



Title	血液脳脊髄関門の機能保護を介した中枢神経保護薬の開発
Author(s)	鈴木, 裕貴
Description	配架番号 : 2539
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14074号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14074
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94630
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Suzuki.pdf



学 位 論 文

血液脳脊髄関門の機能保護を介した中枢神経保護薬の
開発

(Development of novel neuroprotection drugs for CNS
trauma by targeting preservation of blood-brain spinal cord
barrier function)

2 0 2 0 年 3 月

北 海 道 大 学

鈴 木 裕 貴

Yuki Suzuki

学 位 論 文

血液脳脊髄関門の機能保護を介した中枢神経保護薬の
開発

(Development of novel neuroprotection drugs for CNS
trauma by targeting preservation of blood-brain spinal cord
barrier function)

2020年3月

北 海 道 大 学

鈴 木 裕 貴

Yuki Suzuki

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	7 頁
緒言	8 頁
方法	11 頁
結果	21 頁
考察	44 頁
総括および結論	46 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に現在投稿中である。

Yuki Suzuki, Ken Kadoya, Shinsuke Nakagawa, Takeshi Endo, Rufei Yuan, Tsuyoshi Asano, Katsumi Maenaka, Norimasa Iwasaki

Development of High-throughput Assay to Screen Potential Drugs to Protect Blood-Brain Spinal Cord Barrier Identifies Berberine as Neuroprotection Drug for CNS trauma

Journal of Clinical Investigation (2019 年 11 月 投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 鈴木裕貴、角家健、遠藤健、岩崎倫政
脳血管内皮細胞保護効果を持つ化合物探索のための High-throughput screening assay の確立
第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年 10 月 26 日-27 日、沖縄宜野湾市
2. Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Iwasaki N.
Establishment of high-throughput assay for identifying potential compounds to protect brain endothelial cells from oxidative stress.
Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018, March 10-13, 2018, New Orleans, LA, USA.
3. 鈴木裕貴、角家健、中川慎介、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、岩崎倫政
新規 High-throughput screening assay が同定した Berberine の血液脳脊髄関門保護薬としての可能性
第 41 回日本神経科学大会、2018 年 7 月 26 日-29 日、神戸市
4. Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufei Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N.
Newly developed high-throughput screening assay identifies potential drugs to protect blood-brain barrier.
21st International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers,

September 19-21, 2018, Arad, Romania

5. Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N.
Newly developed high-throughput screening assay identifies Berberine as a potential drug to protect blood-brain barrier from toxic stresses.
Neuroscience 2018, November 3-7, 2018, San Diego, CA, USA
6. Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N.
Newly developed high-throughput screening assay identifies potential drugs to protect blood-brain barrier
1st Mini-symposium on the blood-brain barrier from basic to clinical research, March 6-7, 2019, Nagasaki, Japan
7. 鈴木裕貴、角家健、中川慎介、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、岩崎倫政
ドラッグリポジショニングによる脊髄損傷治療薬の開発：血液脊髄関門機能保護
第 92 回日本整形外科学会学術総会、2019 年 5 月 9-12 日、横浜市
8. Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Nakagawa S, Iwasaki N.
Drug repositioning for new CNS injury treatment: Targeting on protection of blood-brain barrier
The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 10-13, 2019, Porto, Portugal
9. 鈴木裕貴、角家健、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、中川慎介、岩崎倫政
血液脊髄関門機能保護に注目した脊髄損傷治療薬の開発
第 38 回日本運動器移植・再生医学研究会、2019 年 9 月 28 日、東京
10. 鈴木裕貴、角家健、中川慎介、遠藤健、松居祐樹、袁儒非、浅野毅、岩崎倫政
ドラッグリポジショニングによる脊髄損傷治療薬の開発：血液脊髄関門機能保護
第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会、2019 年 10 月 17-18 日、横浜市

要旨

【背景と目的】

脳・脊髄損傷などの中枢神経損傷を受傷すると、一次損傷に引き続き二次損傷が起こり、高度機能障害が生じる。しかし、中枢神経の再生能力は低く、近年の医療の発展にも関わらず、未だ有効な治療方法はなく、新規治療方法の開発が求められている。本質的治癒のために、組織再生が必要であることは論を待たないが、障害を最小限にする二次損傷の軽減もまた同等に重要である。二次損傷は、細胞障害性物質および炎症細胞が損傷周囲組織へ浸潤し、それらが、浮腫、酸化、炎症などを引き起こし、アポトーシス、ネクローシスなどの機序により、神経細胞およびグリア細胞の死とそれに付随した脱髄が起きる複合的な現象であるが、血液脳脊髄関門（Blood-Brain Spinal Cord Barrier : BBSCB）の破綻が、これらの細胞障害性物質、および炎症細胞の浸潤を拡大させる。

これまでの二次損傷抑制に関する研究は、炎症反応や酸化作用の抑制など、細胞毒性を有する現象を抑制するもの、あるいは神経細胞保護薬によって、それらの毒性に対する、神経細胞の耐性を上げようとするものであった。これらの介入は、動物実験ではある程度の効果を示しているが、臨床的な効果を示すまでには至っていない。一方、BBSCB の破綻を防げれば、二次損傷を軽減できることがわかっていたが、その具体的方法は未だ確立されておらず、血管内皮細胞保護薬に関する研究もほとんどなかった。

以上より、我々は BBSCB に着目し、その主要構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞の保護薬は BBSCB の破綻を防ぎ、外傷性中枢神経損傷後の二次損傷を防ぐとの仮説を立て、一連の研究を行った。本研究の目的は、1) 脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤探索のための high-throughput screening assay (HTSA) を確立すること、2) 新規 HTSA を用いた *in vitro* スクリーニングにより候補化合物を同定すること、さらに 3) 候補化合物の効果を *in vivo* により検証することである。

【方法】

1) HTSA 確立の条件検討をするため、まずヒト脳血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) を 96 well plate で培養し、過酸化水素 (H_2O_2) を細胞障害性負荷として添加した。 H_2O_2 の濃度が、細胞活性、細胞毒性、細胞死に与える影響を、各々 PrestoBlue、LDH assay、Propidium Iodide (PI) 染色によって評価し、HTSA に最適な負荷条件を確定した (各 N=3/群)。さらに、スクリーニング薬剤の溶解に使用する Dimethyl sulfoxide (DMSO) の細胞活性に影響を検証した (N=9/群)。

- 2) HTSA の妥当性、信頼性を評価するため、自動分注装置を使用して最適な負荷条件を再現し、HTSA の評価基準である、Z'-factor, signal/background ratio (S/B ratio) , coefficient of variation (CV) を算出した (N=4×3sets/群)。
- 3) 新規 HTSA を用いて、本学が保有する既存薬 1,600 種のスクリーニングを実施した。2SD 以上の細胞活性を示したヒット候補薬剤には再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性があったものをヒット薬剤とした。ヒット薬剤のうち、早期臨床応用可能な薬剤を選定し、候補薬剤として更なる試験を進めた。
- 4) 候補薬剤の濃度依存性を、候補薬剤を H₂O₂ 負荷と同時に投与して検討した (N=4/群)。また、異なる細胞傷害性負荷として無酸素・無糖 (oxygen-glucose deprivation; OGD) 条件下での薬剤の血管内皮細胞保護効果を評価した (N=5/群)。
- 5) 候補薬剤の in vitro BBSCB 機能保護効果を検討するため、ラット脳初代培養細胞による in vitro BBSCB 共培養モデルを作製し、OGD 負荷条件下に、経上皮電気抵抗 (Trans-endothelial electrical resistance: TEER) と sodium fluorescein (Na-F) 透過性を測定した。また、Western blotting 法で Tight-junction (TJ) protein の発現を検討した。
- 6) 中枢神経損傷後の BBSCB 機能保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスの、左大脳皮質損傷 (外傷性脳損傷モデル)、または第四頸椎高位の脊髄後索損傷 (脊髄損傷モデル) を wire-knife を使用して作成した。候補薬剤または生理食塩水を損傷作成前日と損傷直後に投与し、損傷部周囲の IgG 漏出範囲を組織学的に定量した (N=6/群)。
- 7) 中枢神経損傷後の神経保護効果を検討するため、成体雄性 C57BL/6 マウスに前述と同様の脊髄損傷モデルを作成し、候補薬剤または生理食塩水を 1 週間投与した。8 週後に損傷範囲と神経細胞死の範囲を組織学的に定量した。また、DigiGait 歩行解析システムを使用した歩行解析を行った (N=12/群)。
- 8) 新規 HTSA を用い、本学が保有する北大オリジナル化合物 2,385 種のスクリーニングを行った。既存薬の場合と同様に、2SD 以上の細胞活性を示したヒット候補化合物は再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性があったものをヒット化合物とした。

【結果】

- 1) H₂O₂ 濃度 0.50 mM 以上、負荷時間 6 時間で、脳血管内皮細胞死を観察した。一方、細胞活性は 0.35 mM から低下を開始し、細胞毒性は、0.40 mM から上昇を示し、PrestoBlue を使用した細胞活性が、一番早期に細胞の変化を検知することが判明した。
- 2) 自動分注装置を用いた HTSA で、H₂O₂ 濃度 0.45 mM において、Z'-factor が 0.75、S/B ratio は 2.9、CV が 4%と HTSA の妥当性、信頼性の基準 (Z'-factor ≥ 0.5、S/B ratio ≥ 2、CV ≤ 0.1) を最も高い水準でクリアした。

