

論文内容要旨

(題目) ヒト脳毛細血管内皮細胞のカルシウム依存的物質輸送変動におけるヘミチャネル pannexin 1 及び connexin 43 開口の役割

(氏名) 金子 洋介

1. 目的

ヘミチャネルは pannexin (Px) 及び connexin (Cx) と呼ばれる 4 回膜貫通型タンパク質が 6 量体を形成した膜タンパク質複合体である。ヘミチャネルは、正常時に閉じており、病態時における周辺環境の変動によってのみ開口して物質を輸送する、という既存のトランスポーターとは異なる性質を持つ。グリア細胞及び脳神経細胞に発現する Px, Cx ヘミチャネルが脳虚血時に開口し、外来性物質や神経伝達物質を輸送することが報告され (Contreras et al., 2002, Thompson et al., 2006), 中枢組織に発現するヘミチャネルの開口が虚血性脳神経障害を増悪させる因子の 1 つであることが示唆されている。血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) では、Cx ヘミチャネルが細胞内 Ca^{2+} 振動に働いていることがラット BBB モデル細胞において報告されたが (De Bock et al., 2011), ヒトにおいては不明である。脳虚血状態ではグリア・神経細胞のみならず、BBB が破綻することで脳神経障害拡大の引き金となることが示唆されており、特に脳虚血急性期の BBB においては密着結合の機能や細胞間隙輸送が変化しないにもかかわらず、BBB 透過性が増加すると報告されている (Haqqani et al., 2005, Fang et al., 2013)。従って、この時経細胞輸送の変動が主として寄与していると推察されるが、そのヒトにおける分子実体は不明である。グリア・神経細胞の例やラット BBB に Cx が発現していることから、脳虚血時に開口し物質を輸送するヘミチャネルがもしヒト BBB に発現していれば、経細胞輸送変動の実体となっている可能性が考えられる。脳虚血時 BBB 機能変動におけるヘミチャネル開口の関与を明らかにするためには、脳虚血状態のヒト BBB においてヘミチャネルを介する基質輸送特性が観察されること、ヒト BBB にヘミチャネルタンパク質が発現していること、ヒト BBB に発現するヘミチャネルが基質輸送に寄与していること、をそれぞれ示す必要がある。本研究では、脳虚血時のヒト BBB の *in vitro* モデルにおいてヘミチャネル開口に基づく輸送系変動が存在していることを示すことを目的とし、ヒト BBB 輸送系変動回避を目指したヘミチャネル阻害薬を同定することを目標とした。

2. 方法

ヒト BBB の *in vitro* モデル脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3 細胞) を用い、ヘミチャネル基質である sulforhodamine 101 (SR-101), lucifer yellow (LY), fluorescein isothiocyanate (FITC), propidium iodide (PI) 及び YoPro-1 の取込輸送解析, calcein の排出輸送解析を行った。脳虚血病態では細胞外 Ca^{2+} が著しく低下すると報告されている (Silver et al., 1990) ことから、細胞外 Ca^{2+} 低下条件を *in vitro* 脳虚血モデルとした。輸送特性の解析にはヘミチャネルの典型的阻害剤を用いた。輸送に寄与するヘミチャネルの同定にはヘミチャネルの部分配列ペプチド (mimetic peptide) による特異的阻害法及び small interfering RNA (siRNA) による遺伝子ノックダウン法を用いた。ヘミチャネル開口阻害薬の同定を目的として、20 種の化合物・市販薬を阻害剤として用いた。

ヘミチャネルの絶対発現量解析には、液体クロマトグラフィー-質量分析器 (LC-MS/MS) を用いた定量標的プロテオミクスを応用した。ヒト及びマウス Px, Cx の合計 43 分子種に対し *in silico* 設計法によって定量に適したペプチド配列を選択した。これらペプチドを連結した人工合成タンパク質を、BL21 大腸菌を用いて作製した。同配列の安定同位体標識タンパク質を作製し内標準とした。人工合成タンパク質を前処理及びトリプシン消化することでペプチド溶液を得、ヒト及びマウスヘミチャネルタンパク質の一斉定量系を構築した。この定量系を用い、hCMEC/D3 細胞をはじめとして様々なヒト組織についてヘミチャネルの定量分析を行った。ヒトとの種差をタンパク質発現量の観点から比較検討する目的で、マウス組織におけるヘミチャネル定量分析を行った。なお本検討は東北大学大学院薬学研究科の倫理委員会の承認を受けて実施した。

