

《若手研究者紹介》



生体関門輸送の分子機構とその破綻による 疾患発症機序の解明

伊 藤 慎 悟* Shingo Ito

熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）微生物薬学分野

1. はじめに

今年度、日本薬学会に入会した。そして、数カ月。若手研究者紹介の執筆依頼がやってきた。まだ、年会での発表も行っておらず、何で私が入会したことが分かったのだろうか？とその調査力に驚愕し、そして、私、まだ若手？と思いつつも、その依頼を引き受けてしまった。本稿では、これまでの私の研究人生を振り返り、「大学入学時には病院薬剤師になることを夢見ていた私が、なぜ研究室を転々としながら、現在、大学の教員として研究に励んでいるのか、そしてどんな未来予想図を描いているのか」を紹介させて頂くことにした。

2. 研究との出会い（京都薬大 学部・修士）

私が薬学部を志望した理由は、子供の頃、病院でたくさんの薬の効果を知っていて、それを調剤する薬剤師がかっこいいと思ったからである。そこで研究室配属の際には薬理の研究室をと考え、消化管の薬理研究をされていた岡部進先生主宰の応用薬理学教室を選択した。鮮明に覚えていることは、研究室に入って最初に行ったことがセレンディピティ（偶然の発見）の起源となる物語の日本語訳であった。

また、岡部先生は「胃の起源はなんだろう？」とよく楽しそうに自問自答されていた。今思えば、こうした一風変わった教育と自身の後ろ姿から、研究者として重要な偶然を幸運に変える力と研究への情熱について最初に教えてくれたのだと思う。そして岡部先生は熊本大学薬学部の出身である。私は現在熊本大学薬学部で教員をしており、不思議な縁を感じている。研究テーマは、薬物処理した酢酸胃潰瘍の組織中タンパク質発現・局在の解析であった。研究の詳細はあまり覚えていないが、自分が出した結果が論文として発表されたのは嬉しいものであった。

実は、大学の講義の中で一番興味があったのは山本昌先生が講義された「薬剤学」であった。特に、血液脳関門（BBB）の話が衝撃的であり、魅了された。これがBBBとの出会いであった。そこで、大学院修士課程では、薬剤学の中でも注目されていたトランスポーターの研究と臨床で活躍できる薬剤師の両立を目指して、この両方を満たした研究をされていた衛生化学教室の長澤一樹先生（当時助教授）のもとに移動した。そこで与えられた研究テーマは、*in vitro* BBB モデル細胞を用いたBBBにおけるクエン酸アルミニウム輸送の特性とその輸送に関わるトランスポーター分子の同定であった。培養細胞を用いた輸送実験の習得から始まり、ICP-MSによるアルミニウム測定法の確立を行いながら、同時に、1日3~4コマの大学院講義と膨大なレポートがあつてなかなか研究は進まなかった。二兎を追う者は一兎をも得ずという感じであった。しかし、この時に実験方法を1つ1つ原理から勉強して実験系を構築することができたし、BBBの研究に出会うことがで

*2006年3月東北大学大学院薬学研究科単位取得満期退学後、JST研究員。2006年7月博士（薬学）。2007年11月東北大学大学院薬学研究科助教。2010年4月NRC-IBS Research associate。2012年4月熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）助教。2018年1月同准教授。研究テーマ：輸送機構と疾患。趣味：写真撮影、サイクリング。連絡先：〒862-0973 熊本市中央区大江本町5-1 E-mail: ishing@kumamoto-u.ac.jp.

