脳微小血管内皮細胞株を樹立に成功した (Sano et al., 2010)。この細胞株では、33°C 下で SV40 ラージ T 抗原遺伝子 (SV40-LT) の発現が誘導され、腫瘍抑制因子である p53 や Rb に結合阻害することで細胞を不死化させる。一方、37°C 下では SV40-LT は代謝分解されることで不活化し、成熟血管内皮細胞に分化する。樹立した血管内皮細胞株では、内皮細胞は紡錘形をとり、von Willebrand 因子や TJ に関連する分子の発現が確認できた。また、経内皮電気抵抗値 (Transendothelial electrical resistance: TEER) は既存の内皮細胞株や、脳微小血管内皮細胞の代替として使用されることがあるヒト臍帯静脈内皮細胞と比較して高いことが示されている。当教室では EC 同様に、PCT (Shimizu et al., 2011a)、AST (Haruki et al., 2013) の細胞株の樹立にも成功している。

従来モデルでのもう一つの課題としては、BBB 構成細胞の 3 つの細胞間のクロストークを再現したモデルがなかったことがある (Wilhelm and Krizbai, 2014)。現在、コマーシャルベースで販売され使用されている 3 種細胞による BBB モデルでは、小孔をもつインサート膜を挟んで EC と PCT が培養され、lower chamber の底面に AST が培養されている (Nakagawa et al., 2009)。このモデルでは、AST と EC、PCT 間に距離があるために、エンドフットから成るグリアリミタンス層による物理的バリアや各細胞間の接触によりもたらされる影響がバリア機能に反映されず、*in vitro* の BBB とはかけ離れたモデルとなるという懸念がある。そ

ここで当教室では、温度によって親水性/疎水性の性質が変化するポリマー (UpCell™) を利用して EC をシート状に剥離し、PCT 上に載せることで 3 種の細胞が接触しうる 3 層構造の構築に成功した (Takeshita et al., 2021, Japanese Patent No.2016-081995). UpCell™ 表面には 20°C で疎水性となり、37°C で親水性となるポリマーが塗布されている。UpCell™ 表面に EC を 37°C で培養した後、20°C にすることでシート状に EC を剥離できる。インサート膜の管腔側に PCT, 反管腔側に AST を培養させた後、PCT 上に EC シートを載せることで 3 層構造の構築が可能となった。

#### 新規治療標的としての脳由来神経栄養因子への着目

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は神経細胞の維持、増殖、分化に関わる (Allen et al., 2013; Zhao et al., 2017)。BDNF はアルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、Rett 症候群、統合失調症、うつ病といった神経変性疾患 (Allen et al., 2013) や多発性硬化症といった免疫疾患 (Lee et al., 2012; Linker et al., 2010)、外傷性脳損傷、脳卒中 (Zhao et al., 2017) で神経保護的に作用することが知られている。そのため、BDNF は多様な中枢神経疾患の治療薬になることが見込まれているが、BDNF 自体は約 14kDa と分子量が大きく BBB を通過して CNS に到達できず、治療薬への汎用が阻まれている。一方で、脂溶性物質は BBB を比較的容易に通過可能である (Pardridge, 2007)。そこで、BBB を容易に通過した後、AST や PCT に作用して BDNF の分泌を促進するような脂溶性物質があれば治療薬開発につながると考えた。しかしながら、今まではヒト由来 EC と PCT, AST それぞれが接触して 3 層構造をとる *in vitro* モデルが存在しなかったため、BBB の PCT, AST に対して BDNF 分泌を促進しうる化合物の検討は困難であった。しかし、当教室では前述のように、この課題を解きうる *in vitro* BBB モデルを有しており、多様な化合物の BBB に対する影響のスクリーニングが可能である (Takeshita et al., 2021)。

## 本研究の目的

本研究では、当教室で確立した *in vitro* ヒト BBB モデルを使用して、BBB の破綻によらずに PCT や AST からの BDNF 分泌を促進する脂溶性化合物の同定を目的とした。当教室での *in vitro* ヒト BBB モデルで BDNF の分泌機能が測定可能であることを確認した後、3 種の単層培養、各 2 種培養、3 層培養での BDNF 分泌を促進する脂溶性化合物を同定した。また、TEER を測定し、同定した脂溶性化合物によってバリア機能が変化するかを検討した。以下、得られた研究結果について詳述する。

## 要旨

脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、中枢神経内での恒常性や神経発達に重要な役割を果たしており、神経変性疾患や神経免疫疾患の治療薬への応用が期待されている。しかし、BDNF 自体は分子量が大きく、末梢に投与した BDNF は血液脳関門 Blood-brain barrier (BBB) を通過して中枢神経内に作用することができない。一方で脂溶性化合物は BBB を通過しやすいとされている。そこで、BBB を超えてアストロサイトに作用し、アストロサイトから BDNF 分泌を促進する脂溶性化合物の同定を試みた。温度条件不致死ヒト脳血管内皮細胞 (EC)、ペリサイト (PCT)、アストロサイト (AST) の BBB *in vitro* モデルに 20 種類の脂溶性化合物を反応させ、48 時間後に BDNF の分泌量を ELISA で測定した。脂溶性化合物を EC/AST co-culture に 72 時間反応させながら電気抵抗値を測定した。その結果、prostaglandin E2 receptor 4 agonist (EP4) と sphingosine-1-phosphate receptor 5 agonist (S1P5) が EC、PCT の有無にかかわらず AST からの BDNF を有意に促進させ、電気抵抗値の低下は伴わなかった。このことから EP4 と S1P5 は BBB へ影響を与えずに AST からの BDNF 分泌を促進したと考えられた。S1P5 は進行型多発性硬化症治療薬であるシポニモドの標的の 1 つである。シポニモドの神経保護作用は S1P5 を介した AST からの BDNF が関与している可能性が考えられた。AST での EP4 の機能は未だ不明な点が多いが、BDNF

分泌を促進することで神経保護に関与する可能性がある。いずれの化合物も治療薬への発展が期待される。

## 目的

温度感受性不死化ヒト EC, PCT, AST から成る *in vitro* ヒト BBB モデルを使用し、併せて TEER を測定し、BBB バリア破綻を伴わずに PCT や AST からの BDNF 分泌を促進する脂溶性化合物を同定することを目的とした。

