

血液脳関門を弱める化合物を 取得するために有用な細胞株

自然科学研究機構 生理学研究所

生体機能調節研究領域 細胞構造研究部門

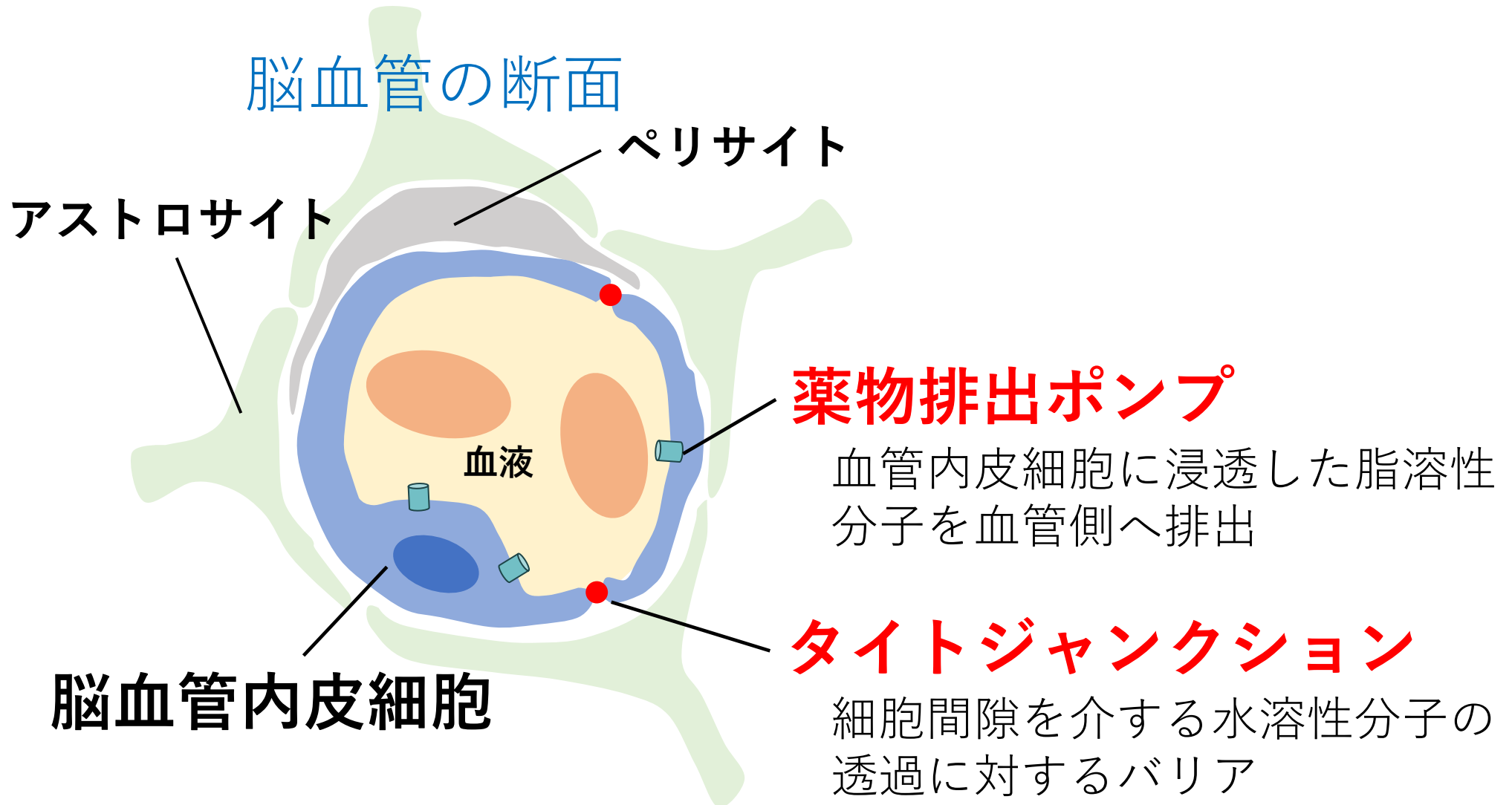
教授 古瀬幹夫

2023年2月9日