きた。私の研究を基盤として、数年後には論文として成果を発表することもできた。修士1年生の後期では京都桂病院にて6カ月間の臨床実務実習を行った。これは薬剤師の仕事进行现场で見ることができ、さらに、長澤先生の計らいで医師の回診にも参加することができたため、充実していた。この実務実習において、「薬剤師の仕事は調剤だけではないよ。これからの時代、病院で薬剤師として医師と対等にディスカッションして活躍する必要がある、そのためには「博士号」が必須だよ」と薬剤師や医師の先生から何回も話を聞いた。これがきっかけになり、病院で活躍できる薬剤師になるために「博士号」を取得しようと考えた。

3. 研究者としての鍛錬（東北大 博士・ポスドク・助教）

基礎研究は博士号取得のための博士課程3年間だけと考えていたので、それならば、BBBのトップレベルの研究をしてみようと考え、世界的に有名な寺崎哲也先生主宰の東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野に編入学した。これが人生の大きな転換となった。当時も今も寺崎研究室は研究レベルが非常に高く、研究室に入った当初はあまりの次元の違いに驚き、この研究室で本当に博士号を取得できる研究を行っていいのかと一抹の不安を覚えた。

研究テーマとして頂いたのが、「血液脳関門におけるアミロイドβペプチド(Aβ)の排出輸送機構」であった。当時、寺崎先生が開発されたBrain Efflux Index (BEI)法を用いて脳内で産生されるアルツハイマー病の原因物質であるAβの排出輸送機構を同定するという内容であった。研究を開始する時点で、既にlow density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1)とP-glycoprotein (P-gp)がBBBにおけるAβの排出輸送分子であると報告されていた。しかし、それまでの研究室で得られた知見から、寺崎先生は別の分子が関与するということを提唱され、その分子の同定を行うことになった。まず、BEI法を習得し、^[125I]標識されたAβの排出過程を解析できる実験系の確立から開始した。RI測定系として、γカウンターと液体シンチレーションカウンターの測定条件の設定から行い、^[125I]標識Aβのラット脳内からの消失における時間依存性を観察できた時は非常に嬉しかった。次に、脳内からの消

失におけるLRP-1やP-gpの関与を検討していったが、BEI法を用いた検討では、その寄与はほとんど見られなかった。当時、LRP-1はapolipoprotein E (apoE)などのLRP-1基質と複合体を形成したAβを脳内からBBBを介して消失させると報告されていた。そこで、どのような脳内AβがBBBを介して消失するかを明らかにするために、Aβの重合体やapoEなどの結合タンパク質との複合体を作成し、BEI法を用いて解析していったところ、Aβの単量体がBBBを介して排出輸送されることを見出した¹⁾。当時、過去の報告と一致しない結果が連続して出てきて、相当なストレスがあった。「過去の報告と私の実験結果の違いはどこにあるのか?」と考えた時に、1つに種差があった。そこで、マウスでBEI法による実験をしたいと考えるようになった。しかし、寺崎先生から「マウスは小さくてBEI法はできないよ」と言われた。そこで、やってみて駄目なら諦めようと思い、手元にある機器を組み合わせて試行錯誤したところ、1カ月くらいでマウスのBEI法を確立することができた。そして、^[125I]Aβのマウス脳内からの消失を解析できた²⁾。その報告をした際に、寺崎先生は最初信じられないという感じでデータを見られていたが、最後には褒めて頂いたことを記憶している。これが最初で最後のお褒めの言葉だったかもしれない。その後、マウスにおいてもBBBを介したAβ排出輸送にLRP-1の寄与は観察されなかった。一方で、大学院生であった藤吉正哉さん(現岡山大学)が血液脳脊髄液関門ではLRP-1を介した排出輸送が観察されることを見出されていた。過去の報告と脳内のAβ投与部位、脳内における物質の拡散等を統合して考えたところ、脳内Aβ排出におけるLRP-1の関与に関する新しい仮説を提唱した。

マウスのBEI法を確立したことで遺伝子改変動物における実験が可能になった。その一例が横田隆徳先生(東京医科歯科大学)との共同研究である。ビタミンEの輸送を担うα-tocopherol transfer protein (αTTP)ノックアウトマウスで脳内Aβ蓄積が増加するがその機序が分からなかった。そこでマウスBEI法を用いて解析したところ、14カ月齢のαTTPノックアウトマウスにおいてアミロイドβペプチドのBBB排出輸送は低下していることを見出した³⁾。貴重でかつ高齢のマウスを扱うということで大きな