- 3) 1,600 の既存薬剤をスクリーニングした結果、ヒット薬剤は 44 種 (2.8%)、さらに再現性試験によって、37 種 (2.3%) となった。ヒット薬剤のうち、安全かつ安定した国内承認薬剤である Berberine は早期臨床応用に有利と考え、優先的に更なる試験に進めた。
- 4) Berberine は H_2O_2 負荷との同時投与において、濃度依存的に脳血管内皮細胞保護効果を有した。さらに OGD 条件下でも保護効果を示した。
- 5) Berberine は *in vitro* BBSCB モデルで、OGD 負荷条件下の TEER を有意に増加させ、Na-F 透過性を有意に低下させた。さらに ZO-1, VE-cadherin, occludin, claudin-5 の発現を有意に上昇させた。このことは、Berberine は *in vivo* BBSCB の機能保護効果があることを示している。
- 6) Berberine 投与群と Control 群を比べ、外傷性脳損傷モデル、脊髄損傷モデルともに損傷の大きさには差はなかったものの、Berberine 投与群で損傷部周囲の IgG 漏出範囲が有意に小さかった。このことは、Berberine は中枢神経損傷モデルにおいて、BBSCB の機能保護効果があったことを示している。
- 7) Berberine 投与群と Control 群を比べ、頸髄損傷部の大きさには差はなかったものの、損傷範囲と神経細胞死の範囲は Berberine 投与群で有意に小さかった。また、歩行解析では、両群間で粗大運動に関するパラメーターには差を認めなかったが、協調運動に関するパラメーターで Berberine 投与群が有意に改善を認めた。
- 8) 北大オリジナルの 2,385 化合物をスクリーニングした結果、ヒット化合物は 59 種 (2.5%) あったが、再現性試験を経て 45 種 (1.9%) に絞り込まれた。また、これらの化合物のうち、化合物 A の類縁体の一群が 7 剤あった。

【考察】

本研究では、まず脳血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤を探索するための HTSA を確立した。一般的に HTSA の開発には、高い効率、再現性、信頼度、感度が必要であり、特に細胞を用いた場合は、再現性が低いため確立は困難とされている。しかし、本研究では、徹底的な単純化と条件検討を行い、専門機器の使用、さらに創薬センターなどの専門家と連携することで、本 HTSA の開発に成功した。また、本 HTSA は、1) ヒト細胞株の使用、2) 多くの中枢神経疾患で共通する酸化ストレスの使用、3) 血管内皮細胞の使用の 3 点により、中枢神経外傷だけでなく、その他の中枢神経疾患でも BBSCB 保護効果を有する薬剤を探索できる可能性がある。

我々は、新規 HTSA を用いて、実際に既存薬 1,600 種のスクリーニングを行い、Berberine を候補薬剤として同定した。Berberine は *in vitro*、*in vivo* の両方のモデルにおいて BBSCB 保護効果を示し、さらにマウス脊髄損傷モデルでの神経保護効果を示した。これらの事実は、新規 HTSA が BBSCB 保護薬に加え、BBSCB 保護効果を介した

神経保護薬のスクリーニングに有用であることを示している。

本研究で同定された候補薬剤は、既存薬であるため安全性が担保されており早期臨床応用が可能である。一方、北大オリジナル候補化合物は、臨床応用に向けた最適化、代謝動態の解明、至適濃度の確定、安全性の確認などが必要であるが、既存薬以上の効能、高い安全性と汎用性を持つ可能性があり、研究開発を継続する価値があると考ええる。

【結論】

我々は、脳血管内皮細胞保護効果を持つ化合物探索のための HTSA を確立した。新規 HTSA を用いたスクリーニングにより、Berberine と化合物 A を含む、37 薬剤と 45 化合物がヒットした。Berberine は in vitro BBSCB 破綻モデルおよび脳外傷、脊髄損傷の両モデルにおいて BBSCB 保護効果を示し、さらに脊髄損傷モデルにおいて神経保護効果を示した。我々が開発した HTSA は BBSCB 保護を介した新規中枢神経保護薬の探索に有用であり、Berberine が中枢神経外傷に対する新規神経保護治療薬となる可能性が示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA	Analysis of variance
BBSCB	Blood-brain spinal cord barrier
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EBM	Endothelial cell growth medium
EC	Endothelial cell
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HTS	High-throughput screening
HTSA	High-throughput screening assay
LDH	Lactate dehydrogenase
MBP	Myelin basic protein
Na-F	Sodium fluorescein
N. S.	Not significant
OGD	Oxygen-glucose deprivation
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
RBEC	Rat brain endothelial cells
Reox	Reoxygenation
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SD	Standard deviation
TBS	Tris buffer saline
TCS	Tissue collecting solution
TEER	Transendothelial electrical resistance
TJ	Tight junction

緒言

脳・脊髄損傷などの中枢神経損傷を受傷すると、一次損傷に引き続き二次損傷が起こり、高度機能障害が生じる。しかし、中枢神経の再生能力は低く (Ramon y Cajal, 1928)、近年の医療の発展にも関わらず、未だ有効な治療方法はなく、新規治療方法の開発が求められている (Chen et al., 2017; Salewski et al., 2015)。

外傷性中枢神経損傷では、機械的な一次損傷に引き続き、生体反応による二次損傷が起こる (Borgens and Liu-Snyder, 2012; Galgano et al., 2017)。本質的治癒のために、組織再生が必要であることは論を待たないが、障害を最小限にする二次損傷の軽減もまた同等に重要である。二次損傷は、細胞障害性物質および炎症細胞が損傷周囲組織へ浸潤し、それらが、浮腫、酸化、炎症を引き起こし、アポトーシス、ネクローシス、ネクロプトーシスなどの機序により、神経細胞およびグリア細胞の死とそれに付随した脱髄が起きる複合的な現象である (Oyinbo, 2011; Prakash and Carmichael, 2015)。血液脳脊髄関門 (Blood-Brain Spinal Cord Barrier : BBSCB) は、中枢神経実質と血管内を隔て、イオンや分子、タンパク、細胞などの移動を制御しながら、毒性をもつ物質の流入を防ぎ、中枢神経における恒常性を維持している (Abbott et al., 2010; Bartanusz et al., 2011)。BBSCB は、血管壁を形成する血管内皮細胞、BBSCB の機能制御や維持を行う周皮細胞 (ペリサイト)、血管周囲を被覆するアストロサイトからなる (Abbott et al., 2010; Daneman and Prat, 2015; Saunders et al., 2014; Sifat et al., 2017; Sweeney et al., 2016; Wong et al., 2013)。BBSCB の破綻が起こると、血管内から中枢神経実質内に様々な免疫細胞やサイトカインなどの炎症性物質などが流入、その浸潤を拡大させる (図1)。

これまでの二次損傷抑制に関する研究は、炎症反応や酸化作用の抑制など、細胞毒性を有する現象を抑制するもの、あるいは神経細胞保護薬により、それらの毒性に対する、神経細胞の耐性を上げようとするものであった (Onose et al., 2009)。これらの介入は、動物実験ではある程度の効果を示したが、臨床的な効果を示すまでには至っていない。一方、BBSCB の破綻を防げれば、二次損傷を軽減できることがわかっていたが、その具体的方法は未だ確立されておらず、血管内皮細胞保護薬に関する研究もほとんどなかった (Bartanusz et al., 2011; Cohen et al., 2009; Rosenberg, 2012; Shlosberg et al., 2010; Sorby-Adams et al., 2017)。以上より、我々はBBSCBに着目し、その主要構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞の保護薬は、BBSCB の破綻を防ぎ、外傷性中枢神経損傷後の二次損傷を防ぐという仮説を持つに至った。

創薬は大まかに、治療ターゲットとなるメカニズムや標的分子に着目して、薬剤の探索や創出を行う手法のほか、ヒトでの安全性と体内動態が十分証明されている既存薬の新しい薬理効果を発見し、別の疾患治療薬として開発するドラッグリポジシ

ョニングの2つがある (Xue et al., 2018)。当然、ドラッグリポジショニングの方が、早期かつ低コストで臨床応用に発展させやすい一方、一から創薬する方が、革新性に富むが、リスク、時間、費用がかかる。今回、脳脊髄血管内皮細胞の保護薬を開発するにあたり、まずは、多数の既存薬や化合物のスクリーニングを迅速に行う High-throughput screening assay (HTSA) を開発することが重要と考えた。HTSA とは、ロボットなどを使用することで、スクリーニングを半自動化し、大量のサンプルを比較的短時間に分析する手法である (Entzeroth et al., 2009; Mayr and Fuerst, 2008)。

本研究では、以下の3つの目的を達成することにより、BBSCB の主要構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞の保護薬は、BBSCB の破綻を防ぎ、外傷性中枢神経損傷後の二次損傷を防ぐという仮説を検証した。

- 目的1 脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤、化合物探索のための HTSA を確立する
- 目的2 新規 HTSA を用いた *in vitro* スクリーニングにより候補薬剤・化合物を同定する
- 目的3 候補薬剤の効果を *in vivo* により検証する

一連の研究によって、脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ化合物探索のための HTSA が確立され、新規 HTSA を用いた既存薬 1,600 種と北大オリジナル化合物 2,385 種のスクリーニングを行った。同定薬剤の1つである Berberine は *in vitro*、および *in vivo* において BBSCB 保護効果を示し、脊髄損傷モデルにおいても神経保護効果を示した。これらの事実は、我々が開発した新規 HTSA は BBSCB 保護を介した新規中枢神経保護薬の探索に有用であり、さらに、Berberine は BBSCB 保護を介した新しい中枢神経損傷治療薬となりうることを示している。ここに、これらの研究の詳細を報告する。