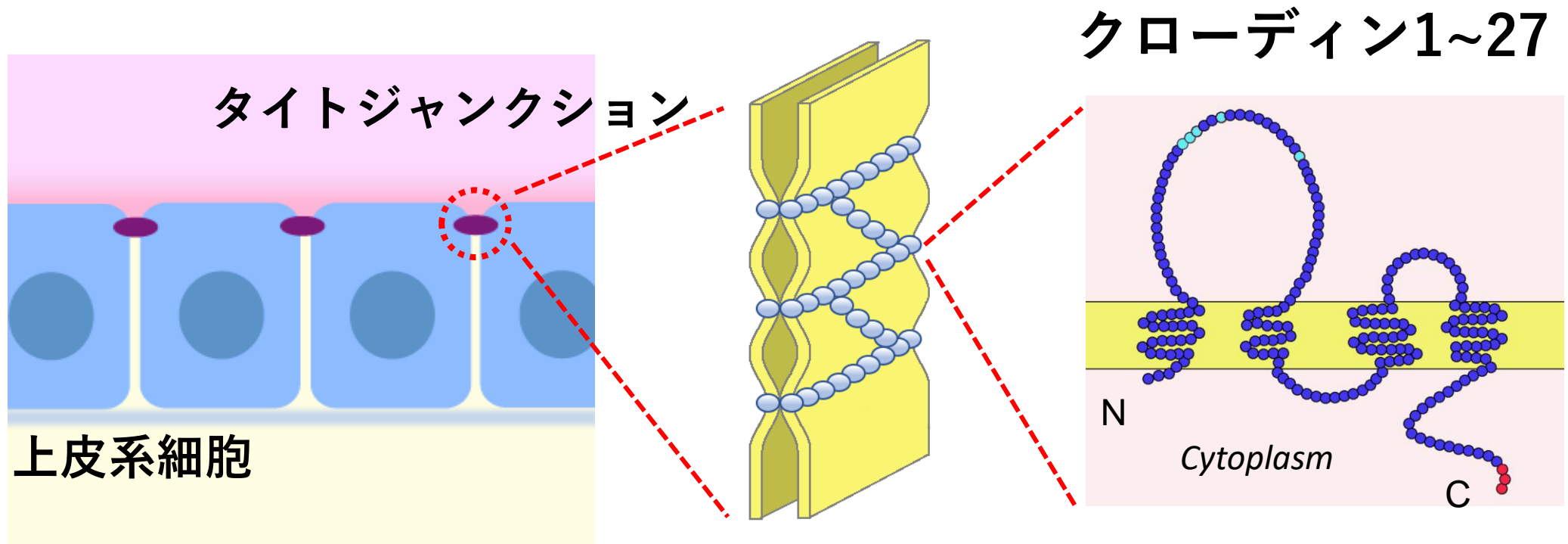
血液脳関門

- 血液と脳組織液の間の物質交換を制限するしくみ
- 末梢組織の血管は総じて透過性が高いが、中枢神経系の血管は透過性が非常に低い。
- 脳腫瘍等の脳内病巣に血中から薬物を送達する妨げとなっている。