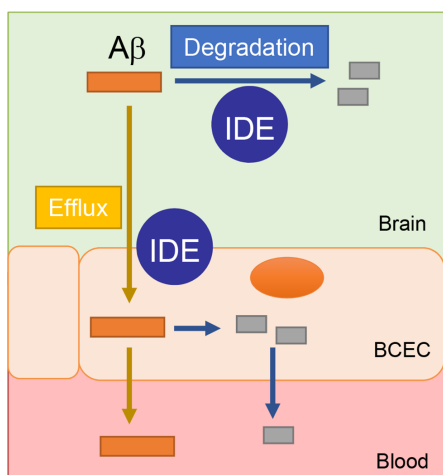


Fig. 1. Involvement of IDE in A β degradation and efflux clearance from the brain across the BBB. A β , amyloid- β peptide; BCEC, brain capillary endothelial cell; IDE, insulin-degrading enzyme.

ストレスを感じながら実験したが、成果が出た時の喜びは非常に大きなものであった。BBBにおけるA β の排出輸送に関わる分子同定に関して、マウスのBEI法とマウスBBBモデル細胞であるTM-BBB細胞を用いてA β の排出輸送分子の同定を行った結果、最終的にインスリン感受性であるインスリン分解酵素 (IDE) がBBBにおけるA β の排出輸送分子の1つであることを突き止めた。酵素が物質輸送をするという点はなかなか理解されなかったが、IDEは脳内のA β 分解と輸送と両方において寄与する面白い成果を見出すことができたと考えている (Fig. 1)。

寺崎先生は国際学会にて研究成果を発表する機会や、多くの著名な研究者と研究や世間話をする機会を与えて下さり、世界を相手に研究することの重要性を実感させてくれた。さらに、薬物送達の卒業生は企業や大学の研究職にて活躍されている方が多く、様々な学会に参加した際にお互いに情報交換ができる。寺崎先生の研究室に移動して得られた「出会い」はかけがえのない財産である。

4. 研究者としての醍醐味 (留学)

学位を取得した頃から寺崎先生や大槻純男先生 (現 熊本大学教授)、細谷健一先生 (富山大学教授) から「研究者として生きて行くな、必ず留学しなさい、あなたの人生観を大きく変える」と助言を受けた。そして、どこか留学先はないかと探していたところ、寺崎先生が主催された国際脳血管学会

(CVB2009) の懇親会において、特別講演をされた National Research Council Canada (NRC)-IBS の Danica Stanimirovic 先生と出会い、所属する部門で Research Associate を募集していると情報を頂いた。私の脳裏に「カナダ、大自然、行ってみたい」と浮かび、後日、「私、応募します」と連絡したら、トントン拍子で NRC-IBS に留学する機会を得た。

2010年4月から Danica 先生と同じ部門の Balu Chakravarthy 先生の研究室で Research Associate として研究をすることになった。研究テーマは、アルツハイマー病関連の内容で、A β に結合する新しいペプチドの動態や性能評価や神経細胞死を惹起する p75NTR の発現制御機構に関するものであった⁴⁾。実験はテクニシャンの方々に助けて頂きながら、なんとか成果を残すことができた。最近、Balu 先生のお話を伺う機会があり、当時の研究が前臨床段階まで進んでいて嬉しく思った。留学では、研究成果よりも、世界の文化、人の思考回路、異分野融合の重要性、価値観の違いなど、日本にいただけでは分からないことを知ることができた。さらに、留学中には、カナダの主要な観光地を訪問し、カナダの文化や自然の雄大さを実感することができ、充実した留学であった。

5. 研究者・教育者としてのめばえ (熊本大 助教・准教授)