## 材料・方法

### 1. 試薬

EC の培地は、Lonza 社 (Basel, Switzerland) の EGM-2 BulletKit に 20%の非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) を加え、抗生物質としてペニシリン (100 U/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加したものを使用した。AST の培地は、アストロサイトメディア (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) に 10%FBS, ペニシリン (100 U/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加したものを使用した。アストロサイトメディアは共培養時の培地としても使用した。PCT は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に 10%FBS, ペニシリン (100 U/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を添加したものを培地として使用した。脂溶性化合物 (prostaglandin E2 receptor agonists [EP1-4 agonists], prostaglandin D2 agonist [DP agonist], prostaglandin F2<sub>α</sub> agonist [FP agonist], prostaglandin I2 agonist [IP agonist], thromboxane A2 agonist [TP agonist], sphingosine-1-phosphate receptor agonists [S1P1-5 agonists], S1P3 antagonist, S1P5 inverse agonist, lysophosphatidic acid agonists [LPA1-3, 5 agonists], and LPA1 antagonist) は小野薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) より提供された。ヒドロコルチゾン は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) のものを使用した。

## 2. 細胞培養

以前我々の研究室で樹立した、温度感受性不死化細胞株の EC (Sano et al., 2010; Sano et al., 2013), PCT (Shimizu et al., 2011a), AST (Haruki et al., 2013) を使用した。細胞は 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の 33°C の湿潤なインキュベーター内で保管した。すべての検討前には、細胞を 37°C インキュベーターの環境下に 48 時間置いた。

## 3. EC/AST, EC/PCT, EC/PCT/AST 共培養

EC と AST もしくは PCT との 2 細胞での共培養の場合 (EC/AST, EC/PCT) は、まず AST または PCT の細胞懸濁液を径 0.4µm の小孔が多数開いているポリカーボネイト膜をもつインサート (Corning, Manassas, VA) の底面外側 (反管腔側) に滴下し、1 時間静置する。その後、インサート内の底面 (管腔側) に EC 細胞懸濁液を入れ、33°C 下で培養する。コンフルエントになったことを確認後、37°C 下で 48 時間静置し検討に使用した。3 細胞での共培養の方法は既報告 (Takeshita et al., 2021) に準じた。

## 4. ELISA

Lower chamber 内に移行した BDNF の濃度は ELISA (Abcam, Cambridge, MA) で測定した。1 サンプルあたり 3 回ずつ測定をおこなった。

## 5. TEER 測定

EC/AST 共培養したインサート内に、0.1% になるように EP4 agonist (1µL), もしくは SIP5 agonist (1µL) をジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide: DMSO) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で希釈したものと、コントロールとして DMSO のみ 1µL を添加し、CellZscope® (nanoAnalytics, UK) のモジュール内に設置し、3 日間の電気抵抗値を測定した。1 サンプルあたり 4 つずつインサートを用意し、3 回繰り返し同実験を

おこない、再現性を確認した。

## 6. 統計解析

対応のない *t* 検定, 2 元配置分散分析を用い,  $P < 0.05$  であった場合を有意差があると判断した。統計解析は IBM SPSS Statistics (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA), JMP version 11.2.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用した。

## 結果

### 1. ヒドロコルチゾンによる PCT, AST からの BDNF 分泌の促進

PCT や AST からの BDNF 分泌を促進する物質のポジティブコントロールがなかった。そこで我々は、ヒドロコルチゾンに着目した。ヒドロコルチゾンは BBB のタイトジャンクションを構成する蛋白の発現を促進したり (Salvador et al., 2014), BBB の安定性に関わる血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) や血管新生因子 (Angiopoietin-1: Ang-1) の AST や PCT からの分泌を促進したりすることがわかっていたため (Kim et al., 2008), PCT や AST からの BDNF 分泌にもヒドロコルチゾンが関与していると推測した。濃度の異なるヒドロコルチゾン ( $276 \times 10^2$  nM,  $276 \times 10^3$  nM,  $276 \times 10^4$  nM) を PCT または AST に 24 時間と 48 時間作用させた。その後、培地を回収し ELISA で BDNF 濃度を測定すると、 $276 \times 10^4$  nM のヒドロコルチゾンを 48 時間反応させた場合が最も BDNF 濃度が高値であった (Fig. 1A, B)。ヒドロコルチゾンの BDNF 分泌への作用は、反応時間依存的、濃度依存的であった。これらのことから、我々は以後の実験で  $276 \times 10^4$  nM のヒドロコルチゾンを 48 時間反応させることをポジティブコントロールとして設定した。