血液脳関門の実体

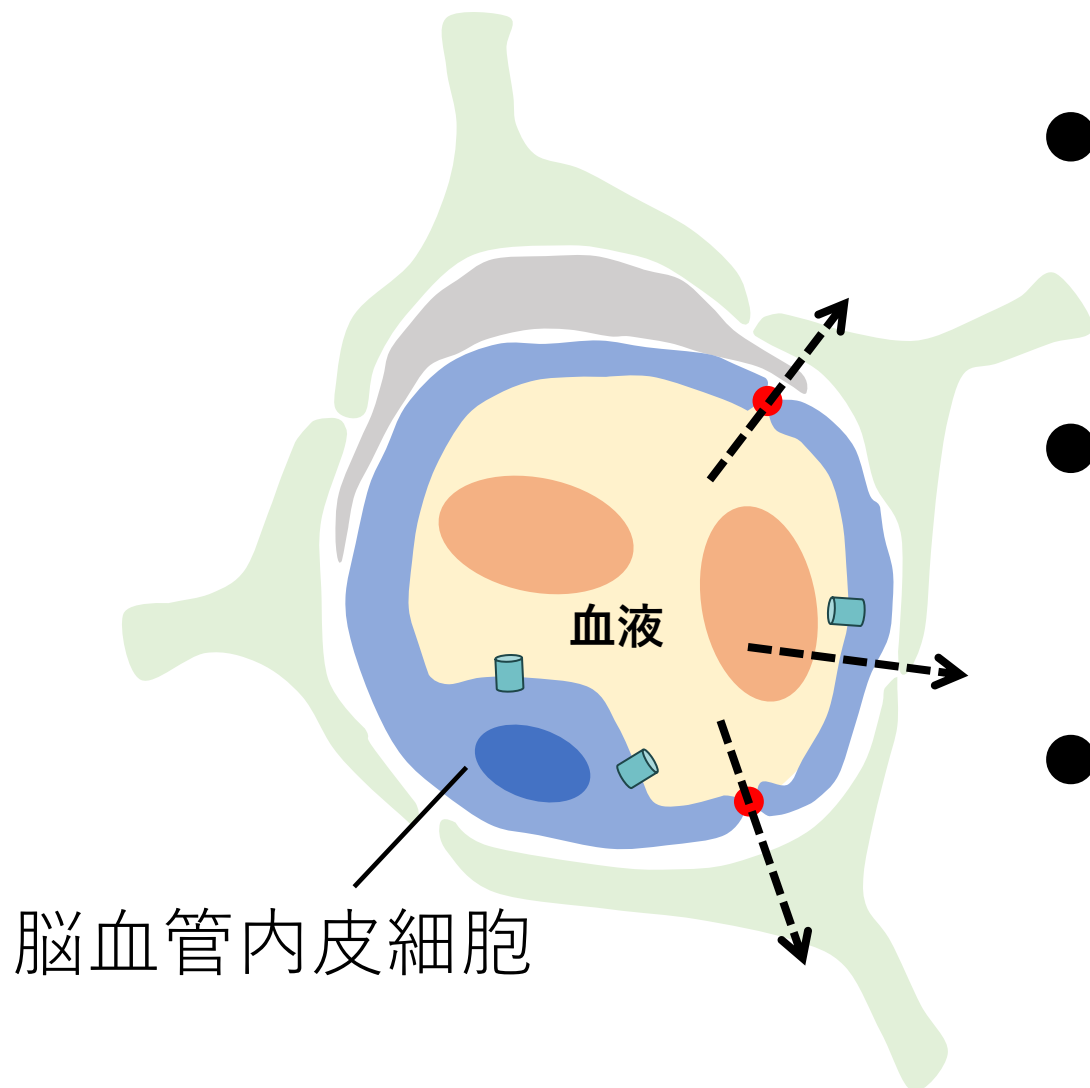


タイトジャンクションと クローディングファミリー



- 上皮細胞では複数のクローディングが同時に発現
- 血管内皮細胞はクローディング5が発現

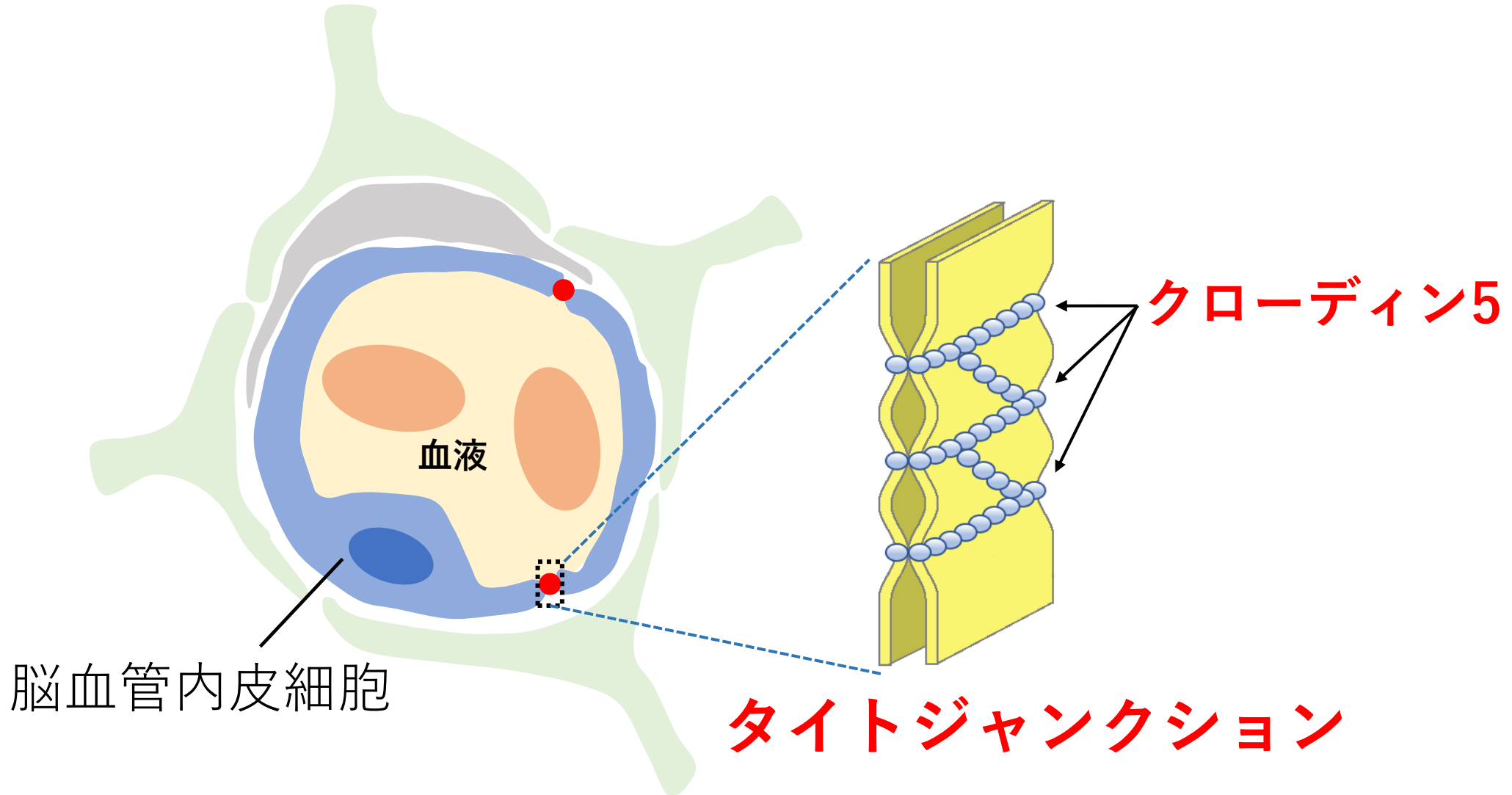
血液脳関門を通す薬物送達法の開発



- 高浸透圧溶液法
高浸透圧による血管内皮細胞の収縮
- マイクロバブル法
気泡液の注射と超音波ビームによる振動
- トロイの木馬法
血管内皮細胞を透過する物質に薬剤を結合

参考：J.インターランディ
「血液脳関門をこじ開ける」
日経サイエンス2014.03

血液脳関門のタイトジャンクション