留学の2年目を迎えて契約更新か、今度こそ病院の薬剤師になるかと悩んでいた頃、大槻純男先生 (当時東北大学) から熊本大学で主宰する研究室のセットアップをサポートして欲しいと連絡があり、そのオファーを受けた。2012年4月に熊本大学薬学部に赴任した時、研究室は質量分析器だけが稼働している状況であった。そこで、まずは実験室の使用目的や機器の配置等のハード面、次はソフト面の環境整備を行っていった。自由に何でもできる環境はある意味酷であり、時には「伝統」がある研究室が羨ましくもなった。この時、「最初が、肝心」ということを実感し、将来、独立することがあった際の良い勉強になった。現在、熊本大学に赴任してから7年が経ち、研究室員は約20名となり、大きな研究室に成長した。研究は、大槻先生が得意とするプロテオミクスを取り入れ、私の研究テーマである「生体関門輸送機能を基盤とした疾患メカニズムの解明と

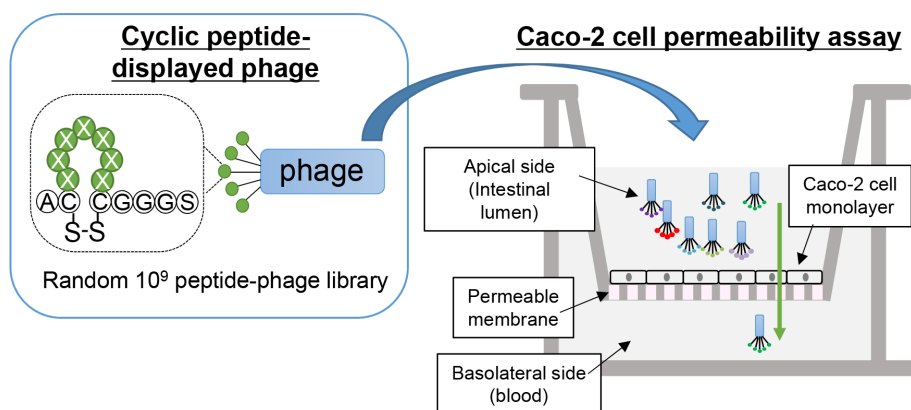


Fig. 2. Screening of cyclic peptide-displayed phage library by Caco-2 cell permeable assay.

治療への展開」について、糖尿病における BBB 障害と認知症発症機序の解明やオーファントランスポーターの生理・病態生理機能解析、クレアチントランスポーター遺伝子変異による脳クレアチン欠乏症群発症機序解明と治療薬開発、バイオ医薬品の生体関門突破を可能にする細胞膜透過ペプチド (CPP) の同定とドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用について研究を行っている。以下には、薬剤学に関連する内容として、バイオ医薬品を目的の組織へ送達させる CPP の同定に関する研究を紹介させて頂く⁵⁾。

生体関門は標的組織への治療薬の送達を妨げる大きな障壁となっている。特に、劇的な治療効果があるバイオ医薬品は分子量が大きいため生体関門を透過することができない。特に脳へのバイオ医薬品の送達はほとんど実現していない。CPP はマクロピノサイトーシスを介して高分子化合物の細胞内の内在化を促進させることから、高分子化合物の輸送には有効な方法である。しかし、これまでの CPP は高分子化合物の細胞外から細胞内への内在化を促進させるが、細胞内から細胞外への排出には寄与しないことが報告されていた。そこで CPP をバイオ医薬品の生体関門透過型 DDS に応用するためには、生体関門において細胞内への内在化と排出の両方を促進させる新規 CPP を同定する必要があると考えた。そこで、私は長さ約 1 μm の phage を高分子化合物のモデルとし、標的親和性と安定性に優れた環状ペプチドを提示した phage display を *in vitro* 透過実験によってスクリーニングすることで、高分子化合物の生体関門透過を可能にする CPP を同定す

