

氏名 (本籍) て つか かず ひろ
手 塚 和 宏

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬博第 337 号

学位授与年月日 平成15年3月24日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学位論文題目

血液脳関門を介した酸性アミノ酸の排出輸送に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 寺崎 哲也

教授 山添 康

教授 福永 浩司

論文内容要旨

【序論】

中枢神経系において、L-アスパラギン酸 (L-Asp), L-グルタミン酸 (L-Glu) は興奮性の神経伝達物質として機能しており、脳内濃度が上昇すると興奮毒性を引き起こす。一方、大脳にはD体のアスパラギン酸 (D-Asp) も存在しており、N-methyl D-aspartate (NMDA) の前駆体であると考えられている。大脳における Asp は両異性体が異なる生理機能を有することから、その脳内動態はそれぞれ異なる特性を示すことが考えられる。神経細胞や星状膠細胞には高親和的な興奮性アミノ酸輸送担体 (excitatory amino acid transporter; EAAT) が発現し、酸性アミノ酸を細胞間隙から除去することが知られている。EAAT 輸送担体は L-Glu, L-Asp, D-Asp を基質とするため、Asp の輸送に対する立体選択性はない。

血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) は、脳と血液を隔てる関門であり、BBB を介した脳から血液方向への毒性物質の輸送は中枢解毒機構として重要である。これまで、L-Glu と L-Asp は BBB を介して脳から血液へと輸送されるが、D-Asp は輸送されないことが Hosoya らによって報告されている。この *in vivo* BBB での L 体選択的な Asp の排出輸送特性は、EAAT 輸送担体の基質認識特性では説明できない (図 1)。本輸送特性の解明は、L-Asp, D-Asp の脳内動態を理解し、さらに興奮毒性を起こしうる L 体の酸性アミノ酸の脳細胞間液からの除去機構を明らかにする上で重要である。そこで本研究は、BBB における L 体選択的な Asp の輸送系の分子の実体を解明することを目的とした。

【方法】

***In vitro* BBB モデルの確立:** 条件的不死化ラット星状膠細胞 (TR-AST), 同マウス及びラット脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB, TR-BBB) を樹立、及び機能評価し、TM-BBB, TR-BBB を *in vitro* BBB モデルとして以下の解析に用いた。

***In vitro* BBB モデルにおける酸性アミノ酸輸送機構の解析:** TM-BBB, TR-BBB における [³H]L-Asp, [³H]D-Asp の輸送活性を解析し、Asp を L 体選択的に認識する輸送系を推定した。該当する輸送系の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析したのち、ORF を単離し、アフリカツメガエル卵母細胞 (oocyte) 発現系で Asp の輸送機構を検証した。また、L-Asp の輸送活性と D-Asp の輸送活性の比を、立体選択性、 S_{LD} と表記した。

***In vivo* BBB における発現・機能解析:** *In vitro* BBB モデルにおける L 体選択的な Asp の輸送に最も大きく寄与していた ASCT2 輸送担体の抗体を作成し、凍結脳切片に対して免疫染色を行った。さらに、*in vivo* BBB における [³H]L-Glu の輸送特性を Brain Efflux Index (BEI) 法を用いて解析した。

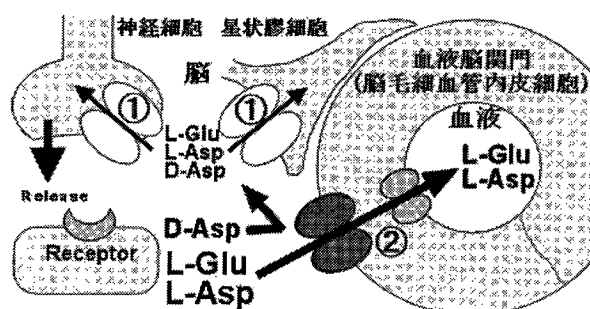


図 1. 酸性アミノ酸の脳実質細胞における輸送特性と血液脳関門における輸送特性の相違。脳実質細胞の輸送系は D-Asp を輸送する①が、血液脳関門の輸送系は D-Asp を輸送しない②。