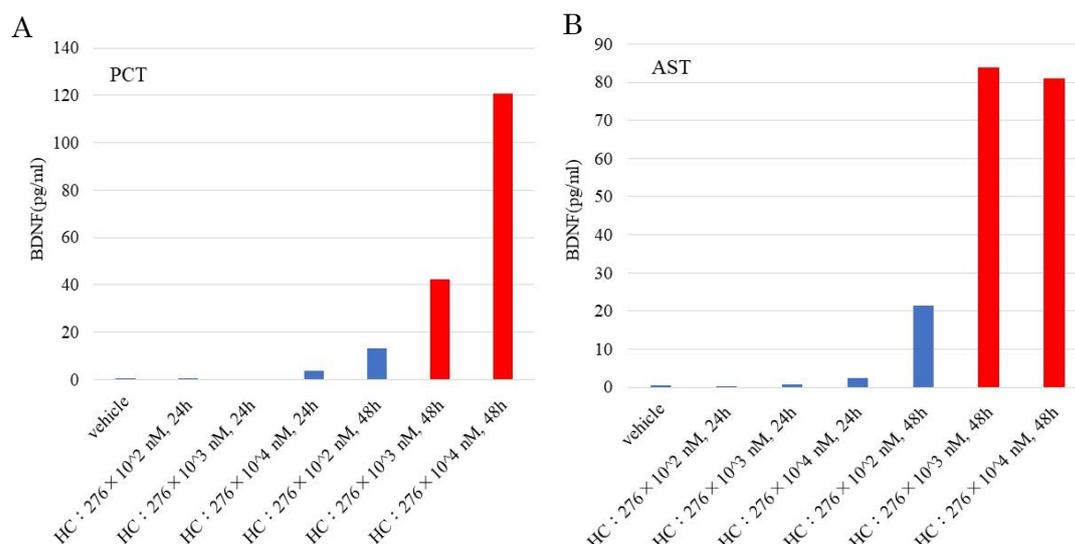


Fig. 1. ヒドロコルチゾンの PCT (A) と AST (B) への BDNF 分泌促進作用

異なる濃度と反応時間でのヒドロコルチゾンの PCT (A) と AST (B) への BDNF 分泌促進作用を ELISA で BDNF 濃度を測定することで検討した。PCT, AST いずれも  $276 \times 10^4$  nM のヒドロコルチゾンを 48 時間反応させた場合が最も BDNF 分泌が高かった。ヒドロコルチゾンの BDNF 分泌への作用は濃度依存的, 反応時間依存的な変化を示した。

AST, astrocyte cell line; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HC, hydrocortisone; PCT, pericyte cell line.

## 2. PCT と AST からの BDNF 分泌を促進する脂溶性化合物の同定

20 種の脂溶性化合物を DMSO で希釈した。DP agonist, EP agonists, IP agonist, FP agonist は 50%阻害濃度 (the half maximal inhibitory concentration: IC50) の 10 倍, 100 倍濃度とし, TP agonist は Ki (阻害定数) をもとに濃度を設定した。S1P agonist と LPA agonist は 1  $\mu$ M とした。脂溶性化合物が 0.1%DMSO になるように FBS を含有していないアストロサイトメディアに添加し, コンフルエントになった PCT, AST に 48 時間反応させた。その後, 培地内の BDNF 濃度を ELISA で測定した。EP1-3 agonist, DP agonist, S1P2 agonist, S1P5 inverse agonist,

LPA1, 3, 5 agonist, LPA1, 2 antagonist はコントロールと比較し PCT からの BDNF 分泌をより促進した (Fig. 2A). EP3 agonist, DP agonist, LPA2 antagonist を除き 17 種の脂溶性化合物はコントロールと比較し AST からの BDNF 分泌をより促進した (Fig. 2B).

