

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

## 助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	800 千円
研究代表者 : 赤沼 伸乙	所属 : 学術研究部薬学・和漢系	職位 : 准教授
研究題目 : 薬の網膜移行性を正当に評価可能な新規自己組織化 <i>in vitro</i> ツール開発とその有用性実証		

## 研究概要

加齢がリスクファクターの一つである網膜疾患に対する治療薬を開発する上で、「網膜への薬の移行を理解し、それを制御すること」は重要な課題である。一方、網膜への薬物分布に関与することが知られる内側血液網膜関門 (inner BRB) の薬物透過性を評価するための良質な *in vitro* ツールの開発は停滞している。Inner BRB の実体は網膜の毛細血管内皮細胞である。これまでに、網膜毛細血管内皮細胞株である TR-iBRB 細胞は *in vivo* inner BRB の膜タンパク質介在輸送機構をある程度保持しているものの (*J. Pharm. Sci.*, 101, 2596-605 (2012))、培養インサートへ培養した際に密着結合が不完全なために網膜への薬物移行を正しく評価出来ないことが問題として挙げられている (*Pharm. Res.*, 20, 1357-63 (2003))。近年、関門実体細胞は周囲の組織細胞からサポートを受けることで“関門としての完全性”を示すことが明らかにされてきている。研究代表者は予備的に TR-iBRB 細胞を、inner BRB サポート細胞である網膜ペリサイト株 (TR-rPCT 細胞) と網膜グリア細胞である Müller 細胞 (TR-MUL 細胞) の共存下、低吸着処理を施した培養器にて培養したところ、球状の細胞塊が形成されることを予備的に見出した。この自己組織化多細胞性スフェロイドは 2 日という短期間で調製可能なものであり、簡便かつ高精度での inner BRB を介した網膜への薬物分布評価に適用可能と考えられた。

本研究の目的は、「研究代表者が開発した”*in vitro* 細胞自己組織化 inner BRB (プチ網膜関門)”が網膜移行型薬物選定において有用であることを実証すること」である。このプチ網膜関門は国内外の網膜疾患創薬研究に対しブレイクスルーとなるポテンシャルを有しており、少子高齢化が進む現代における社会的要求性が高い網膜疾患治療薬創出に繋がると期待される。

## 成果要約

自己組織化 inner BRB 多細胞性スフェロイドを用い、各細胞マーカータンパク質を対象とした免疫染色を行った結果、中心部に Müller 細胞が位置し網膜ペリサイト株がその外側に、そして TR-iBRB 細胞がそれを覆うように位置することが示唆された。この細胞配置特性について、同じく毛細血管内皮細胞を実体とする血液脳関門のモデル細胞株群を用いて比較解析を行った。その結果、同様の培養方法にて、脳グリア細胞であるアストロサイトの細胞株が中心核を構成し、その表面を脳ペリサイト株が覆うと共に、最外殻は脳毛細血管内皮細胞株にて構成されるスフェロイドの構築に成功した。以上の結果から、本研究を通じて確立したスフェロイド培養・構築法は、inner BRB を含めた中枢神経系関門を構成する細胞群が多層構造化した細胞塊を調製することが可能であることが示唆された。

上記の細胞層構成から、本 inner BRB 多細胞性スフェロイド内への薬物の取り込みは循環血液から網膜への薬物輸送を反映していると考えられた。Inner BRB において薬物の網膜分布を制限することが知られる生体膜輸送体として P-糖タンパク質 (P-gp) が知られている。この P-gp の蛍光団標識基質である NBD-CSA を合成し、inner BRB スフェロイドにおける取り込みを解析した。その結果、NBD-CSA の本スフェロイド内への取り込みは P-gp 阻害剤共存によって有意に亢進した。また、*in vivo* 網膜への

促進的分布が示された **angiopep-2** について、本スフェロイド内へのエネルギー依存性の取り込みが示された。以上の結果から、本スフェロイドは *in vivo* inner BRB において循環血液-網膜間の薬物輸送を制御する機構を備えた、網膜への薬物分布を評価する上で有用な *in vitro* 解析ツールであることが示唆された。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p><b>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</b>  <b>[雑誌論文]</b>            1) Tajima K., <u>Akanuma S.</u>, Ohishi Y., Yoshida Y., Bauer B., Kubo Y., Inouye M., Hosoya K.; Freshly isolated retinal capillaries to determine efflux transporter function at the inner BRB. <i>J. Control. Release</i>, 343, 434-42 (2022)  <b>[学会発表]</b>            1) 今 秀輝、<u>赤沼 伸乙</u>、久保 義行、細谷 健一. 内側血液網膜関門における細胞膜透過性ペプチド <b>angiopep-2</b> 輸送. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会；2021 年 11 月 14 日；金沢（オンライン）            2) 小笠原 美希、<u>赤沼 伸乙</u>、久保 義行、細谷 健一. <i>In vitro</i> 多細胞性ラット血液脳関門スフェロイドの構築とその特性. 日本薬学会北陸支部第 133 回例会；2021 年 11 月 14 日；金沢（オンライン）            3) <u>赤沼 伸乙</u>、小笠原 美希、今 秀輝、久保 義行、細谷 健一. 条件的不死化ラット血液脳関門スフェロイドにおける密着結合及び薬物輸送担体の発現・機能. 日本薬物動態学会 第 36 回年会；2021 年 11 月 16 日～19 日；高崎（オンライン）            4) 小笠原 美希、<u>赤沼 伸乙</u>、今 秀輝、久保 義行、細谷 健一. ラット血液脳関門多細胞性スフェロイドモデルの確立. 日本薬学会第 142 年会；2022 年 3 月 25 日～28 日；名古屋（オンライン）            5) 今 秀輝、<u>赤沼 伸乙</u>、久保 義行、細谷 健一. 細胞膜透過性ペプチド <b>angiopep-2</b> 付加による内側血液網膜関門の物質透過性向上とその輸送機構解析. 日本薬学会第 142 年会；2022 年 3 月 25 日～28 日；名古屋（オンライン）</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p>区 分</p> <p><b>【物品費】</b>            実験動物（ラット）            実験試薬・培地            プラスチック製消耗品            金属・ガラス製実験器具</p> <p><b>【旅費】</b>            ありません。</p> <p><b>【謝金】</b>            ありません。</p> <p><b>【その他】</b>            ありません。</p> <p>合計</p>	<p>執行額（円）</p> <p>220,638 円            226,792 円            322,625 円            29,945 円</p> <p>800,000 円</p>	<p>備 考</p>