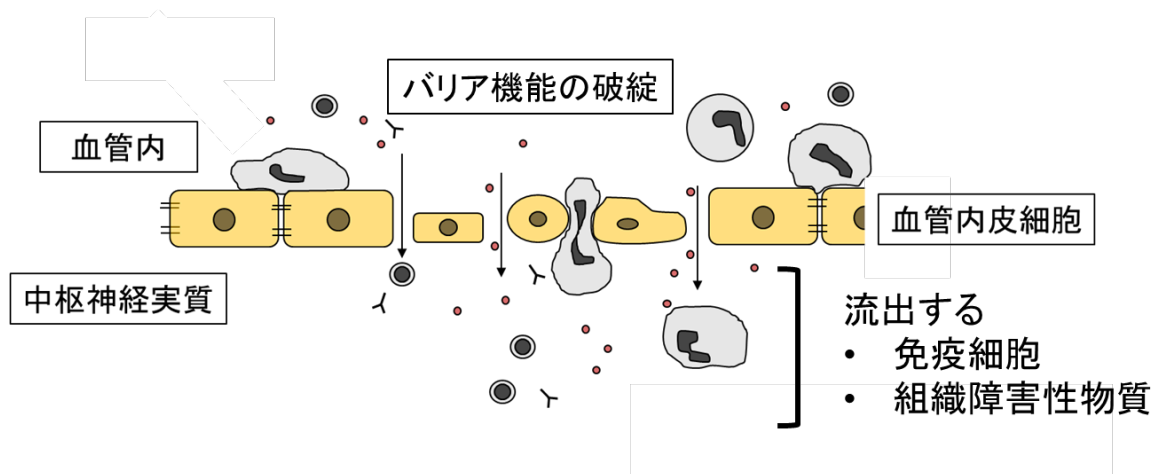


図 1. BBSCB 破綻の模式図

BBSCB は主に血管内皮細胞とグリア細胞により構成され、血管内と中枢神経実質を隔てるバリア機能を有する。BBSCB の破綻が起こると、血管内から中枢神経実質内に様々な免疫細胞やサイトカインなどの炎症性物質などが流入し、組織障害の拡大に繋がる。外傷性中枢神経損傷では、BBSCB 破綻が二次損傷に大きく関与しており、このバリア機能の破綻を予防することが重要である。我々は、BBSCB の主要構成細胞である血管内皮細胞に注目し、研究を行った。

方法

1. ヒト脳血管内皮細胞を用いた HTSA の確立

1-1)細胞培養

ヒト脳血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) は Pierre-Olivier Couraud 氏 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale Inserm, Paris, France) の許可のもと、中川慎介氏 (長崎大学医歯薬学総合研究科) より提供して頂いた。過去と同様の手法で細胞株を培養し (Weksler et al., 2005)、第 32 継代から第 35 継代までの細胞を実験に用いた。各実験で用いる場合は、type I collagen (0.1mg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) でコーティングした 96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well で播種した。培地は、endothelial cell basal medium-2 (EBM-2; Lonza, Basel, Switzerland) (成長因子不含、FBS 2.5%含有) を各 well 80 μ L で用いた。24 時間細胞培養し接着させた後、EBM-2 20 μ L を添加した。なお、HTSA の確立に際しては同培地を、実際のスクリーニング (HTS) では薬剤を溶かした培地を、この時点で投与した。さらに 24 時間経過した後、過酸化水素 (H_2O_2 ; Wako, Tokyo, Japan) を添加した培地を 20 μ L 添加し、6 時間後に後述の 3 つの評価法を用いて細胞の状態を評価した。

1-2)細胞死の評価

死細胞率は propidium iodide (PI; Dojindo Molecular Technologies, Japan)、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) で染色し評価した。hCMEC/D3 に H_2O_2 負荷をかけた後、PI (1:1000) を添加した Phosphate buffered saline (PBS) を培地に交換し、5 分間静置した。その後、4% Paraformaldehyde (PFA; Nacalai tesque, Osaka, Japan) で 15 分間固定してから DAPI (1:1000) を添加した PBS で 5 分間浸した。蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Japan) を用いて各 well の中央部を 40 倍で撮影した。PI、DAPI 陽性細胞数を計測し、DAPI 陽性細胞数に対する PI 陽性細胞数の割合を死細胞率 (%) として検討した (N=4/群)。各 well で 200 cells 以上を数えた。

1-3) 細胞活性の評価

細胞活性の評価には resazurin の還元を利用した PrestoBlue (Invitrogen, CA, USA) を使用した。 H_2O_2 負荷後、PrestoBlue を各 well に 13 μ L 添加し、1.5 時間 37°C で培養した。吸光度測定には Benchmark Plus (Bio-Rad, CA, USA) を用い、570 nm と 600 nm の波長の吸光度を計測した。細胞活性の算出には、測定した 570 nm の吸光度を、600 nm の吸光度値と、細胞のない培地のための control well (ブランク) の

平均値で補正した後、負荷のない細胞の活性を 100%として算出した (N=4/群)。

1-4) 細胞毒性の評価

細胞毒性の評価には LDH (Lactate dehydrogenase) assay (Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST, Dojindo Molecular Technologies, Japan) を用いた。細胞負荷後、各 well に working solution 100 μ L を添加し、30 分間室温で静置した。その後、stop solution 50 μ L を添加し、各 well の 490 nm 波長を吸光度計で測定した。細胞毒性の値は、各 well の吸光度値を、lysis buffer を添加したものを 100%として細胞毒性を算出した。(N=4/群)

1-5) HTSA の確立

HTSA に最適な負荷条件、評価方法の妥当性、信頼性を評価するため、半自動ピペッター (Pipettor 230, MSTechnos, Japan) を使用して最適な負荷条件を再現し、HTSA の評価基準である、Z'-factor, signal/background ratio (S/B ratio), coefficient of variation (CV) を算出した (N=4 $\times$ 3 sets/群)。

1-6) Dimethyl sulfoxide (DMSO) の細胞毒性評価

HTSA に最適な負荷条件、評価方法を確定した後、スクリーニング薬剤の希釈に DMSO (Wako, Japan) を使用するため、DMSO の細胞に対する毒性を評価した。まず、hCMEC/D3 を 96 well plate に 5,000 cells/well で播種した。この時、血清不含培地 80 μ L/well を使用した。24 時間培養して接着させた後、DMSO 含有培地 (成長因子不含、FBS 2.5%含有) を 20 μ L/well 添加した。DMSO 濃度は 0~5%に設定し、細胞死、細胞毒性、細胞活性のうち、最も HTSA に有用な評価方法を用い、hCMEC/D3 への影響を検討した (N=9/群)。

2. HTS

新規 HTSA を用いて、本学創薬研究教育センターが所有するライブラリー既存薬 1,600 種のスクリーニングを実施した。すべての薬剤を DMSO に溶解し、スクリーニング時の薬剤濃度はすべて 10 μ M に設定した。スクリーニングの薬剤や培地添加などの全行程は半自動ピペッター (Pipettor 230, MSTechnos, Japan) を用い、96 well plate で行った。各プレートには、薬剤 80 種 (各 N=1) に加え、細胞播種と H₂O₂ 負荷の有無の組み合わせで control を配置した。細胞負荷は H₂O₂ 濃度 0.45 mM で 6 時間とし、PrestoBlue で各 well の細胞活性を評価した。薬剤を添加した細胞の細胞活性が、プレートの 2 標準偏差 (standard deviation; SD) を超えた場合、ヒット候補薬剤として定義した。次に、ヒット候補薬剤には同様の手順で再現性

試験を3回行い、少なくとも1回以上再現性があったものをヒット薬剤とした。なお、HTSで行った全プレートの平均2SD細胞活性値を算出し、再現性試験のカットオフ値とし、これを超えた場合に再現性ありと判断した。ヒット薬剤のうち、早期臨床応用可能な薬剤を選定し、候補薬剤として更なる試験を進めた。

3. 濃度依存性・同時負荷試験

HTSの候補薬剤の濃度依存性を、 H_2O_2 負荷と同時に投与して検討した (N=4/群)。Type I collagen (0.1 mg/mL) でコーティングした 96 well plate に hCMEC/D3 5,000 cells/well を EBM-2 培地 (成長因子不含、FBS 2.5%含有) とともに播種した。48 時間経過後、候補薬剤含有培地を 20 μL 、 H_2O_2 含有培地を 20 μL 添加した。6 時間後、PrestoBlue を 13 μL 添加して細胞活性を評価した。候補薬剤の濃度設定は、0 μM , 2 μM , 10 μM , 50 μM , 250 μM で設定した。なお、 H_2O_2 負荷のない条件を 100% として細胞活性を算出した。

4. 無酸素・無糖負荷 (Oxygen-glucose deprivation; OGD) 試験

これまでの実験では、 H_2O_2 による酸化ストレスに対する薬剤効果をみていたが、異なる細胞傷害性負荷での評価をするため、OGD 負荷条件下 (Cowan and Easton, 2010; Sommer, 2017) での薬剤の血管内皮細胞保護効果を評価した。Type I collagen (0.1 mg/mL) でコーティングした 96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well で EBM-2 培地 (成長因子不含、FBS 2.5%含有) とともに播種し、24 時間細胞培養し接着させた。候補薬剤含有または control の同 EBM-2 培地を 20 μL 添加した。さらに 24 時間経過後、候補薬剤含有または control の PBS 100 μL に培地を交換し、BIONIX-1 hypoxia culture kit (Sugiyamagen, Tokyo, Japan) (Jacob A JNC 2015) を用いた無酸素条件で 6 時間負荷をした。OGD 負荷後、PrestoBlue を 11 μL 添加し細胞活性を評価した。なお、normoxia 条件の control を細胞活性 100% として各条件の細胞活性を算出した。

5. 初代培養細胞を用いた BBSCB の機能試験

次に我々は、候補薬剤の BBSCB 機能保護効果を検討するため、ラット脳初代培養細胞を用いることとした。本実験では、ラット脳脊髄血管内皮細胞 (RBEC: rat brain endothelial cells)、ペリサイト、アストロサイトの 3 種類の細胞で構成される重層構造をもつ立体的な in vitro BBSCB 共培養モデルを作製した (図 2)。