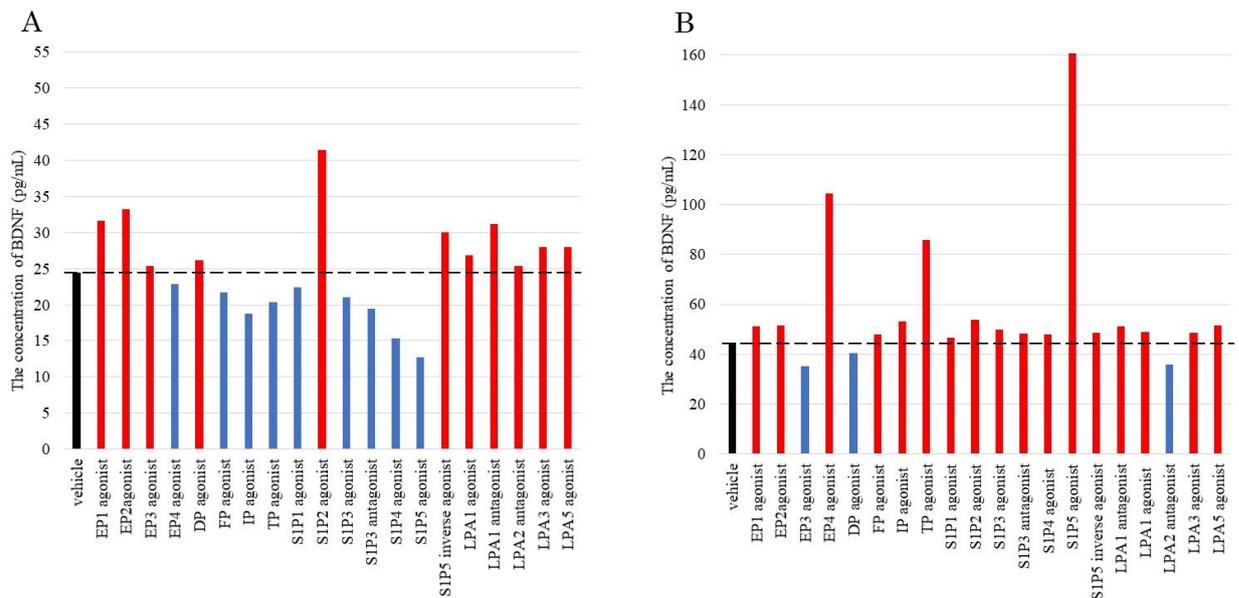


Fig. 2. PCT, AST からの BDNF 分泌への脂溶性化合物の影響

PCT (A), AST (B) からの BDNF 分泌への 20 種の脂溶性化合物の作用を示す。

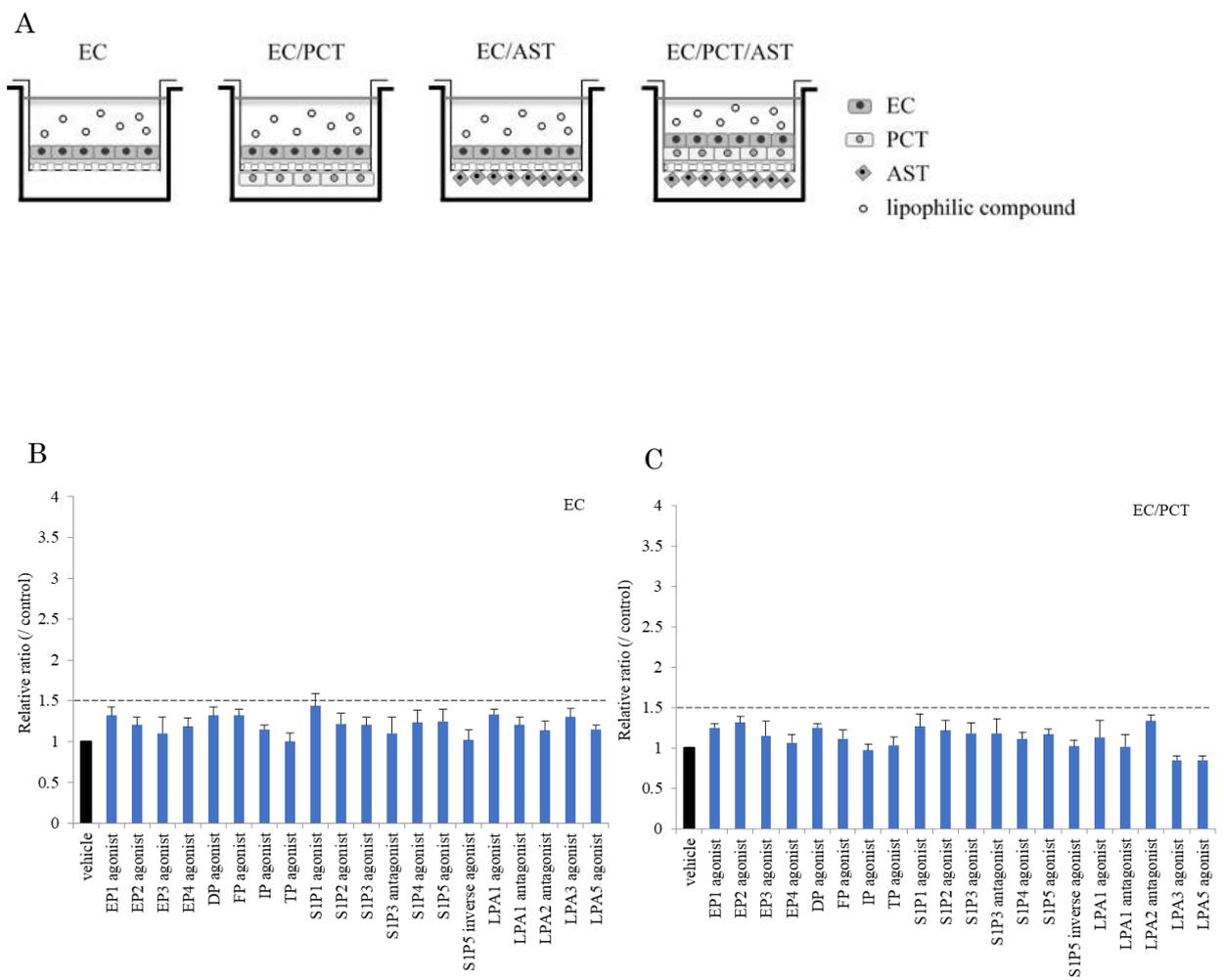
AST, astrocyte cell line; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DP, prostaglandin D2 agonist; EP, prostaglandin E2 receptor; FP, prostaglandin F2 $\alpha$  agonist; IP, prostaglandin I2 agonist; LPA, lysophosphatidic acid agonist; PCT, pericyte cell line; S1P, sphingosine-1-phosphate receptor; TP, thromboxane A2 agonist.

### 3. EP4 agonist と S1P5 agonist の EC/AST 共培養, EC/PCT/AST3 層培養での BDNF 分泌促進作用

PCT, AST と同様に EC 単培養でも脂溶性化合物をそれぞれ反応させた。いずれの脂溶性化合物もコントロールと比較し 1.5 倍以上の BDNF 分泌はみられなかった (Fig. 3B)。我々

は BBB への影響なく, PCT や AST に作用して BDNF 分泌を促す脂溶性化合物の同定を目的としていたため, コントロールとの相対値 1.5 をカットオフ値に設定した.

続いて, EC/PCT, EC/AST, EC/PCT/AST 共培養 (Fig. 3A) でも同様に 17 種の脂溶性化合物を反応させた. EC/PCT 共培養ではコントロールと比較して 1.5 倍以上の BDNF 分泌を示す脂溶性化合物はなかった (Fig. 3C). 一方で, EC/AST 共培養 (Fig. 3D) と EC/PCT/AST3 層培養 (Fig. 3E) では, EP4 agonist と S1P5 agonist がコントロールと比較し 1.5 倍以上の BDNF 分泌を示し, 統計的にも有意に BDNF 分泌を促進していた.



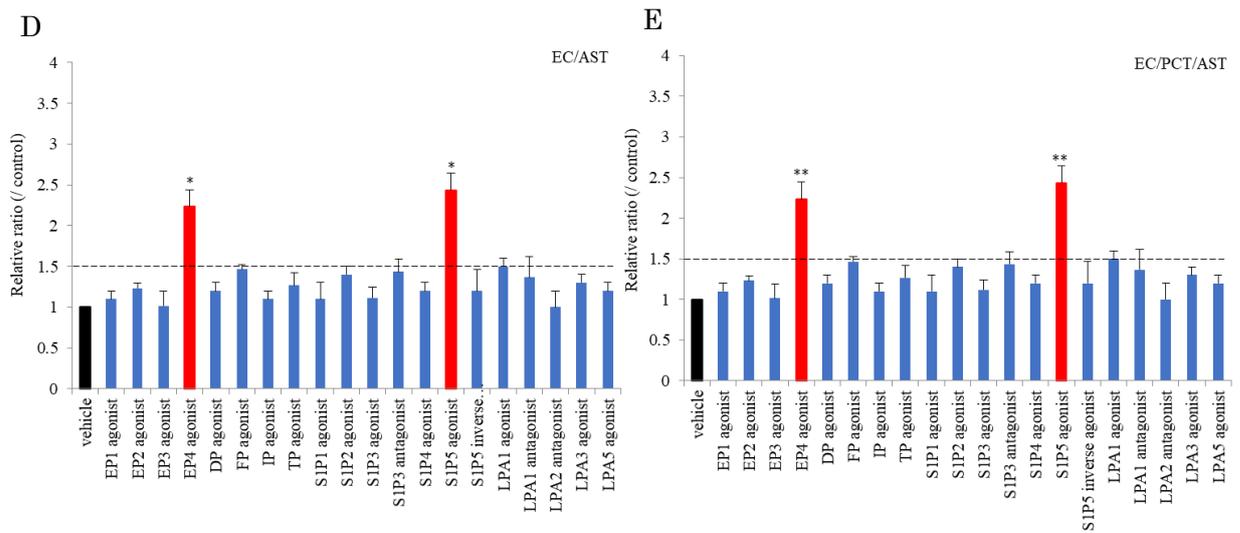


Fig. 3. 脂溶性化合物の EC 単培養, EC/PCT, EC/AST, EC/PCT/AST 共培養での BDNF 分泌への作用

EC 単培養, EC/PCT, EC/AST, EC/PCT/AST 共培養のシェーマを示す (A).