る戦略を考案した (Fig. 2)。しかし、最初から生体関門の中で最も強固である BBB を標的とした CPP 同定研究は相当難しいだろうと予想されたため、透過実験で実績のあるヒト小腸上皮モデル細胞である Caco-2 細胞を用いた研究から開始することにした。Caco-2 細胞で研究を進めた結果、小腸透過性環状ペプチドを 3 種類同定することに成功した。特に、環状ペプチド DNP は長さ約 1 μm の phage の *in vitro* および *in vivo* 小腸透過性を顕著に促進させることや小腸における毒性が低いことを明らかにした。さらに、インスリンと環状ペプチド DNP の共投与はインスリンの小腸吸収を促進させて血糖降下作用を示すことを見出した。現在、患者 QOL を向上させるために創薬領域においてバイオ医薬品の小腸吸収を改善する DDS の開発は重要な課題である。この環状ペプチド DNP 研究の成果は新規小腸透過性 CPP として有望であり、経口投与型 DDS 開発への応用が期待され、実用化を目指した研究を展開しているところである。一方で、実験系の構築ができたことから、本方法を用いて BBB を突破する CPP の同定を行い、新規 CPP の同定に成功した。特許申請も行い、これから輸送分子機構と実用化に向けた研究を産学官で展開する予定である。

6. おわりに

ここまで、薬剤師になることを夢見ていた私が、現在、研究者として薬学研究を行っている一連の流れについて書かせて頂いた。今後の研究の未来予想図としては、「BBB を標的とした神経変性疾患治療薬の開発」であろう。これまでに BBB 機能不全が

神経変性疾患で観察され、発症や病態進行に重要な役割を果たしていることが分かってきているが、BBBを標的とした治療薬は今のところない。特に、BBBを標的とした認知症や小児の遺伝性神経変性疾患に対する治療薬を創薬したいと考えている。私が研究や人生に悩んでいた際に東北大学高度技術経営塾長である渡辺幸男先生から頂いた言葉が「天は必要な時に、必要な人に、必要な試練を与える」である。この言葉のおかげで、いろいろな苦難を乗り越えることができ、今があると思っている。また、どんな人と出会えるかが研究者人生に大きく影響を与えるため、これからも「出会い」を大切にしていきたい。

最後に、本研究を遂行するに当たり、ご指導・御協力を頂きました先生方に深謝するとともに、研究に御協力頂きました学生のみなさんにも感謝いたします。

引用文献

- 1) S. Ito, S. Ohtsuki, J. Kamiie, Y. Nezu, T. Terasaki, Cerebral clearance of human amyloid-beta peptide (1–40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes, *J. Neurochem.*, **103**, 2482–2490 (2007).
- 2) S. Ito, T. Ueno, S. Ohtsuki, T. Terasaki, Lack of brain-to-blood efflux transport activity of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) for amyloid-beta peptide (1–40) in mouse: involvement of an LRP-1-independent pathway, *J. Neurochem.*, **113**, 1356–1363 (2010).
- 3) Y. Nishida, S. Ito, S. Ohtsuki, N. Yamamoto, T. Takahashi, N. Iwata, K. Jishage, H. Yamada, H. Sasaguri, S. Yokota, W. Piao, H. Tomimitsu, T. C. Saido, K. Yanagisawa, T. Terasaki, H. Mizusawa, T. Yokota, Depletion of vitamin E increases amyloid beta accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **284**, 33400–33408 (2009).
- 4) S. Ito, M. Menard, T. Atkinson, C. Gaudet, L. Brown, J. Whitfield, B. Chakravarthy, Involvement of insulin-like growth factor 1 receptor signaling in the amyloid-beta peptide oligomers-induced p75 neurotrophin receptor protein expression in mouse hippocampus, *J. Alzheimer's Dis.*, **31**, 493–506 (2012).
- 5) S. Yamaguchi, S. Ito, M. Kurogi-Hirayama, S. Ohtsuki, Identification of cyclic peptides for facilitation of transcellular transport of phages across intestinal epithelium *in vitro* and *in vivo*, *J. Controlled Release.*, **262**, 232–238 (2017).