クロードイン5は血液脳関門を 越える薬物送達のターゲット

新田ら. J Cell Biol. 161(3):653-60
(2003).
doi: 10.1083/jcb.2003020702003

Figure 5 参照

クロードイン5欠失マウス

血液脳関門の破綻により
分子量600程度の物質
が脳実質に浸透する.

クロロディン5の機能阻害剤を 取得するためのステップ

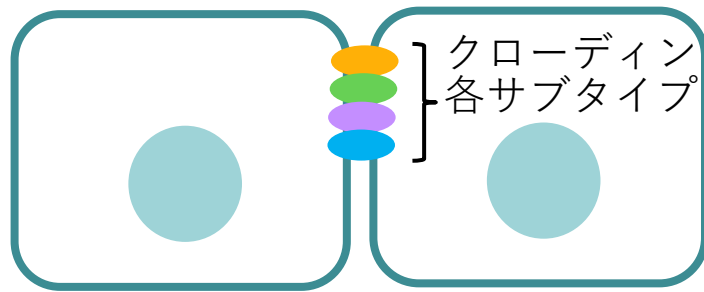
- クロロディン5タンパク質に相互作用する化合物のスクリーニング
- ↓
- **脳血管内皮細胞（培養系）を用いたバリア機能の阻害アッセイ**
- ↓
- 動物を用いた血液脳関門への作用の評価