EC 単培養 (B) と EC/PCT 共培養 (C) では 17 種の脂溶性化合物の中にコントロールの 1.5 倍以上 BDNF 分泌を促進するものはなかった。EC/AST (D), EC/PCT/AST (E) 共培養では, EP4 agonist, S1P5 agonist がコントロールの 1.5 倍以上の BDNF を分泌させた。

(Statistics: unpaired *t* test) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

AST, astrocyte cell line; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DP, prostaglandin D2 agonist; EC, endothelial cell line; EP, prostaglandin E2 receptor; FP, prostaglandin F2<sub>α</sub> agonist; IP, prostaglandin I2 agonist; LPA, lysophosphatidic acid agonist; PCT, pericyte cell line; S1P, sphingosine-1-phosphate receptor; TP, thromboxane A2 agonist.

#### 4. EP4 agonist と S1P5 agonist の TEER への影響

EC/AST 共培養に EP4 agonist, S1P5 agonist をそれぞれ反応させながら, 経時的 TEER 変化を cellZscope<sup>®</sup>で測定した。EP4 agonist, S1P5 agonist を反応させたインサートの TEER はコントロールと比較して有意な差はなかった (Fig. 4)。

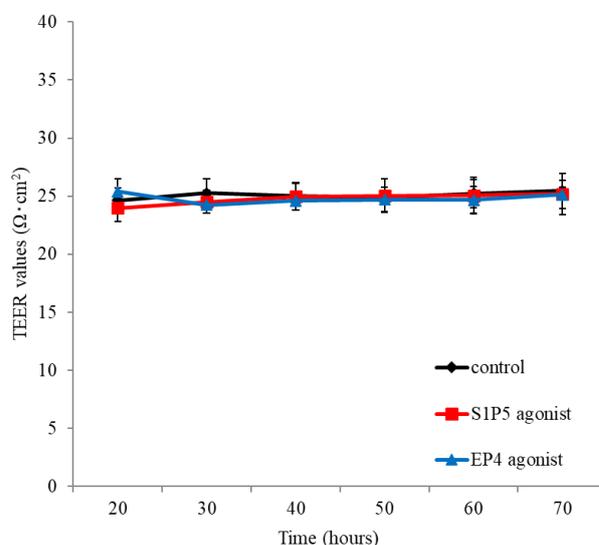


Fig. 4. EP4 agonist, S1P5 agonist の TEER への影響

EP4 agonist, S1P5 agonist を反応させたインサートの TEER はコントロールと比較して有意な差はみられなかった. (Statistics: two-way ANOVA with repeated measures).

EP4, prostaglandin E2 receptor 4; S1P5, sphingosine-1-phosphate receptor 5; TEER, transendothelial electrical resistance.

## 考察と今後の展望

我々の研究室では、温度条件不活化ヒト内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトがそれぞれに接触を有し 3 層構造をとる *in vitro* BBB モデルを作成した (Takeshita et al., 2021). 本研究では、このモデルを使用し、20 種の脂溶性化合物のスクリーニングをおこない、EP4 agonist と S1P5 agonist が AST からの BDNF 分泌を促進することが判明した. これら 2 つの脂溶性化合物は EC/AST 共培養と EC/PCT/AST3 層培養では BDNF 分泌を促進したが、EC/PCT 共培養では BDNF 分泌は促進されなかった. さらに、これら 2 つの脂溶性化合物を反応させた EC/AST 共培養の TEER はコントロールと比較し有意に変化することはなかった. これ

らの結果から, EP4 agonist と S1P5 agonist は BBB 破綻を伴わずに AST からの BDNF の分泌を促すと考えられた.

S1P は, 細胞膜の主要成分であるスフィンゴミエリンから生成され, 生理活性を有するスフィンゴ脂質である. S1P 受容体は G 蛋白共役リゾリン脂質受容体で, S1P シグナルは, 細胞の生存や増殖, 運動性, 分化といった全身の機能を制御している. S1P 受容体は 5 つのサブタイプから成り (S1P1-5), 全身に発現している. S1P 受容体は多発性硬化症の治療薬であるフィンゴリモドやシポニモドの標的となっている. フィンゴリモドは主に S1P1 受容体に対するアゴニストであり (Brinkmann et al., 2002), シポニモドは選択的な S1P1 受容体と S1P5 受容体に対するアゴニストであることが知られている (Briard et al., 2015). シポニモドは進行性多発性硬化症で神経変性が進むことを阻害し, 二次進行性多発性硬化症の経口内服治療薬として初めて承認された (Kappos et al., 2018). 一方で, フィンゴリモドの神経細胞に対する直接的な作用について判明していることは限定的である (Miron et al., 2008). S1P5 受容体に対する作用がシポニモドとフィンゴリモドとの大きな違いである. S1P5 受容体はオリゴデンドロサイトに多く発現しており (Jaillard et al., 2005; Miron et al., 2008), S1P5 は成熟オリゴデンドロサイトがアポトーシスに陥ることを防ぎ (Jaillard et al., 2005; Miron et al., 2008), 再髄鞘化を促進する役割を担っていると考えられている (Jackson et al., 2011)

(Fig. 5). しかし, AST や PCT での S1P5 シグナル経路がどのように機能しているのかは未だ明らかとなっていない. 本研究では, S1P5 agonist が AST での BDNF 分泌を促すことが判明した. AST に S1P5 受容体が発現していることは明らかとなっており (Rao et al., 2004; Yu et al., 2004), そのため S1P5 agonist が AST に直接的に作用しうるとは考えられる. 既報告では, BDNF は神経細胞の生存に関与していると示されており (Allen et al., 2013; Zhao et al., 2017), これらの結果から, AST での S1P5 シグナルが BDNF を介して神経保護に作用することが推測された. この作用がシポニモドの二次進行性多発性硬化症への効果をもたらしている可能性が考えられる. BDNF は神経変性疾患や脳血管障害など多様な疾患で神経保護