3. 結果・考察

hCMEC/D3 細胞におけるヘミチャネル輸送特性 本実験では脳虚血時のヒト BBB においてヘミチャネルを介する輸送があるかを示すことを目的とした。脳虚血急性期の生理的環境変動に細胞外 Ca^{2+} 濃度低下があり、細胞外 Ca^{2+} 濃度低下状態はヘミチャネルを開口させるトリガーであることから、本研究の脳虚血 *in vitro* モデルとして用いた。また、複数のモデル基質について細胞外 Ca^{2+} 濃度の影響、飽和性、ヘミチャネル阻害剤による阻害という輸送特性を解析することで、ヘミチャネルを介した輸送であるかを評価できると考えられた。hCMEC/D3 細胞の細胞外 Ca^{2+} 非存在下における基質取込輸送を検討した結果、この輸送は生理的 Ca^{2+} 濃度存在下と比較して高く、時間依存的に増加した。また、取込輸送は細胞外 Ca^{2+}

濃度の低下に依存して増加した。細胞内 calcein の残存は時間依存的に減少し、生理的 Ca^{2+} 濃度存在下と比較して細胞外 Ca^{2+} 非存在下で低下した。この結果から hCMEC/D3 細胞におけるヘミチャネル基質の取込及び排出輸送の両方向に細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性があることが示された。細胞外 Ca^{2+} 非存在下における SR-101 及び PI の取込輸送は、基質濃度に対して飽和性が見られた。従ってこの輸送は担体介在型であることが示唆された。ヘミチャネル阻害剤である carbenoxolone, 18 β -Glycyrrhetic acid は SR-101 及び PI の取込輸送を減少させ、また carbenoxolone は細胞内 calcein の残存を増加させた。従って両方向の輸送がヘミチャネル阻害剤によって阻害されることが示された。これらの結果から hCMEC/D3 細胞にヘミチャネルを介した輸送特性が存在していることが明らかとなった。

ヘミチャネルの定量法の確立と発現解析 これまでにヒト BBB におけるヘミチャネルタンパク質の発現は不明であり、これを明らかにすることは輸送に寄与する分子を同定し、BBB 輸送変動を回避する化合物の標的化を行うための重要な課題である。ヒトに存在する 20 種類以上のヘミチャネル分子種の発現量を、それぞれ明らかにするためのタンパク質定量系が必要である。本実験ではヒト BBB に発現するヘミチャネルタンパク質を同定する上で必要な定量標的プロテオミクス的手法を確立し、発現量を明らかにすることを目的とした。人工合成タンパク質が適切に合成されていることを SDS-PAGE によって確認し、トリプシン消化物の LC-MS/MS 分析の結果、ペプチドプローブ特異的なピークを検出した。安定同位体標識タンパク質に含まれる Reference ペプチドの分析によって、非標識ペプチドのコンタミネーション割合はそれぞれ 0.04% 以下であることが示された。従って本実験においてヘミチャネルタンパク質の定量法が新規に確立された。本定量法によって hCMEC/D3 細胞における定量解析を行った結果、Px1 及び Cx43 が検出され、発現量はそれぞれ 3.58 ± 0.28 及び 6.13 ± 0.58 fmol/ μg protein であった。本実験によってヒト BBB におけるヘミチャネルタンパク質の発現が初めて同定された。Px1 及び Cx43 の定量値は、タンパク質発現や機能が報告されている脳 Cx43 や肝臓 Cx32 についてそれぞれ得られた定量値 (Cx43 : 22.5 ± 3.7 fmol/ μg protein, Cx32 : 0.871 ± 0.057 fmol/ μg protein) と比較して同程度だった。従って Px1 及び Cx43 はヒト BBB における主要なヘミチャネルであると考えられた。マウス組織の定量解析においては、脳、心臓、脾臓及び精巣に Cx43 が、肝臓、腎臓及び膵臓に Cx32 が、小腸に Px1 がそれぞれ検出された。これらヘミチャネルはマウス各組織におけるタンパク質の発現や病態への関与が既に報告されている。ヒトとマウスの比較検討においては、ヒト脳及びマウス脳の両方で Cx43 が高発現しており、その他の組織における発現量は同等だった。従って各組織のヘミチャネルタンパ

ク質の発現量の観点からヒトとマウスの種差は小さいことが示された。

輸送に関与するヘミチャネルの同定 hCMEC/D3 細胞に Px1 及び Cx43 が高発現している前項の結果から、本実験ではこれら 2 つのヘミチャネルの輸送における寄与の解明を目的とした。そのためには、ヘミチャネルを特異的に阻害あるいはノックダウンすることで輸送における寄与を評価する必要がある。Px1 及び Cx43 タンパク質の細胞外ループに位置する部分配列と同一の mimetic peptide 共存下で輸送実験を行ったところ、PI の取込輸送は低下した。同一アミノ酸組成で異なる配列の mimetic peptide 共存下では変化しなかったことから、Px1 及び Cx43 に特異的なアミノ酸配列が輸送過程の重要な役割を担っていることが示唆された。また siRNA を処理し Px1, Cx43 タンパク質発現量を低下させることによって、SR-101 及び PI の取込輸送は低下した。同 siRNA 処理によって calcein の細胞内蓄積は増加し、排出輸送は減少した。これらの結果から、hCMEC/D3 細胞におけるヘミチャネルを介した輸送に Px1 及び Cx43 ヘミチャネルタンパク質の両方が主として寄与していることを見出した。