5-1) ラット脳初代培養細胞

RBEC の初代培養は、過去の報告と同様に行った (Deli, 1997; Nakagawa et al., 2009; Nakagawa et al., 2007)。3 週令ラットから得た脳組織を 1cm^3 以下に細断し、type II collagenase (1 mg/ml, Worthington Biochemical Corp., USA) および DNase (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え 37°C で 1.5 時間振盪して酵素処理した。得られた細胞ペレットの毛細血管片に、collagenase-dispase (1 mg/ml, Roche Applied Sciences, Switzerland) および DNase (6.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、 37°C , 45 分間で処理をした。RBEC の細胞ペレットに 33% Percoll (Pharmacia, Sweden) を加え分離し、毛細血管片含有層を採取し、これを type IV collagen (0.1 mg/ml) および fibronectin (0.1 mg/ml) でコーティングした 35 mm プラスチック皿に播種した (Day 0)。RBEC は、RBEC I 培地 (DMEM/F12, 10% fetal bovine plasma derived from serum (PDS) (Animal Technologies, Inc., USA), basic fibroblast growth factor (bFGF, Roche Applied Sciences, 1.5 ng/ml), heparin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), insulin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), transferrin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sodium selenite (5 ng/ml) (insulin–transferrin–sodium selenite media supplement), gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), puromycin (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) で培養した。Day 3 以降は、細胞は puromycin を除いた RBEC I 培地 (RBECII 培地) に交換した。培養細胞が 80% confluent に達した段階で、精製された内皮細胞を Trypsin (0.05% w / v) - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (0.02% w / v) 溶液で短時間処理して継代した (Day 4)。

ラット脳由来アストロサイトは、Nakawaga らの報告に基づいて準備した (Nakagawa et al, 2009)。新生 Wister ラットの脳皮質片をアストロサイト培養培地 (10% ウシ胎児血清含有 DMEM) の中で機械的に分離し培養フラスコに播種した。1 型アストロサイトを得るために、confluent になった培養フラスコを 37°C で一晩振盪し、浮遊細胞を採取し培養した。アストロサイトの純度はグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) の免疫染色で確認し、CELLBANKER (Zenoaq, Koriyama, Japan) で凍結保存した。第 2 継代の細胞を使用した。

ラット脳由来のペリサイトは、Nakawaga らの報告に基づいて準備した (Nakagawa et al., 2009)。前記と同様の方法で RBEC を準備し、Percoll で分離した後、RBEC をコーティングされていないプラスチック皿に 10% FBS 含有 DMEM とともに播種した。培地交換は 3 日ごとに 2 週間交換した。ペリサイトは、その大きなサイズと分岐形態、 α -平滑筋アクチンの陽性免疫染色、NG2 コンドロチン硫酸プロテオグリカン、von Willebrand 因子および GFAP 染色の有無により識別した。ペリサイトとアストロサイトは、CELLBANKER で凍結保存した。

5-2) In vitro BBSCB 共培養モデル

RBEC を用いた In vitro BBSCB 共培養モデルは、過去の報告と同様に作成した (Deli et al., 2005; Deli, 1997; Nakagawa et al., 2009; Nakagawa et al., 2007; Takeshita et

al., 2014)。24 well plate 用の Transwell の insert を上下反転させ、collagen をコーティングした insert 下側の polycarbonate 膜にペリサイトを半球状に乗せ (2.0×10^4 cell/cm²)、3 時間培養してペリサイトを接着させた。アストロサイトはプレートの底面に播種した (1.0×10^5 cell/cm²)。一晩かけて接着した後、collagen と fibronectin をコーティングした Transwell insert 上側のポリエステル膜に前述の RBEC を播種した (2.0×10^5 cell/cm²) (day 4)。BBSCB 共培養モデルには hydrocortisone 500 nM を含有した RBEC II 培地を用いた。

細胞傷害性負荷として、OGD6 時間と再酸素化 (Reox; Reoxygenation) 12 時間を行った。OGD 負荷には、hydrocortisone 275 nM を含有した DMEM / F12 培地 (糖・血清不含) を用い、Anaero Pack Kenki 5% (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japan) を使用して無酸素条件を作成した。OGD 負荷後、hydrocortisone 不含 RBEC I 培地 (FBS 2%含有) に交換し、候補薬剤を添加した。12 時間の Reox 後、経内皮電気抵抗 (Transendothelial electrical resistance: TEER) および sodium fluorescein (Na-F) 透過性で薬剤効果を評価した (N=7/群)。

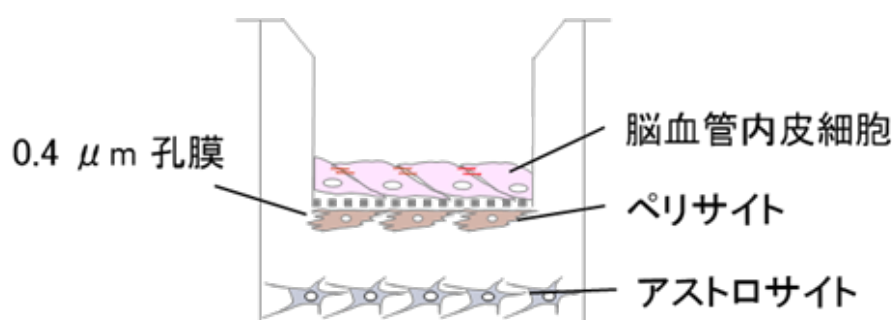


図 2. In vitro BBSCB 共培養モデルの概念図

ラット初代培養脳細胞を用い、BBSCB の構成細胞である脳脊髄血管内皮細胞、周皮細胞 (ペリサイト)、星状神経膠細胞 (アストロサイト) の 3 種類の細胞により立体的に構成される。

5-3) TEER

TEER は細胞層を通る Na⁺イオンの流れを反映し、バリア機能の評価に頻用されている (Srinivasan et al., 2015)。24 well plate を用い、Transwell insert で培養した RBEC を隔てた TEER を EVOM resistance meter (World Precision Instruments, USA)

を使用して測定した。無細胞での抵抗値を補正し、normoxia 条件の control を TEER 100%として算出した。

5-4) Na-F 透過性試験

過去の報告と同様に (Morofuji et al., 2010; Nakagawa et al., 2009)、Tight junction (TJ) を介した傍細胞輸送の指標である Na-F 透過性を、in vitro BBSCB 共培養モデルで評価した (Deli et al., 2005; Nakagawa et al., 2007)。細胞培養した前述の Transwell insert を 24 well plate に移し、4.5 g/L glucose、10 mM Hepes を含有した Dulbecco's PBS (assay buffer (pH 7.4)) 0.9 mL を添加した。Insert には、培地に替えて 10 µg / ml Na-F (分子量: 376 Da) 含有 0.5 ml buffer を添加した。Na-F 添加 15、45 分後、insert を assay buffer が入った別の well に移し、Wallac 1420 ARVO Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) で 535 nm (励起波長: 485 nm) を計測した。Na-F の透過性は透過係数 P_e (cm/s) で表し、フィックの法則に基づいて計算した (Youdim et al., 2003)。

5-5) Western Blot Analysis

OGD+Reox による RBEC の TJ タンパクの発現は、Western Blotting 法を用いて評価した (Takeshita et al., 2014)。RBEC (1.5×10^5 cells/cm²) を 48 well plate で培養し、前述の in vitro BBSCB 共培養モデル実験と同じ行程で OGD+Reox を行った。細胞負荷後、RBEC を RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, USA) で回収し、細胞溶解液を 15,000 g、4°C で 5 分間遠心分離した後に上清を収集し、BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) でタンパク濃度を測定した。各サンプルの等量のタンパク質を 4-15% TGX (Tris-Glycine eXtended) ゲル (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で分離し、HybondTM-P (Amersham, Buckinghamshire, UK) に移した。3% ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA) 含有 PBS に、Anti-claudin-5, anti-occludin, and anti-ZO-1 mouse monoclonal antibodies (1:5,000, Invitrogen, USA) と Anti-β-actin mouse monoclonal antibody (1:10,000, Sigma-Aldrich) を添加した。免疫反応性バンドを明瞭に検出するため、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate SECL で Blot を培養し、FluorChem SP Imaging System (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, US) で測定した。TJ タンパク発現の各値は、normoxia 条件の control 値で標準化して評価した。

6. 実験動物

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。候補薬剤の中樞神経損傷後における BBSCB 機能保護効果や神

経保護効果を、脊髄損傷モデルと外傷性脳損傷モデルを用いて検証した。全ての実験で、宿主に成体野生型マウスは雄性 C57BL/6 マウス (Sankyo Laboratories Service Corporation Inc., Japan) を使用した。なお、研究を通して、実験動物は適切な食餌が与えられ、室温管理された specific-pathogen-free 室で飼育された。

実験動物の麻酔には、ケタミン (75-100 mg/kg, ケタラール, Daiichi Sankyo Propharma corporation, Japan) とメデトミジン (0.5 mg/kg, ドミトール, Orion Corporation, Finland) の混合液を用い、腹腔内投与した。手術後、マウスは電子保温パッド (37°C) 上で保温し、antisedan (200 µg/kg; Zenoaq, Japan) を腹腔内投与して麻酔からの覚醒を行った。

6-1) BBSCB 保護効果検証

脊髄損傷モデル

成体野生型の雄性 C57BL/6 マウス (8-13 週令) を用い、全ての手技は腹臥位で行った。過去の報告に基づき、マウスの第 4 頸椎高位の脊髄後索に wire-knife transection 法で損傷を作成した (Kadoya et al., 2016)。具体的には、まずマウスを stereotaxic frame (David Kopf Instruments, CA, USA) に固定し、頸椎後方より正中切開して鈍的に展開し、第 4 頸椎椎弓切除術を施行した。第 4 頸椎高位の脊髄の正中から 0.5 mm 外側の硬膜に 26 G 針で穴をあけ、同穴より Wire-knife (McHugh Milieux, IL, USA) を 0.5 mm の深さ刺入し、wire を伸長し引き上げて損傷を作成した。脊髄の背側組織が完全に横切されたことを確認するため、引き上げた wire-knife の上に脊髄組織が残存していないことを確認した。

外傷性脳損傷モデル

成体野生型の雄性 C57BL/6 マウス (8-13 週令) を用い、全ての手技は腹臥位で行った。過去の報告と同様に、マウスの左大脳皮質に wire-knife transection 法で損傷を作成した (Park et al., 2006)。脊髄損傷モデルと同様に stereotaxic frame に固定した。頭部正中切開して頭蓋骨まで展開し、前項より左外側 1mm に 0.5mm 径マイクロドリルで開窓した。Wire-knife は左大脳半球の前項より外側 1.0 mm, 深さ 0.5 mm の位置に刺入し、尾側に wire を伸長し引き上げて損傷を作成した。脳白質が完全に切断されていることを確認するため、引き上げた wire-knife の上に脳組織が残存していないことを確認した。