に働くため, S1P5 agonist はこれらの疾患に対する治療薬になることも期待される。

EP4 は、プロスタグランジン E2 (PGE2) によって活性化される G 蛋白共役 E プロスタノイド受容体である (Narumiya et al., 1999)。EP 受容体は EP1-4 の 4 種類のサブタイプから成る。EP1 受容体は  $G\alpha_q$  を介して細胞内のカルシウムイオン濃度を上げ, EP3 受容体は  $G\alpha_i$  を介して cAMP (cyclic adenosine monophosphate) の産生を抑制する。EP2 受容体と EP4 受容体はいずれも  $G_{\alpha s}$  を介し, cAMP の産生を促す (Tsuge et al., 2019)。中枢神経に対して PGE2-EP4 経路は有益にも有害にもなり, 発現される作用は細胞の種類や病態によって異なる。例えば, ミクログリアでの EP4 受容体はファゴサイトーシスを誘導し, アミロイド  $\beta$  のクリアランスを促す (Woodling et al., 2014)。さらに, 炎症に関わる COX-2, iNOS (Shi et al., 2010), interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , chemokine (C-C motif) ligand 3, gp91<sup>phox</sup> (Bonfill-Teixidor et al., 2017; Shi et al., 2010; Woodling et al., 2014) の発現を抑制する。これらの作用により, アルツハイマー型認知症やパーキンソン病といった神経変性疾患の進行を抑えたと考えられている (Shi et al., 2010; Woodling et al., 2014)。内皮細胞での EP4 受容体シグナルは BBB の透過性を低下させる働きを持つ occludin の発現を増加させたり (Demars et al., 2018), 血管平滑筋を弛緩させ中枢神経循環血液量を増加させる e-NOS の発現を促したりする (Xu et al., 2017)。そのため EP4 agonist は脳卒中の病変部位縮小効果が見込まれている。脳卒中後, 神経細胞の EP4 の発現は増加し (Liang et al., 2011), 神経細胞死を妨げ (Xu et al., 2017), 神経血管連関を介して血管を拡張させることで (Czigler et al., 2020) 脳卒中病変の拡大が抑えられる。しかし, EP4 シグナルは神経毒性も有する。ナイーブ T 細胞の EP4 は, Th1 細胞の分化や Th17 細胞の増殖を促進し (Kawahara et al., 2015), 樹状細胞の EP4 は IL-23 の分泌を促し Th17 の増殖を加速させる (Kawahara et al., 2015)。T 細胞や単球での EP4 は MMP9 (matrix metalloproteinase-9) の発現が亢進し, BBB を通過し CNS への移行が促進される (Schiffmann et al., 2014)。これらの作用が多発性硬化症の病態に関与している。AST に EP4 受容体は発現していることは判明しているが (Bonfill-Teixidor et al., 2017, Choi et al., 2006),

機能についてはほとんどわかっていない。一般的に、EP4 は二つの主要なリン酸化酵素を介したシグナリングの活性化に関与していることが知られている。EP4 は G 蛋白のひとつである Gs を活性化し、アデニル酸シクラーゼと環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate: cAMP) の産生を促す。cAMP は protein kinase A (PKA), phosphorylates cAMP-response element-binding protein (CREB) を活性化する (Yokoyama et al., 2013)。加えて、EP4 は cAMP 依存性シグナル伝達と、それに引き続く phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の活性化にも関与している。神経細胞、特に海馬や皮質では、BDNF の分泌は CREB により制御されている。CREB は PI3K や PKA, protein kinase C といった多様なリン酸化経路によってリン酸化・活性化される (Walton et al., 2000)。したがって、AST での EP4 も CREB を介したシグナル伝達によって BDNF 分泌を促進している可能性が考えられる。この CREB-BDNF シグナル経路が障害されることは、アルツハイマー型認知症といった神経変性疾患の病態に関わっている。βアミロイド (Aβ) は CREB-BDNF 経路の活性化を抑制し (Rosa et al., 2015), それによりシナプスが消失したり、神経変性を起こしたりすると考えられている (Allen et al., 2011)。一方で、BDNF を反応させることで、Aβ による神経毒性を抑えることが示されている (Arancibia et al., 2008)。このように EP4 シグナルには有効性と有害性の二面性を有しており、その二面性の制御機構については未だ明らかとなっていないが、本研究より AST の EP4 シグナルが BDNF 分泌を促すことで神経保護に寄与することが推測されるため、EP4 agonist も様々な神経疾患の治療薬につながる可能性はある。

本研究では、S1P5 agonist と EP4 agonist が BDNF の分泌を促進することを示しているが、この BDNF 分泌促進がどういったシグナル伝達経路を介したのかについては検討していない。加えて S1P5 agonist と EP4 agonist が BDNF 以外に TNF-α といった他の因子の分泌に影響を与えるか否かについては検討していない。したがって、これらについては今後検討していく予定である。

## 結語

本研究では, S1P5 agonist と EP4 agonist が BBB の破綻を伴わず BBB を構成するアストロサイトに直接的に作用し, アストロサイトからの BDNF 分泌を促進させることが判明した. このことから S1P5 agonist と EP4 agonist が中枢神経疾患の治療薬となる可能性が考えられる. BDNF 分泌促進に関わる経路には未だ明らかとなっていないことが多いが, S1P5 agonist と EP4 agonist による BDNF 分泌促進システムの詳細が今後解明されることで S1P5 agonist と EP4 agonist を用いた新規治療薬の開発につながることを期待される.