ヘミチャネルを阻害する化合物の探索 脳虚血時 BBB 細胞輸送変動の回避を目指し、本実験ではこれまでの結果をもとに BBB ヘミチャネル阻害を標的とした化合物を同定することを目的とした。既報のヘミチャネル阻害剤とその類縁体及び動物において脳保護効果を示す化合物が本実験の阻害薬候補として適切であると考え、hCMEC/D3 細胞におけるヘミチャネルを介した SR-101 及び PI 取込輸送に対し、選定した計 20 化合物の阻害効果を検討した。その結果、カルシウム拮抗薬 cilnidipine 及びステロイドホルモン progesterone が SR-101 及び PI の両方の基質取込輸送を低下させることを見出した。この 2 化合物は脳保護以外の目的で臨床使用される市販薬であるが、脳虚血動物モデルを用いた基礎研究において、脳神経障害を軽減させる作用を持つことが示唆されている。本研究の結果から、これら化合物はヘミチャネルを阻害することで、BBB 輸送系の変動を軽減させる可能性が考えられる。

4. 結論

本研究ではヒト in vitro BBB モデル細胞において Px1 及び Cx43 タンパク質が発現していることを明らかにした。細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性、基質輸送に対する飽和性、ヘミチャネル阻害剤による阻害、mimetic peptide, siRNA の効果に基づいて、ヒト BBB において Px1, Cx43 ヘミチャネルを介した輸送系が働いていることが示された。この輸送に対し cilnidipine 及び progesterone が阻害することを見出したことから、今後の課題として in vivo 脳虚血の急性期におけるヘミチャネル開口阻害による BBB 破綻の低下効果を証明する必要がある。

論文提出者 : 金子 洋介

論文審査委員 (主査) : 寺崎 哲也

論文題目: ヒト脳毛細血管内皮細胞のカルシウム依存的物質輸送変動におけるヘミチャネル pannexin 1 及び connexin 43 開口の役割

急性脳虚血などの病態では、血液脳関門(Blood-brain barrier, BBB)における密着結合の崩壊機構だけでは説明のつかない、経細胞輸送系の変動が示唆されてきた。そこで本研究は、ヒト *in vitro* BBB モデルである脳血管内皮細胞株(hCMEC/D3 細胞)を用い、環境依存的に開口して物質を輸送する性質を持つ「ヘミチャネル」が BBB 輸送変動に関与しているとの仮説を、輸送特性解析及び標的タンパク質定量プロテオミクスで実証することを目的とした。急性脳虚血環境を反映する *in vitro* モデルとして用いた hCMEC/D3 細胞の細胞外カルシウム非存在下において、アニオン性・カチオン性蛍光物質の取込及び排出輸送は、カルシウム存在下と比較して時間依存的増加を示した。これらの輸送活性は、ヘミチャネルの典型的阻害剤である carbenoxolone 及び 18 β -glycyrrhetic acid によって阻害された。取込輸送は細胞外カルシウム濃度依存的に低下し、基質濃度に対して飽和性が見られた。従って、hCMEC/D3 細胞の細胞外カルシウム非存在下において、ヘミチャネル様の輸送機能の存在が示された。さらに、hCMEC/D3 細胞におけるヘミチャネルサブタイプの発現を解明するため、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた従来の標的タンパク質絶対定量法を応用し、人工内部標準タンパク質を設計・作製して、41 分子種のヒト及びマウスヘミチャネルタンパク質(パネキシン Px, コネキシン Cx)の絶対定量法を構築した。定量解析の結果、hCMEC/D3 細胞では Px1 及び Cx43 がそれぞれ 3.58 ± 0.28 fmol/ μ g protein 及び 6.13 ± 0.58 fmol/ μ g protein の発現量を示すことが明らかとなった。Px1 及び Cx43 を siRNA 処理によってノックダウン、又は Px1 及び Cx43 ヘミチャネルの開口を特異的に阻害する部分配列ペプチドを処理することによって、輸送活性は低下した。以上の結果から、hCMEC/D3 細胞において、細胞外カルシウム非存在下における基質輸送の変動には Px1 及び Cx43 が関与していることが明らかとなった。さらに、細胞外カルシウム非存在下における基質取込輸送に対し、阻害活性を示す化合物(cilnidipine 及び progesterone)を見出した。従って、ヘミチャネル輸送活性の阻害が BBB 膜輸送変動を回避する戦略の分子標的となる可能性が示された。以上の研究成果は、*in vitro* 細胞系を用いて、環境依存的に輸送活性を変動させるヘミチャネルが BBB の経細胞輸送機能に関与していることを示したものであり、ヒト BBB 輸送機能の変動機構の解明に寄与するものである。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。