培養脳血管内皮細胞の問題点

- 現存する脳血管内皮由来細胞株は十分なバリア機能を失っている.
- ヒトから初代培養細胞を高純度・大量に調製することは不可能. 霊長類からでも困難. (ES細胞から分化させる場合も)

脳血管内皮細胞の代わりとなる クロロディン5発現上皮細胞の樹立

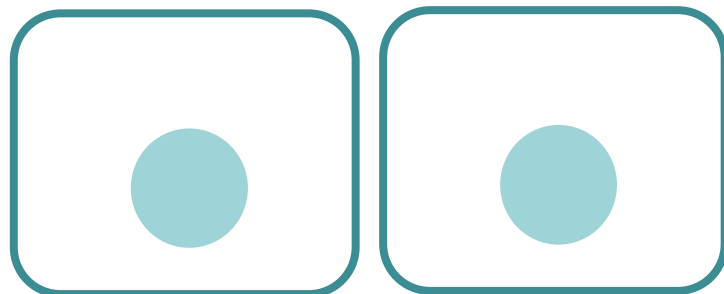
MDCK細胞



MDCK細胞：イヌ腎臓由来の安定な上皮細胞株でこれまでタイトジャンクションの機能解析に広く用いられてきた。

↓ クロロディン遺伝子の破壊

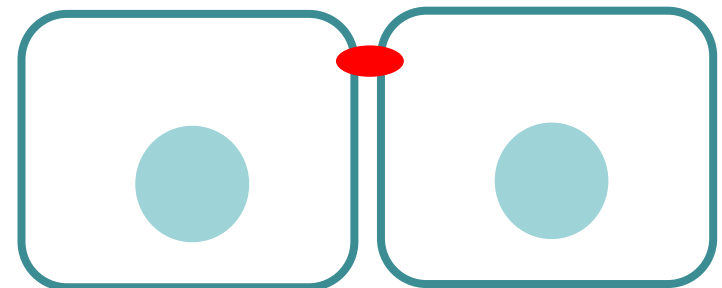
タイトジャンクション欠失上皮細胞



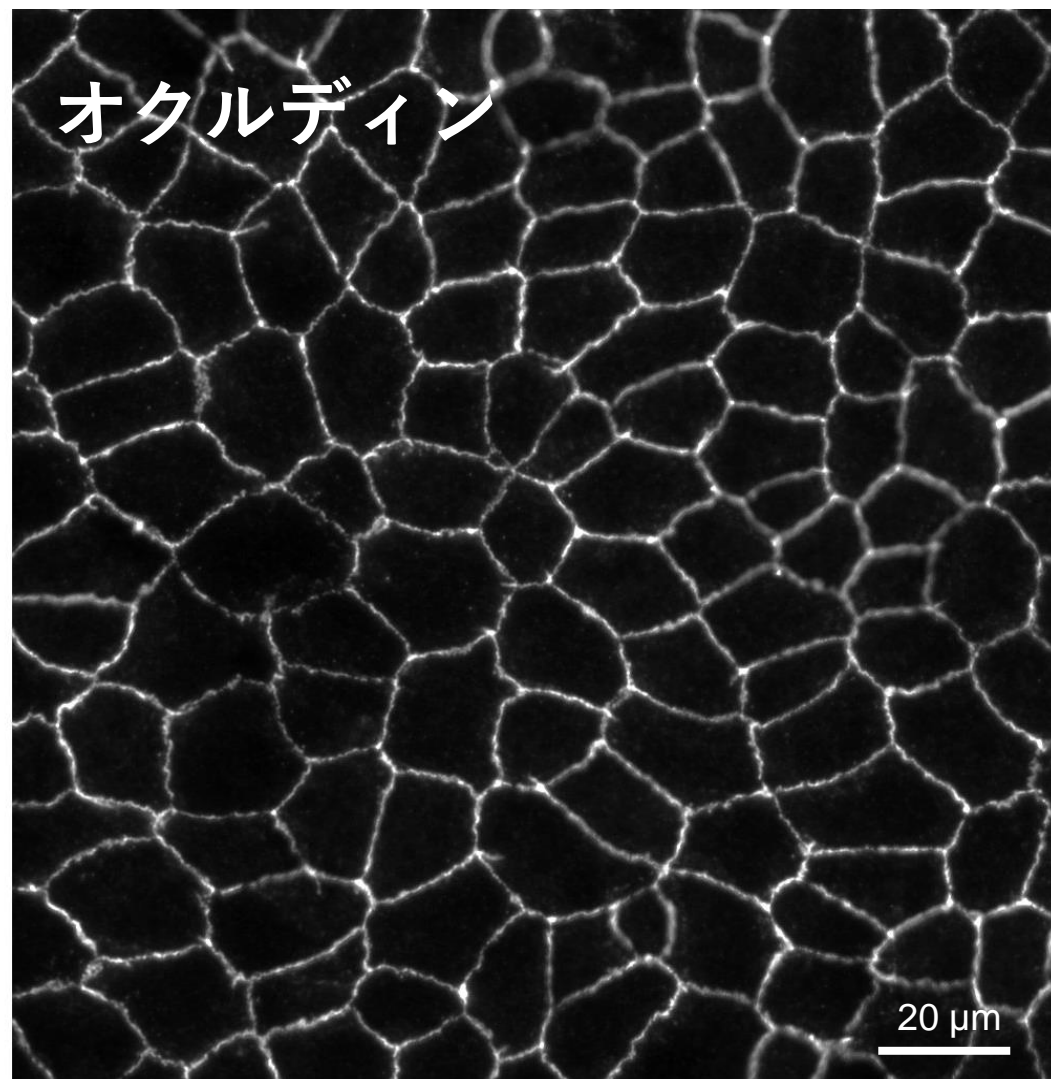
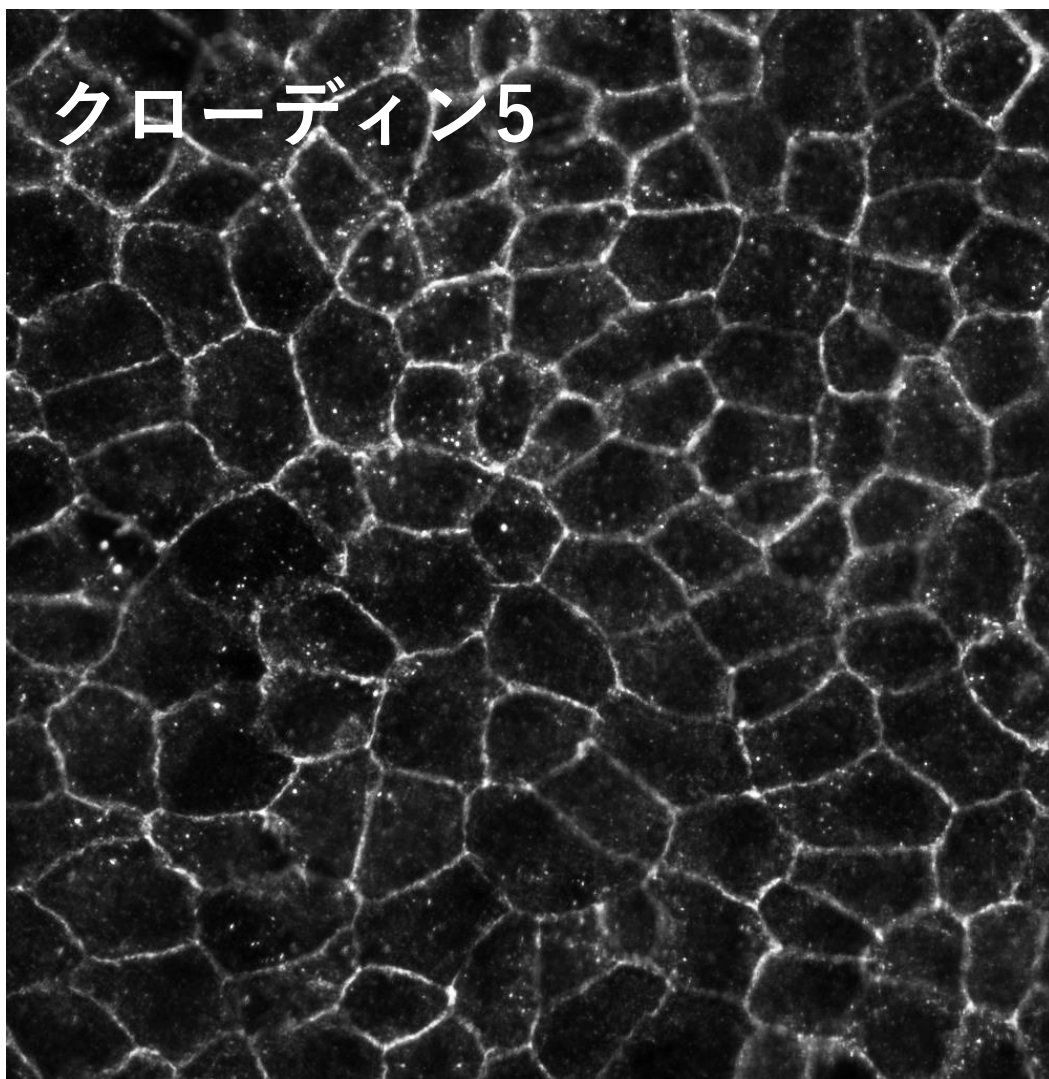
(大谷ら, 2019)