【結果・考察】

TR-AST, TM-BBB, TR-BBBの機能評価: TR-ASTは抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体, A2B5抗体に陽性で, glutamine synthetase の mRNA を発現していた。この特性は2型星状膠細胞の特性と一致していた。GLUT1, P-糖蛋白 (P-gp) は BBB に存在して物質の脳移行性を規定する重要な輸送担体である。Western blot の結果, TM-BBB, TR-BBB から GLUT1, P-gp のバンドが検出された。さらに RT-PCR の結果, TM-BBB から P-gp をコードする *mdrla*, *mdrlb* 遺伝子が検出された。以上から TM-BBB, TR-BBB は *in vivo* BBB の特性を保持していることが示された。

In vitro BBB モデルにおける $[^3\text{H}]\text{Asp}$ の輸送機構: TM-BBB4における $[^3\text{H}]\text{L-Asp}$ の輸送活性は, $[^3\text{H}]\text{D-Asp}$ の輸送活性の4.2倍高かった ($S_{LD}=4.2$)。Na⁺依存的な輸送過程の S_{LD} は6.4, Na⁺非依存的な輸送過程の S_{LD} は3.3であり, L体選択的な $[^3\text{H}]\text{Asp}$ の輸送にはNa⁺依存的な輸送過程の寄与が大きいことが示唆された。さらに, Na⁺依存的な輸送システムの S_{LD} は, 取り込みmediumのpHを下げることで上昇した。pH 5.5における S_{LD} は126であり, pH 7.4における S_{LD} の20倍高かった。以上から, TM-BBB4におけるL体選択的なAspの輸送には, Na⁺依存性, pH依存性システムが関与していることが明らかになった(図2)。

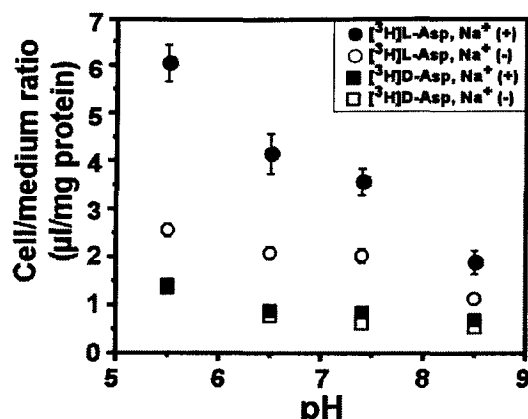


図2. TM-BBB4における $[^3\text{H}]\text{L-Asp}$, $[^3\text{H}]\text{D-Asp}$ の取り込みとNa⁺, pH依存性. pHを下げることでNa⁺依存的なAspの輸送過程のL体選択性 ((●-○)/(■-□))が上昇する。

そこで, BBBにおけるL体選択的なAspの輸送に重要と考えられるNa⁺依存的な輸送過程について詳細に解析した。TM-BBB4におけるNa⁺依存的な $[^3\text{H}]\text{L-Asp}$ の輸送は, L-Gluのほか, L-Ala, L-Serなどの中性アミノ酸で阻害された。濃度依存性について検討した結果, 二相性の飽和を示し, 低親和的な輸送過程が存在した。さらに, 通常条件下における脳細胞間液中のL-Asp濃度を10 μM , 病態時における脳細胞間液中のL-Asp濃度を100 μM と仮定し, 高親和的輸送過程と低親和的輸送過程の寄与率を解析した結果, それぞれ71%, 94%が低親和的な輸送過程の寄与であった。

In vitro BBB モデルにおける system ASC 輸送系遺伝子の発現: System ASC輸送系はL-Ala, L-Ser, L-Cysなどの中性アミノ酸をNa⁺依存的に輸送する。さらに, system ASC遺伝子であるASCT1は低pH条件下で酸性アミノ酸を輸送し, ASCT2はpH 7.4条件でL-Gluを低親和的に輸送する。これらのsystem ASCの特性は, TM-BBB4におけるL-Aspの輸送特性とよく一致していた。しかし, system ASCがL-Aspを輸送するか否かは不明であった。このため, TM-BBB4におけるL体選択的なAspの輸送システムとしてsystem ASCの関与を推察し, ASCT1, ASCT2のBBBにおける発現について検討した。RT-PCRの結果, 両遺伝子はTM-BBB4, TR-BBB13, さらにBBBの実体である脳毛細血管のrich fractionにおいて検出された。