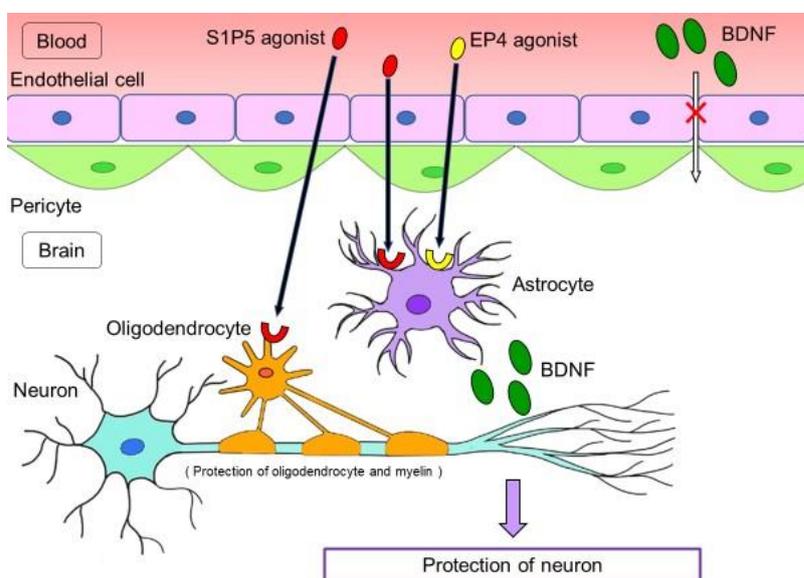


Fig. 5. 血中の BDNF は BBB を通過し CNS へ作用することは困難であるが, 脂溶性化合物である EP4 agonist と S1P5 agonist は BBB を通過し, アストロサイトからの BDNF 分泌を促すことで神経保護に働くことが予想された.

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; EP4, prostaglandin E2 receptor 4; S1P5, sphingosine-1-phosphate receptor 5.

## 謝辞

本研究に際し、実験の遂行・データ分析・論文作成をご指導頂いた竹下幸男先生、実験の遂行・データ分析にご協力頂いた藤川晋先生、松尾欣哉先生、清水文崇先生、佐野泰照先生、本研究にあたり統括・ご指導・ご教鞭を賜りました神田隆先生に深謝申し上げます。

## 参考文献

- Abbott, N.J. 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629-638. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37: 13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., Patel, N.K. 2013. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* 138, 155-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>.
- Allen, S.J., Watson, J.J., Dawbarn, D. 2011. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol.* 9, 559-573. <https://doi.org/10.2174/157015911798376190>.
- Arancibia, S., Silhol, M., Moulière, F., Meffre, J., Höllinger, I., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L. 2008. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis.* 31, 316-326. doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.012.
- Bonfill-Teixidor, E., Otxoa-de-Amezaga, A., Font-Nieves, M., Sans-Fons, M.G., Planas, A.M. 2017. Differential expression of E-type prostanoid receptors 2 and 4 in microglia stimulated with lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation.* 14, 3. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0780-7>.
- Briard, E., Rudolph, B., Desrayaud, S., Krauser, J.A., Auberson, Y.P. 2015. MS565: A SPECT Tracer for Evaluating the Brain Penetration of BAF312 (Siponimod). *ChemMedChem.* 10, 1008-1018. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500115>.
- Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C.A., Zollinger, M., Lynch, K.R. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 21453-21457.

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200176200>

- Choi, J.S., Kim, H.Y., Chun, M.H., Chung, J.W., Lee, M.Y. 2006. Expression of prostaglandin E2 receptor subtypes, EP2 and EP4, in the rat hippocampus after cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Cell Tissue Res.* 324, 203-211. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-0121-0>.
- Czigler, A., Toth, L., Szarka, N., Szilágyi, K., Kellermayer, Z., Harci, A., Vecsernyes, M., Ungvari, Z., Szolics, A., Koller, A., Buki, A., Toth, P. 2020. Prostaglandin E2, a postulated mediator of neurovascular coupling, at low concentrations dilates whereas at higher concentrations constricts human cerebral parenchymal arterioles. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 146, 106389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106389>.
- DeMars, K.M., McCrea, A.O., Siwarski, D.M., Sanz, B.D., Yang, C., Candelario-Jalil, E. 2018. Protective Effects of L-902,688, a Prostanoid EP4 Receptor Agonist, against Acute Blood-Brain Barrier Damage in Experimental Ischemic Stroke. *Front. Neurosci.* 12, 89. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2018.00089>
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., Kataoka, Y. 2005. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 1038, 208-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.027>.
- Engelhardt, B., Sorokin, L. 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* 31, 497-511. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- Haruki, H., Sano, Y., Shimizu, F., Omoto, M., Tasaki, A., Oishi, M., Koga, M., Saito, K., Takahashi, T., Nakada, T., Kanda, T. 2013. NMO sera down-regulate AQP4 in human astrocyte and induce cytotoxicity independent of component. *J. Neurol. Sci.* 331, 136-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.05.035>.
- Jackson, S.J., Giovannoni, G., Baker, D. 2011. Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. *J Neuroinflammation.* 8, 76. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-8-76>.
- Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, Aigrot MS, Calver AR, Duddy G, Walsh FS, Pangalos MN,

- Arimura N, Kaibuchi K, Zalc B, Lubetzki C. 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci.* 25, 1459-1469.  
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4645-04.2005>.
- Kappos, L., Bar-Or, A., Cree, B.A.C., Fox, R.J., Giovannoni, G., Gold, R., Vermersch, P., Arnold, D.L., Arnould, S., Scherz, T., Wolf, C., Wallström, E., Dahlke, F; EXPAND Clinical Investigators. 2018. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet.* 391, 1263-1273.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30475-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30475-6).
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., Sugimoto, Y. 2015. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1851, 414-421.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapip.2014.07.008>.
- Kim H, Lee JM, Park JS, Jo SA, Kim YO, Kim CW, Jo I. 2008. Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 18, 243-248.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.025>.
- Lee, D.H., Geyer, E., Flach, A.C., Jung, K., Gold, R., Flügel, A., Linker, R.A., Lühder, F. 2012. Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathol.* 123, 247-258.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-011-0890-3>.
- Liang, X., Lin, L., Woodling, N.S., Wang, Q., Anacker, C., Pan, T., Merchant, M., Andreasson, K. 2011. Signaling via the prostaglandin E2 receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 121, 4362-43671.  
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI46279>.
- Linker, R.A., Lee, D.H., Demir, S., Wiese, S., Kruse, N., Siglienti, I., Gerhardt, E., Neumann, H., Sendtner, M., Lühder, F., Gold, R. 2010. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. *Brain.* 133, 2248-2263. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awq179>.
- Michinaga, S., Koyama, Y. 2019. Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-