ヒトクロロディン5発現上皮細胞

→ クロロディン5遺伝子導入

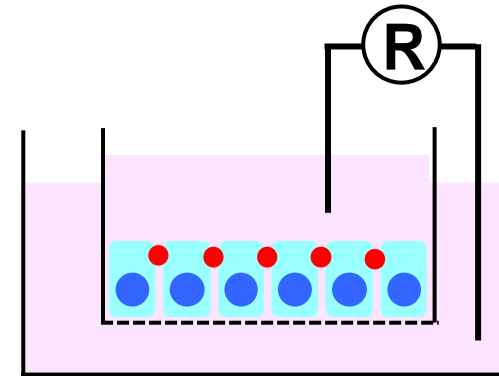
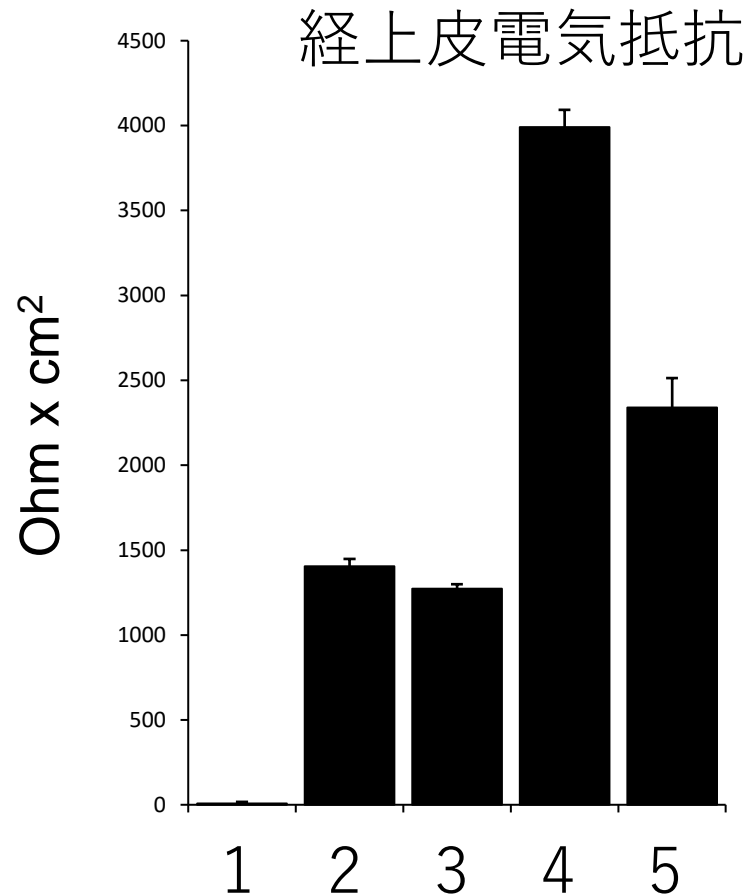