BBSCB 破綻の定量評価

候補薬剤または生理食塩水 (control) を損傷作成前日と損傷直後に、腹腔内投与した (各 N=6/群)。損傷作成翌日、4%PFA で灌流固定し組織学的評価を行った。

BBSCB 破綻の評価には、関心領域での物質の漏出を定量するのが一般的である (Saunders et al., 2015)。漏出物質を定量するにあたり、1) Evans blue (EB) や FITC-Dextran などの色素を外的に投与する方法と、2) 生体内の Albumin や IgG に対して免疫染色をする方法があるが (Chen et al., 1999; Natarajan et al., 2017; Radu and Chernoff, 2013; Saunders et al., 2015)、未だに標準的な評価方法が決まっていないのが現状である (Saunders et al., 2015)。我々は、BBSCB 破綻の評価に最適な方法を検証するため、EB (Tokyo Chemical Industry co., LTD, Japan)、Albumin、IgG の漏出を比較した (各 N=5)。

6-2) 脊髄損傷モデルを用いた神経保護効果検証

中枢神経損傷後の神経保護効果を検討するため、前述の脊髄損傷モデルと同様に、マウスの第4頸椎高位脊髄後索に wire-knife で損傷を作成した。本実験では、脊髄損傷作成直後より、生理食塩水に溶解した候補薬剤または生理食塩水 (control) を1日1回1週間、腹腔内投与した (N=12/群)。マウスの損傷作成8週後に損傷範囲と神経細胞死の範囲を組織学的に定量した。また、DigiGait 歩行解析システムを使用した歩行解析を行った (N=12/群)。

6-3) 免疫組織化学染色 (IHC; Immunohistochemistry)

PBS による瀉血の後、4% PFA による灌流固定の後、脳脊髄を採取し、4% PFA 中に 4°C で一晩固定した。翌日、30% Sucrose/phosphate buffer (PB) 溶液に移動し、24 時間以上静置した。マイクロトーム (REM-710, Yamato, Japan) で 30 μ m 厚の切片を作成した。切片は Tissue collecting solution (TCS) に浸して保存した。脳は冠状断、脊髄は矢状断で切片を作成した。脳・脊髄ともに 6 切片毎を各染色に使用した。5% Normal horse serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) および 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有した Tris buffer saline (TBS; pH8.4) で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体含有 TBS に 4°C で一晩、さらに二次抗体含有 TBS に室温で 1 時間浸し染色を行った。一次抗体は、NeuN (rabbit from Abcam at 1:200)、GFAP (chicken from Genetex at 1:1000)、myelin basic protein (MBP; rabbit from Abcam at 1:200)、Albmin (goat from Abcam at 1:1,000) を用い、IgG に対しては Alexa 488 conjugated donkey secondary antibody (1:1000, Jackson immunoresearch, West 14 Grove, PA) を用いた。一次抗体に MBP を用いる場合、100%メタノール処理を 15 分間行った。二次抗体は、それぞれの一次抗体に対応する Alexa 488, 594 or 647 conjugated donkey secondary antibodies (1:1000, Jackson immunoresearch, West 14 Grove, PA) を用いた。切片はスライドガラス (Platinum Pro,

Matsunami Glass Ind., Japan) に乗せて乾燥させた後、Mowiol (Sigma-Aldrich, MO, USA) の上にカバーガラス (NEO cover glass, Matsunami Glass Ind., Japan) をして観察した。

6-4) 組織評価

各サンプル、脊髄組織は中心に最も近い1矢状断切片を、脳組織は損傷深度が最も深い1冠状断切片を用い、蛍光顕微鏡 (Keyence BX-710, Osaka, Japan) で組織の観察を行った (100 倍)。IgG 染色域の評価は、Photoshop CS3 (Adobe, CA, USA) で撮影した画像を白黒に二値化した後、Image J (Schneider et al., 2012) を用いて定量した (Jones et al., 2002; Kadoya et al., 2016)。脳切片では右大脳半球脳皮質を、脊髄切片では損傷より頭側 5 mm の位置を正常組織として基準化した。損傷部位の大きさは、組織が欠損している面積を測定した。損傷範囲の評価には GFAP 染色域を用い、IgG 評価と同様の手法で定量した。神経細胞死の評価には、損傷部からの神経細胞死幅 (NeuN 不免疫染色域の面積を、灰白質の幅で除して算出した) を用い、すべての定量評価は、スライドを盲検化して行った。

6-5) 歩行解析

DigiGait 歩行解析システム (Mouse Specifics, Inc., Quincy, MA, USA) を使用したトレッドミル歩行解析を行った (Sashindranath et al., 2015)。実際の歩行試験前に、数日間の habituation を行った。まず 5 分間、マウスをトレッドミル上に静置した後、10 cm/s より歩行を開始し、歩行速度が 20 cm/s に到達するか、または歩行不能となるまで、徐々に歩行速度を上げ、DigiGait Imaging and Analysis software 12.2 (Mouse Specifics, Inc., Quincy, MA, USA) を用いて動画を撮影、解析した。マウスは最大 3 回歩行し、最も安定し解析可能な歩行データを使用した。

北大オリジナル化合物ライブラリーの HTS

新規 HTSA を用いて、北大オリジナルのライブラリー化合物 2,385 種に対して HTS を行った。薬剤スクリーニングと同様、すべての化合物は DMSO に溶解し (最終濃度 0.5%)、スクリーニングの化合物濃度は 10 μ M に設定した。スクリーニングの全行程は半自動ピペッターを用い、96 well plate で行った。各プレートには 80 薬剤 (N=1) の他、DMSO 含有培地のみ、H₂O₂ 負荷のみ、H₂O₂ 負荷なしのコントロール (各 N=4) で設定した。細胞負荷は H₂O₂ 濃度 0.45 mM で 6 時間とし、PrestoBlue で各 well の細胞活性を評価した。化合物を添加した細胞の細胞活性が、プレートの 2SD 以上となった場合、ヒット候補化合物とした。ヒット候補化合物は同様の手順で再現性試験を 3 回行い、少なくとも 1 回以上再現性がある

ったものをヒット化合物と定義とした。なお、HTS で行った全プレートの平均2SD 細胞活性値を算出し、これを再現性試験のカットオフ値とし、これより高い細胞活性を示した場合に再現性ありと判断した。

7. 統計学的解析

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (Mean $\pm$ SD) で示した。本研究では、2 群間の有意差検定には Student's t 検定 (two-tailed) を、3 群間の有意差検定には One-way ANOVA 解析を行い、Post-hoc test として Tukey-Kramer test または Dunnett's test を用いた。p 値は 0.05 未満を有意とした。すべての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 13 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

結果

1. HTSA 確立

ヒト脳脊髄血管内皮細胞保護薬を探索する HTSA 確立するため、hCMEC/D3 を用い、細胞負荷には H_2O_2 を用いた (図 3)。最初に我々は、細胞の状態を最も鋭敏に評価するための方法を、1) 細胞死 (PI 染色)、2) 細胞活性 (PrestoBlue)、3) 細胞毒性 (LDH assay) の 3 つより選択することとした。

PI 染色は、負荷時間 6 時間では、 H_2O_2 濃度 0.5 mM 以上で脳血管内皮細胞死を観察し、濃度依存的に死細胞率が上昇した (図 4)。細胞毒性は、0.40 mM から H_2O_2 濃度依存的に上昇を認め、1 mM 以上で著明に上昇した。一方、細胞活性は H_2O_2 濃度 0.35 mM から著明な低下を認めた (図 5)。よって、細胞毒性と細胞活性は細胞死が起こる 0.5 mM よりも低い H_2O_2 濃度で既に変化していることが分かった。さらに PrestoBlue を使用した細胞活性が、細胞の負荷状態を最も鋭敏に評価可能な方法であると判明した。

次に半自動ピペッター (Pipettor 230、MSTechnos、Japan) を用い、HTSA の信頼性、妥当性を評価する 3 つの統計学的パラメーターを計算した。結果、 H_2O_2 濃度 0.45 mM (Z'-factor 0.82 ± 0.04 、S/B ratio 3.56 ± 0.60 、CV 0.04 ± 0.01) と 0.5 mM (Z'-factor 0.82 ± 0.07 、S/B ratio 5.33 ± 2.06 、CV 0.78 ± 0.05) が HTSA の基準を満たした (Z'-factor ≥ 0.5 、S/B ratio ≥ 2 、CV ≤ 0.1) (Iversen et al., 2004) (図 6)。以上より我々は、最も高い水準で HTSA の基準を満たした H_2O_2 濃度 0.45 mM を HTSA の最適な負荷条件とし、HTSA の確立をした。

最後に、hCMEC/D3 および細胞活性に対する DMSO の影響を調査した (図 7)。DMSO の濃度が 2% 以上の場合、細胞活性は有意な低下を示した。我々のスクリーニングに用いる薬剤・化合物は DMSO 濃度 0.5% 以上での溶解が可能であったため、DMSO 濃度は細胞活性が低下しない 0.5% に設定した。

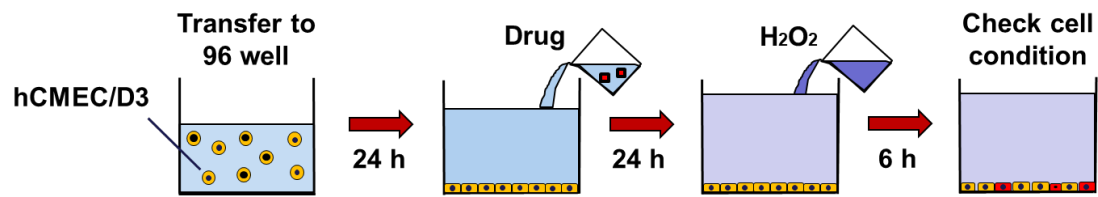


図3. HTSA 確立

Type I collagen でコーティングした 96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well で EBM-2 培地（成長因子不含、FBS 2.5%含有）80 μ L とともに各 well に播種した。24 時間細胞培養し接着させた後、薬剤投与を想定した EBM-2 培地（FBS 2.5% 含有）20 μ L を添加した。さらに 24 時間経過した後、H₂O₂ 含有培地 20 μ L を添加し、6 時間後に細胞の状態を評価した。