System ASC 輸送系の $[^3\text{H}]\text{Asp}$ 輸送機能: mASCT1, mASCT2, およびrASCT2のoocyte発現系における $[^3\text{H}]\text{Asp}$ の輸送活性を解析した。その結果, mASCT1, mASCT2, rASCT2は $[^3\text{H}]\text{L-Asp}$ をNa⁺依存性, pH依

存的に輸送した。しかし、いずれの輸送担体も ^3H D-Aspを輸送しなかった(図3)。以上から、ASCT輸送担体はAspをL体選択的に輸送することが明らかとなった。

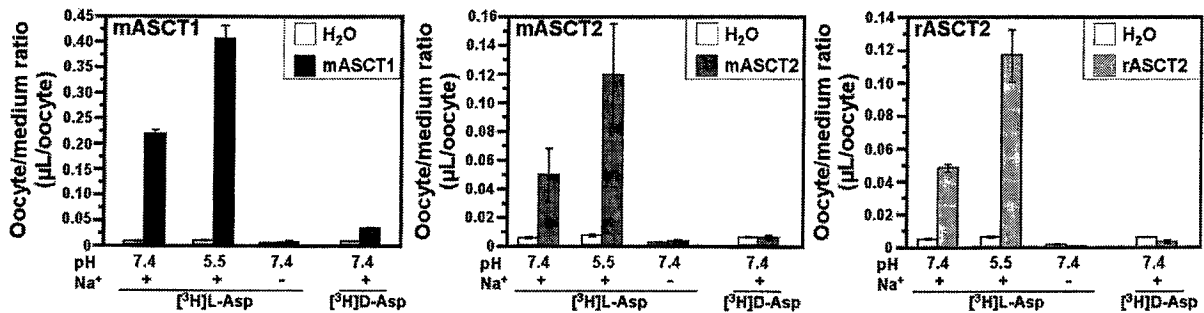


図 3. mASCT1、mASCT2、rASCT2 発現 oocyte における ^3H L-Asp、 ^3H D-Asp の輸送。 ^3H L-Asp の輸送は Na^+ 、pH 依存性を示した。一方 ^3H D-Asp は oocyte 内に輸送されなかった。

TM-BBB4において機能するASCTサブタイプ: L-GluはmASCT2を介した ^3H L-Aspの輸送を50%以上阻害したが、mASCT1を介した輸送は阻害しなかった。このため、L-Gluによる阻害効果で、ASCT1とASCT2の関与を区別できる。TM-BBB4における Na^+ 依存的な ^3H L-Aspの輸送はL-Gluによって完全に阻害された。さらにTM-BBB4におけるmASCT2遺伝子の発現量はmASCT1遺伝子の発現量の6.7倍高かった。以上から、TM-BBB4におけるL体選択的なAspの輸送を担う主要な分子種はASCT2であることが明らかになった。

In vivo BBBにおけるASCT2の発現: ASCT2を認識する抗体(抗ASCT2抗体)を作成し、凍結脳切片に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、抗ASCT2抗体による染色は、扁平状の血管の核染色の外側に管腔様に検出された。また、一部の脳実質細胞の核においても抗体反応性が検出された。さらに、抗ASCT2抗体による染色は、C219抗体による染色像の外側、抗GFAP抗体による染色像の内側に、共に管腔様に検出された。C219抗体は齧歯類BBBの血液側細胞膜に発現するP-gpを認識し、GFAPは星状膠細胞に発現する。C219抗体、抗GFAP抗体による染色像は抗ASCT2抗体による染色像と重ならなかったことから、ASCT2がBBBの脳側の細胞膜に発現していることが示唆された。

In vivo BBBを介した ^3H L-Gluの脳からの消失に対する中性アミノ酸の効果: Oocyteを用いた解析の結果、ASCT2は ^3H L-Gluを輸送したが、ASCT1は ^3H L-Gluを輸送しなかった。そこで、 ^3H L-GluのBBBを介した脳からの消失についてBEI法で解析した。大脳Par 2領域に投与後の ^3H L-Gluの脳内残存率は、system ASCの基質であるL-Alaの共存によって上昇した(図4)。この結果は、BBBを介した ^3H L-Gluの脳からの消失が、L-Alaによって阻害されたことを示している。以上から、BBBを介した脳から血液への ^3H L-Gluの輸送にASCT2が関与していることが示唆された。