- Brain Barrier Function after Brain Damage. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 571.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms20030571>.
- Miron, V.E., Schubart, A., Antel, J.P. 2008. Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *J. Neurol. Sci.* 274, 13-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2008.06.031>.
- Nakagawa, S., Deli, MA, Kawaguchi, H, Shimizudani, T, Shimono, T, Kittel, A, Tanaka, K, Niwa, M. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54: 253-263. doi: 10.1016/j.neuint.2008.12.002.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193-1226. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1193>.
- Pardridge, W.M. 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today.* 12, 54-61.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.013>.
- Rao, T.S., Lariosa-Willingham, K.D., Lin, F.F., Yu, N., Tham, C.S., Chun, J., Webb, M. 2004. Growth factor pre-treatment differentially regulates phosphoinositide turnover downstream of lysophospholipid receptor and metabotropic glutamate receptors in cultured rat cerebrocortical astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 131-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.03.005>.
- Rosa, E., Fahnstock, M. 2015. CREB expression mediates amyloid beta-induced basal BDNF downregulation. *Neurobiol Aging.* 36, 2406-2413.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.04.014>
- Salvador, E., Shityakov, S., Förster, C. 2014. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. *Cell Tissue Res.* 355, 597-605. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-013-1762-z>.
- Sano, Y., Shimizu, F., Abe, M., Maeda, T., Kashiwamura, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Obinata, M., Kajiwara, K., Fujii, M., Suzuki, M., Kanda, T. 2010. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *J. Cell. Physiol.* 225, 519-528.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22232>.
- Sano, Y., Kashiwamura, Y., Abe, M., Dieu, L., Huwyler, J., Shimizu, F., Haruki, H., Maeda, T., Saito, K., Tasaki, A., Kanda, T. 2013. Stable human brain microvascular endothelial cell line retaining its barrier-specific nature independent of the passage number. *Clin. Exp.*

- Neuroimmunol. 4, 92-103. <https://doi.org/10.1111/cen3.12001>
- Schiffmann, S, Weigert, A, Männich, J, Eberle, M, Birod, K, Häussler, A, Ferreiros, N, Schreiber, Y, Kunkel, H, Grez, M, Weichand, B, Brüne, B, Pfeilschifter, W, Nüsing, R, Niederberger, E, Grösch, S, Scholich, K, Geisslinger, G. 2014. PGE2/EP4 signaling in peripheral immune cells promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem Pharmacol.* 87, 625-635. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.006>.
- Shen, J., Xu, G., Zhu, R., Yuan, J., Ishii, Y., Hamashima, T., Matsushima, T., Yamamoto, S., Takatsuru, Y., Nabekura, J., Sasahara, M. 2019. PDGFR-beta restores blood-brain barrier functions in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 39, 1501-1515. <https://doi.org/10.1177/0271678X18769515>.
- Shi, J., Johansson, J., Woodling, N.S., Wang, Q., Montine, T.J., Andreasson, K. 2010. The prostaglandin E2 E-prostanoid 4 receptor exerts anti-inflammatory effects in brain innate immunity. *J. Immunol.* 184, 7207-7218. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903487>.
- Shimizu, F., Sano, Y., Haruki, H., Kanda, T. 2011a. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- $\beta$  and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia.* 54, 1517e1526.
- Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M.A., Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Kanda, T. 2011b. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J. Cell. Physiol.* 226, 255-266. <https://doi.org/10.1002/jcp.22337>.
- Shimizu, F., Sano, Y., Saito, K., Abe, M.A., Maeda, T., Haruki, H., Kanda, T. 2012. Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem. Res.* 37, 401-409. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0626-8>.
- Takeshita, Y., Fujikawa, S., Serizawa, K., Fujisawa, M., Matsuo, K., Nemoto, J., Shimizu, F., Sano, Y., Tomizawa-Shinohara, H., Miyake, S., Ransohoff, R.M., Kanda, T. 2021. New BBB models revealed IL-6 blockade suppressed the BBB disorder, preventing of onset of NMO/D. *Neurol*

- Neuroimmunol Neuroinflamm. 1 Neuroinflamm. 8: e1076.  
doi: 10.1212/NXI.0000000000001076.
- Tsuge, K., Inazumi, T., Shimamoto, A., Sugimoto, Y. 2019. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *Int. Immunol.* 31, 597-606.  
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxz021>.
- Walton, MR., Dragunow, I. 2000. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci.* 23, 48-53.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01500-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01500-3).
- Wilhelm I, Krizbai IA. 2014. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm.* 11: 1949-1963. doi: 10.1021/mp500046f.
- Woodling, N.S., Wang, Q., Priyam, P.G., Larkin, P., Shi, J., Johansson, J.U., Zagol-Ikapitte, I., Boutaud, O., Andreasson, K.I. 2014. Suppression of Alzheimer-associated inflammation by microglial prostaglandin-E2 EP4 receptor signaling. *J. Neurosci.* 34, 5882-5894.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0410-14.2014>.
- Xu, J., Xu, Z., Yan, A. 2017. Prostaglandin E2 EP4 Receptor Activation Attenuates Neuroinflammation and Early Brain Injury Induced by Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Neurochem. Res.* 42, 1267-1278. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2168-6>.
- Yokoyama, U., Iwatsubo, K., Umemura, M., Fujita, T., Ishikawa, Y. 2013. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol Rev.* 65, 1010-1052.  
<https://doi.org/10.1124/pr.112.007195>.
- Yu, N., Lariosa-Willingham, K.D., Lin, F.F., Webb, M., Rao, TS. 2004. Characterization of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate-mediated signal transduction in rat cortical oligodendrocytes. *Glia.* 45, 17-27. <https://doi.org/10.1002/glia.10297>.
- Zhang, Z.G., Zhang, L., Croll, S.D., Chopp, M. 2002. Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice. *Neuroscience.* 113, 683-687. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00175-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00175-6).
- Zhao, H., Alam, A., San, C.Y., Eguchi, S., Chen, Q., Lian, Q., Ma, D. 2017. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments. *Brain Res.* 1665, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.03.029>.

Zlokovic, B.V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.

Neuron. 57, 178-201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>.