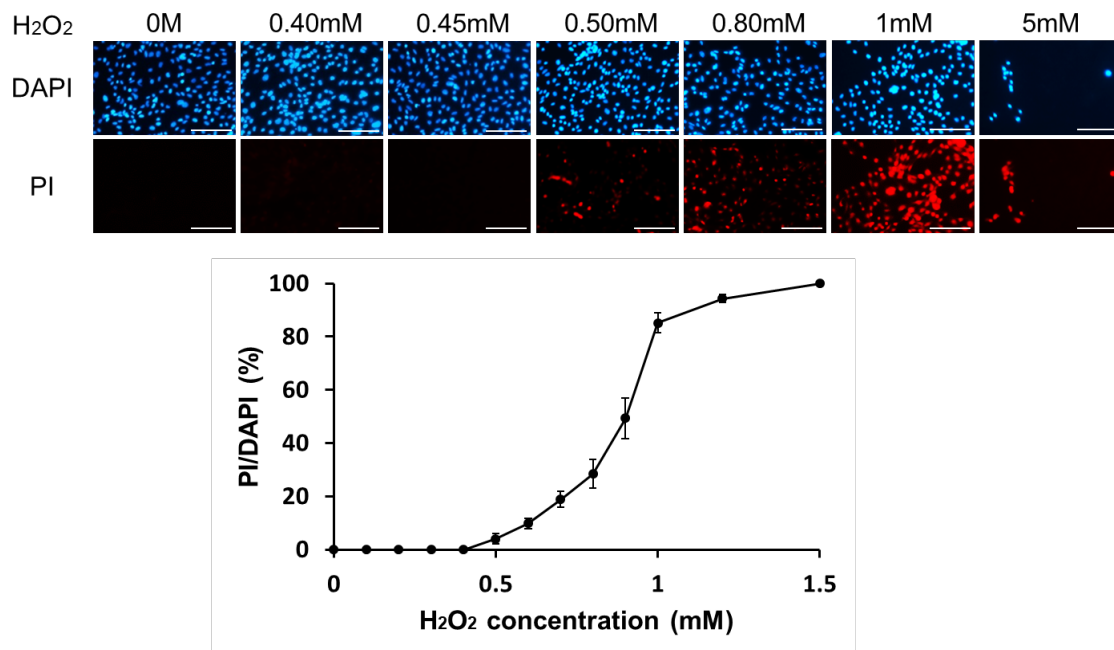


図 4. H₂O₂ 濃度と細胞死

96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well で播種し、各 H₂O₂ 濃度（6 時間）に応じた PI 陽性率（PI 陽性細胞数 / DAPI 陽性細胞数）で死細胞率（%）を評価した。0.5mM より PI 陽性細胞が出現し、濃度依存的に死細胞率が上昇した。5 mM では細胞の剥離が観察された。Data are presented as mean ± SD.

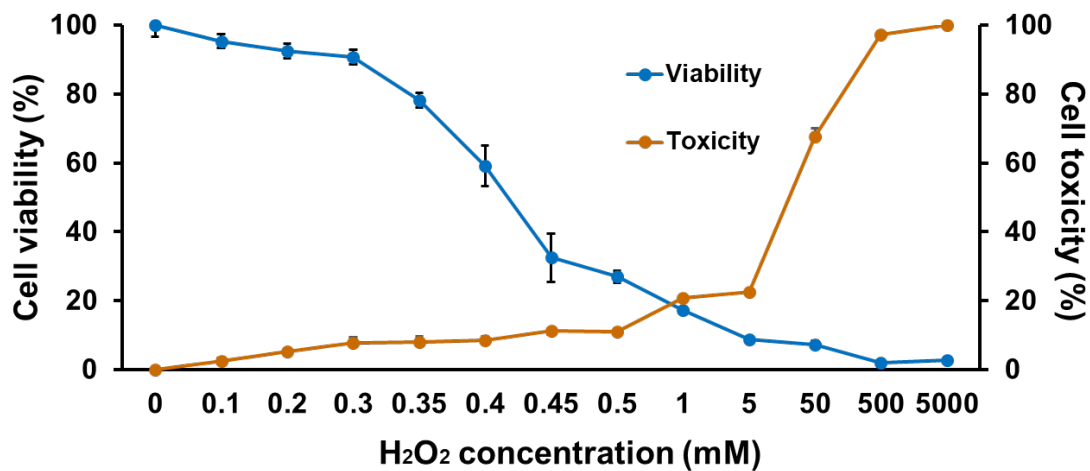


図 5. H₂O₂ 濃度と細胞活性、細胞毒性

96 well plate に hCMEC/D3 を 5,000 cells/well で播種し、各 H₂O₂ 濃度（6 時間）における細胞活性（PrestoBlue）と細胞毒性（LDH assay）を観察した。H₂O₂ 濃度の上昇に伴い、細胞活性、細胞毒性は各々低下、増加を示した。図 4 で示した PI 陽性細胞（死細胞）が出現する 0.5 mM よりも低い H₂O₂ 濃度で、既に細胞活性、細胞毒性は変化し、さらにこの濃度では細胞活性の方が細胞毒性よりも変化が大きかった。Data are presented as mean ± SD.

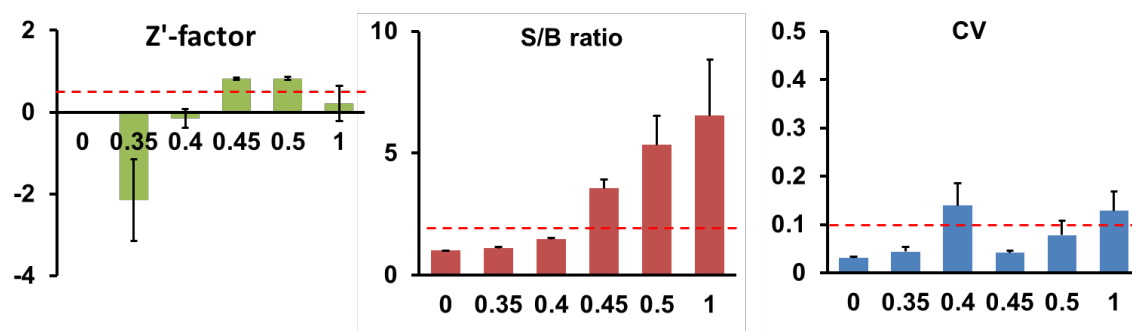


図 6. HTSA の信頼性、妥当性評価

半自動ピペッターを用い、各 H_2O_2 濃度における Z'-factor, S/B ratio, CV を計測した (Z'-factor ≥ 0.5 、S/B ratio ≥ 2 、CV ≤ 0.1)。Data are presented as mean $\pm$ SD.

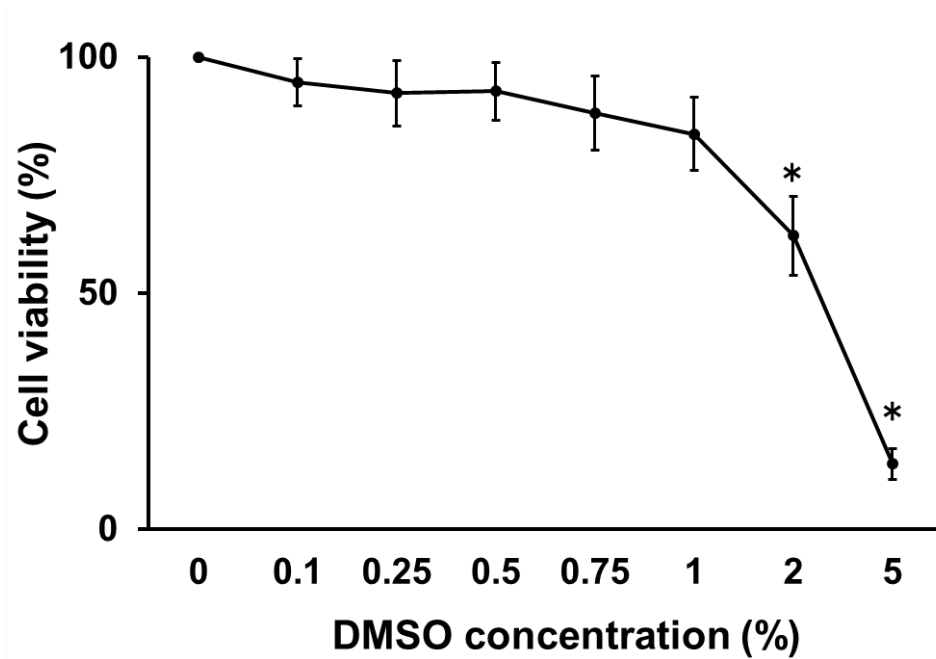


図 7. hCMEC/D3 を用いた細胞活性評価における DMSO 毒性の影響

DMSO 濃度の上昇に伴い細胞活性は低下し、2%以上で有意な低下を認めた。

Data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ to 0 M; One-way ANOVA and Dunnett's test.