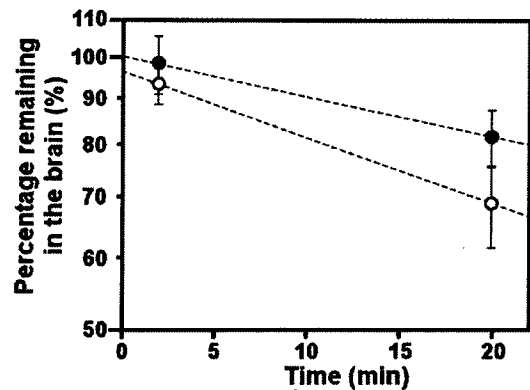


図 4. 大脳に投与した ^3H L-Gluの脳内残存率の経時変化。コントロール条件での ^3H L-Gluの脳内残存率(○)はL-Alaの共存(●)によって上昇した。

【結論】

本研究において、ASCT輸送担体はAspをL体選択的に輸送する分子種であること明らかにし、ASCT2が*in vivo* BBBにおいて発現、及び機能していることを初めて示唆した。ASCT2はAspの脳内動態を立体選択的に制御し、さらに興奮性神経伝達物質であるL体の酸性アミノ酸の脳細胞間液からの除去に関与していると考えられる。

審査結果の要旨

中枢神経系において、L-アスパラギン酸 (L-Asp) やL-グルタミン酸 (L-Glu) は興奮性神経伝達物質、D-アスパラギン酸 (D-Asp) は *N*-Methyl-D-aspartate の前駆物質として存在する。これまで、L-Asp やL-Glu などのL体の酸性アミノ酸は、血液脳関門 (BBB) を介して脳から血液へと輸送される一方、D-Asp の輸送は検出されないことが報告されていたが、その分子の実体は不明であった。本研究は、BBB における酸性アミノ酸、特にL体選択的な Asp の輸送機構の解明を目的とした。Asp の BBB 輸送機構を解明するに当たり、マウス、及びラットの条件的不死化脳毛細血管内皮細胞株 (TM-BBB, TR-BBB), 条件的不死化星状膠細胞株を樹立、及び機能評価し、TM-BBB, TR-BBB を *in vitro* BBB モデルとして用いた。BBB 細胞株における Asp の取り込みはL体に優位であり、TM-BBB における [³H]L-Asp の輸送活性は [³H]D-Asp の輸送活性の 3.1 倍高かった。さらに、L体選択的な Asp の輸送には Na⁺ 依存的、pH 依存的なシステムが関与していることが示された。Na⁺ 依存的な L-Asp の輸送は、中性アミノ酸によって阻害され、低親和的な濃度依存性を示した。これらの輸送特性は、system ASC を介した L-Glu の輸送特性と類似していた。RT-PCR の結果、system ASC 遺伝子である ASCT1, ASCT2 が TM-BBB4, TR-BBB13, 脳毛細血管の rich fraction において検出された。mASCT1, mASCT2, rASCT2 輸送担体は [³H]L-Asp を Na⁺ 依存的、pH 依存的に輸送したが、 [³H]D-Asp は輸送しなかった。ASCT を介した L-Asp の輸送特性と、TM-BBB における L-Asp の輸送特性を比較した結果、TM-BBB における L-Asp の輸送には、ASCT2 の寄与が大きいことが示唆された。さらに TM-BBB における ASCT2 遺伝子の発現量は ASCT1 遺伝子の発現量の 6.7 倍高かった。免疫染色の結果、抗 ASCT2 抗体による反応性は脳皮質、及び海馬において管腔様に検出され、核染色、及び抗 GFAP 抗体との二重染色から、ASCT2 は脳毛細血管の脳側の細胞膜に発現することが示唆された。さらに Brain Efflux Index 法の結果、ASCT2 の基質である [³H]L-Glu の BBB を介した脳からの消失は、中性アミノ酸 L-Ala によって阻害された。

以上、本研究は、ASCT1, ASCT2 輸送担体は Asp を L体選択的に輸送すること、ASCT2 は *in vivo* BBB の脳側の細胞膜において発現、及び機能していることを初めて明らかにしたものであり、薬学研究において有用な知見を見いだしたものとして高く評価できる。

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。