ヒトクロードイン5発現上皮細胞



蛍光免疫染色

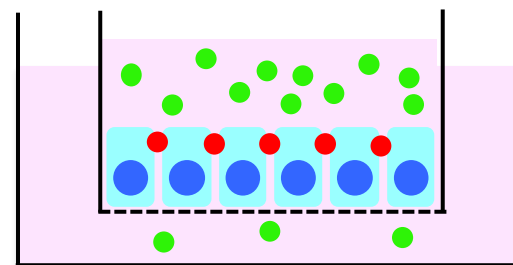
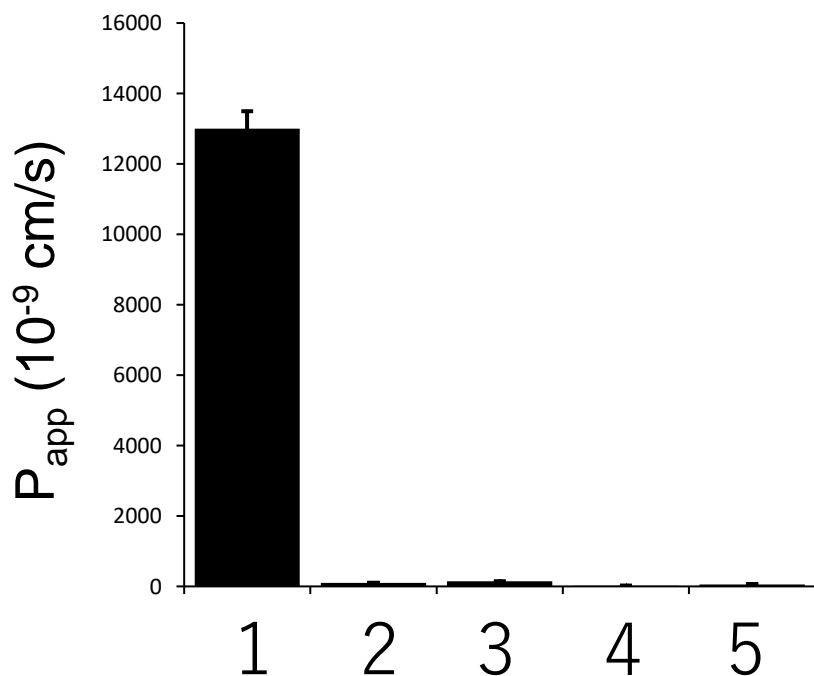
クロロゲン5発現上皮細胞の バリア機能



1. タイトジャンクション欠失細胞
2. ヒトクロロゲン5発現細胞 cl.1
3. 同 cl.2
4. 同 cl.3
5. 同 cl.4

クロロディン5発現上皮細胞の バリア機能

傍細胞流量
フルオレセイン 332Da



1. タイトジャンクション欠失細胞
2. ヒトクロロディン5発現細胞 cl.1
3. 同 cl.2
4. 同 cl.3
5. 同 cl.4

本技術の特徴

- ヒト脳血管内皮細胞の代用としてヒトクロロディン5を発現してタイトジャンクションのバリア機能をもつ上皮細胞株を樹立した.
- 得られた細胞は初代培養脳血管内皮細胞と比べて取り扱いが格段に易しく、費用をかけずに大量に取得できる.

想定される用途

- クローデイン5を阻害して血液脳関門の機能を低下させる化合物をアッセイできる。
- 化合物の一次スクリーニングに本細胞を用いることもできる。
- 同じ手法により、クローデイン5に限らず、特定のクローデインサブタイプの阻害剤をスクリーニングすることができる。

実用化に向けた課題

- 薬物送達の効率とタイトジャンクションの機能阻害による副作用のバランスを検討する必要がある。
- クローデイン5の機能を阻害する化合物が得られたとして、それ自体が毒性を持たないことが必要となる。

企業への期待

- タイトジャンクションを標的にした血液脳関門の薬物送達促進剤の開発を目指す企業に利用していただきたい。
- ライセンス使用あるいは共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

● 発明の名称

クローディン欠損上皮細胞株の製造方法、クローディン欠損上皮細胞株、クローディン欠損上皮細胞株を含むタイトジャンクション機能抑制剤のスクリーニング方法、及びクローディン欠損上皮細胞株を含むタイトジャンクション機能抑制剤のスクリーニングキット

- 出願番号 : 特願2019-226655
- 出願人 : 大学共同利用機関法人
自然科学研究機構
- 発明者 : 古瀬 幹夫

お問い合わせ先

自然科学研究機構事務局研究協力課

TEL 03-5425-1316

FAX 03-5425-2049

e-mail nins-sangaku@nins.jp