2. ライブラリー既存薬 1,600 種の HTS

新規 HTSA を使用して、ライブラリー既存薬 1,600 種をスクリーニングした (図 8) 。全スクリーニングプレートの Z' -factor と S/B ratio は、各々 0.5 と 2 を超えていた。一方、CV は 21 プレート中、16 プレート (76%) で 0.1 未満であった。HTS では 44 種 (2.8%) が 2SD 以上の活性を有し、ヒット候補薬剤となった。これらに対し、再度同様の条件での再現性試験を 3 回行ったところ、37 種 (2.3%) がカットオフ値を超える再現性細胞活性改善効果を有し、ヒット薬剤となった。このうち、①国内未承認薬、②外用薬、③動物用薬剤を除外し、副作用が少なく安全かつ安価であり、早期臨床応用の可能性が高い薬剤である Berberine を更なる実験へ優先的に進めた (図 9) 。

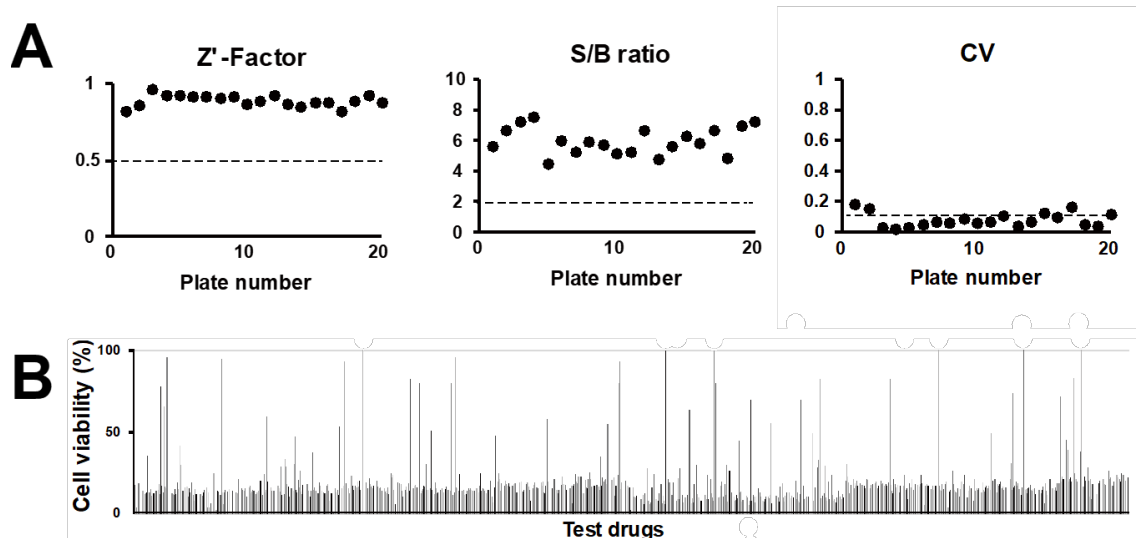


図 8. 新規 HTSA を用いたライブラリー既存薬の HTS

A: HTS を行った全プレートの信頼性・妥当性を評価指標 (Z'-factor, S/B ratio, CV)。点線は各パラメーターの基準値 (Z'-factor=0.5、S/B ratio=2、CV=0.1) を表す。B: 既存薬 1,600 種の HTS 結果。各棒グラフは薬剤毎の細胞活性を表す。

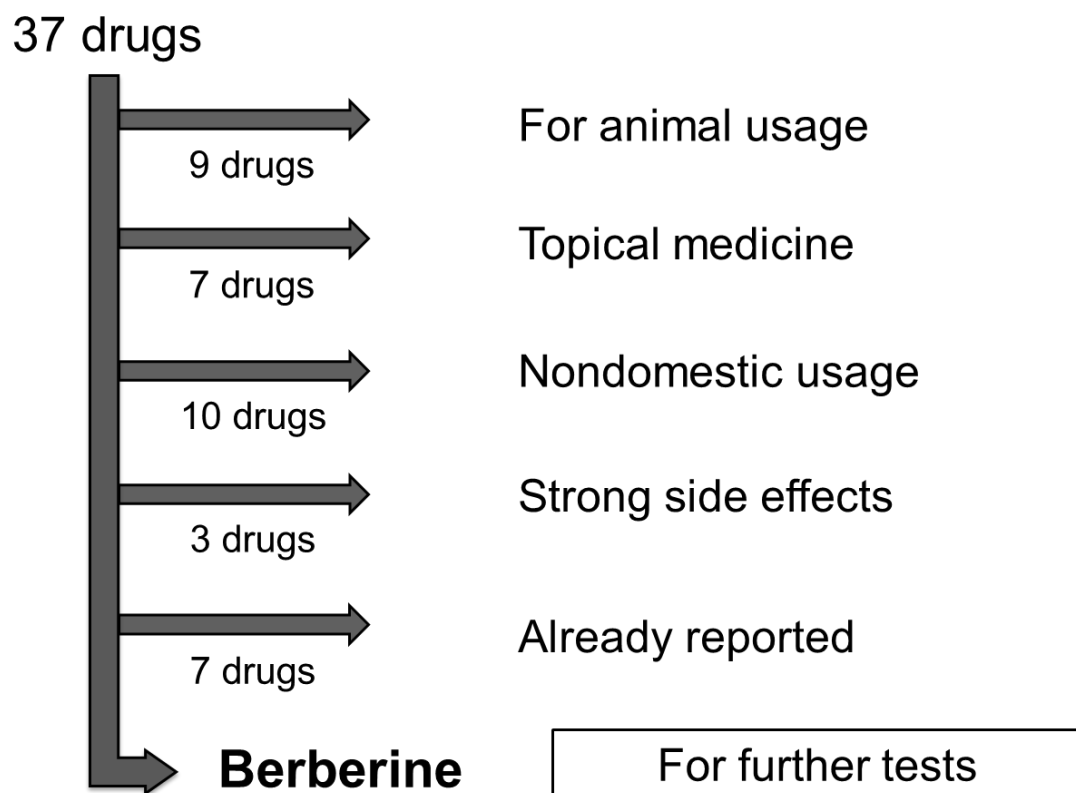


図9 ヒット薬剤の選定

HTS でヒット薬剤が 37 種同定された。このうち、臨床応用に適した条件で薬剤選定を行い、Berberine を更なる実験へ優先的に進めた。

3. Berberine の濃度依存性・同時負荷試験

Berberine を異なるタイミングで投与した場合の、薬剤効果と濃度依存性を検討した。Berberine は H_2O_2 負荷との同時投与において、濃度依存的に脳血管内皮細胞保護効果を有した (図 10)。一方、Berberine 濃度 $50\text{ }\mu\text{M}$ までは細胞活性が増加するが、 $250\text{ }\mu\text{M}$ では低下した。

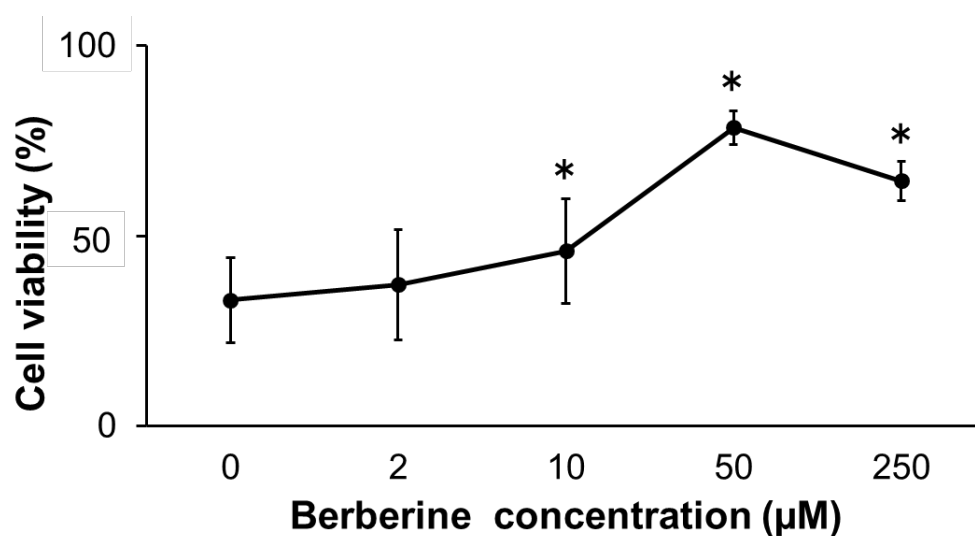


図 10 Berberine の濃度依存性・同時負荷試験

各 Berberine 濃度 (0 M , $2\text{ }\mu\text{M}$, $10\text{ }\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$, $250\text{ }\mu\text{M}$) における、細胞活性を示す ($N=20$)。Berberine は H_2O_2 負荷と同時に投与した。* $P < 0.05$ to 0 M ; One-way ANOVA and Dunnett's test. Data are presented as mean $\pm$ SD.

4. Berberine の OGD に対する脳血管内皮細胞保護効果

Berberine (50 μ M) は OGD 条件下でも Control (薬剤なし) と比較して脳血管内皮細胞保護効果を認めた (図 11)。Berberine は酸化ストレスに加え、無酸素・無糖負荷条件でも保護効果を有することが示された。

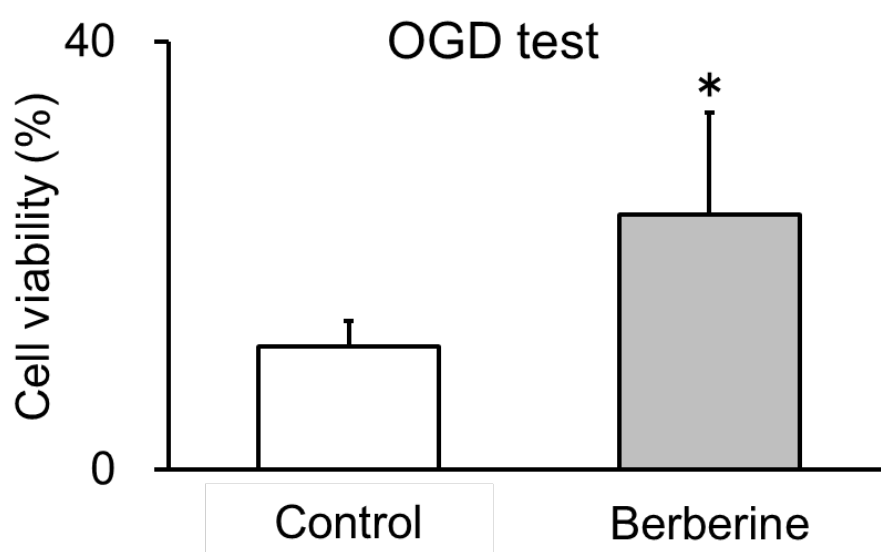


図 11. OGD 負荷条件における Berberine の脳血管内皮細胞保護効果

Berberine 投与 (50 μ M) により、Control と比べ、細胞活性の有意な増加を認めた。All data are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$; Student's t test.

5. 初代培養細胞を用いた BBSCB の機能試験

次に我々は、初代培養細胞による *in vitro* BBSCB モデルを用い、Berberine の BBSCB 機能保護効果を検証した。細胞負荷には OGD + Reox 負荷条件を用いた。

まず、初代培養細胞による *in vitro* BBSCB 共培養モデルを用い、Berberine の BBSCB 機能保護効果を TEER と Na-F 透過試験で検証した。OGD 6 時間負荷した後、Berberine (50 μ M) を添加し 12 時間の Reox を行った (図 12A, B)。

TEER は、OGD + Reox 負荷条件では Normoxia に比べ Control 群で有意に低下していた。一方、Berberine を投与すると、OGD + Reox 負荷条件での TEER は有意に改善した。さらに Berberine 投与により、Normoxia でも有意に TEER が増加した (図 12C)。

また、Na-F 透過性試験では、OGD + Reox 負荷条件により有意に Na-F 透過性が亢進するのに対し、Berberine は OGD + Reox 条件下の Na-F 透過性を有意に低下させた。よって、Berberine は *in vivo* BBSCB の機能保護効果を有することが示された (図 12D)。

次に、RBECs を細孔膜に播種して、上記の実験と同様 OGD + Reox 条件で細胞負荷をした。RBECs の Western Blotting 分析により、OGD および再酸素化条件で、4 つの TJ タンパクである ZO-1、VE-cadherine、Occludin および Claudin-5 の発現が有意に低下していた。(図 13)。一方、Berberine 投与により、これらの TJ タンパクの発現は有意に上昇した。

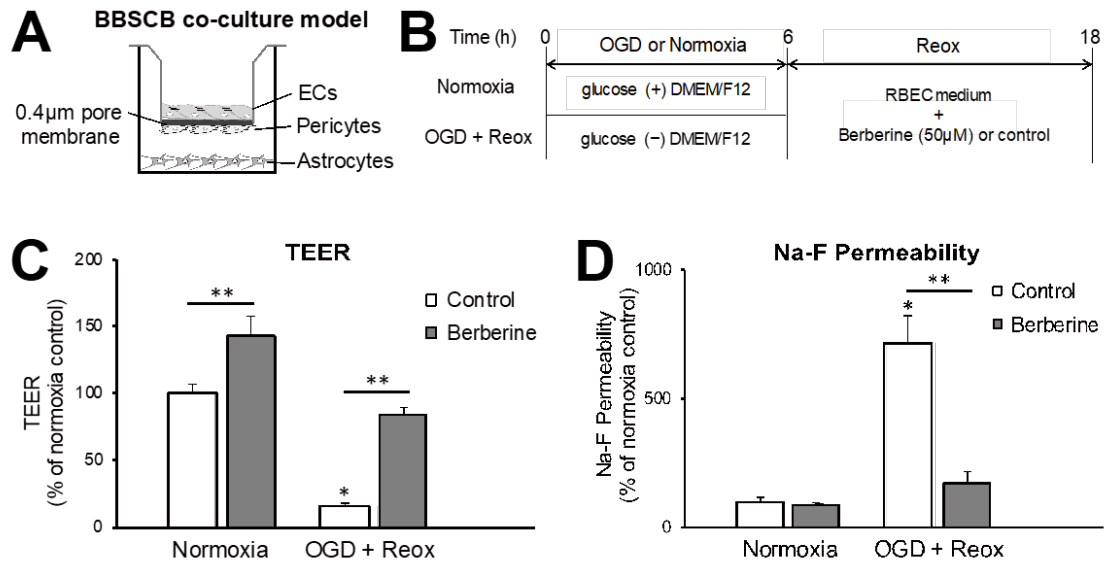


図 12. In vitro BBSCB 共培養モデルを用いた TEER、Na-F 透過性試験

A: RBECs, ペリサイト、アストロサイトにより構成される BBSCB 共培養モデルの模式図。B: OGD+Reox 負荷の時系列。C, D: Berberine 投与による TEER (C)、Na-F 透過性 (D) の変化。TEER、Na-F 透過性ともに Normoxia 条件の Control を 100%として標準化した。Berberine 投与により、OGD+Reox 条件下で TEER が有意に増加し、Na-F 透過性が有意に低下した。*, $P < 0.05$ to Control under normoxia; **, $P < 0.05$ between Berberine and Control; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test.

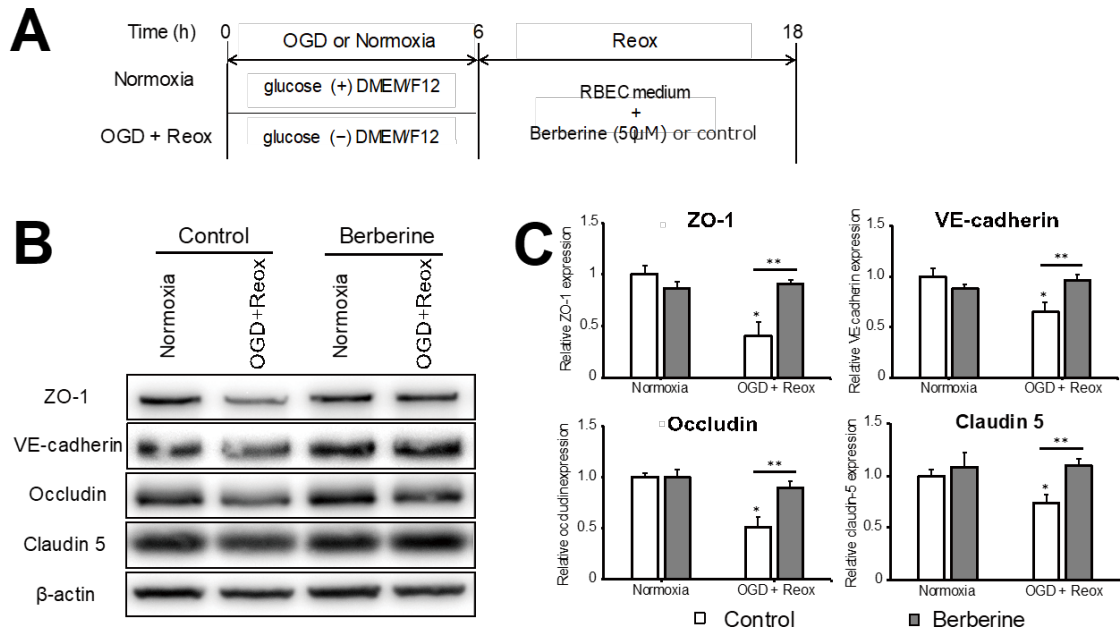


図 13. In vitro BBSCB モデルを用いた TJ タンパクの Western Blotting

A: OGD + Reox 負荷の時系列。Berberine は Reox の時点で投与した。B, C: TJ タンパク (ZO-1, VE-cadherin, Occludin, Claudin-5) の Western blot 分析 (B) と、相対的定量 (C)。Normoxia 条件の Control を 100%として標準化した。Berberine 投与により、各 TJ タンパクの発現が有意に増加した。*, $P < 0.05$ to Control under normoxia; **, $P < 0.05$ between Berberine and Control; One-way ANOVA and Tukey-Kramer test.

6. In vivo による Berberine の効果検証実験

6-1) BBSCB 保護効果検証

BBSCB 破綻の定量評価の検証

EB には複数の投与経路があるため、我々はまずこれを検討した (Xu et al., 2014)。尾静脈からの静脈注射が一般的な投与経路であるが、確実な血管内投与が担保できないこと、また高度な技術を要し手技の誤差が生じ得ることから、別の投与経路を考えた。腹腔内投与は、静脈注射よりも染色性が劣ることが報告されており、確実に血管内へ投与できる心腔内投与法を選択した (del Valle et al., 2008)。具体的には、EB 200mg/kg を 4%PFA 50mL に溶かし、7 mL/min の速度で投与した。

BBSCB の破綻の評価方法を比較するため、脊髄損傷モデルを用いて EB、Albumin、IgG の漏出を評価した。灌流固定時に EB を心腔内に投与する手法は、個体により投与速度に差が生じたため、手技の誤差を完全に除くことは困難であった。一方、IgG と Albumin には手技の誤差が比較的少ないと考えられた。組織学的評価では、損傷部周囲の各物質の漏出範囲を比べると、IgG が最も広いことが分かった。よって、我々の in vivo モデルでは IgG 漏出範囲を BBSCB 破綻の定量に用いることとした (図 14)。

脊髄損傷モデル

脊髄損傷後に Berberine が BBSCB 機能を保護できるかを検証した。BBSCB 機能が破綻すると、損傷部周囲に IgG が漏出することが知られている (Ekmark-Lewen et al., 2013; Kim et al., 2011)。Berberine 投与群と Control 群では、損傷の大きさには差は認めなかったものの、IgG 免疫染色を定量化した結果、Berberine 投与群では、Control 群と比較して IgG 漏出面積が有意に減少していた (Berberine vs Control : $5.82 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ vs $2.49 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, $P = 0.008$) (図 15)。

外傷性脳損傷モデル

次に、我々は、異なる中枢神経損傷モデルである外傷性脳損傷モデルで BBSCB 保護効果を検証することとした。脊髄損傷モデルと同様、Berberine または生理食塩水を腹腔内に投与し比較した。Berberine 投与群と Control 群では、損傷の大きさには差は認めなかったが、Berberine 投与群では、Control 群と比較して IgG 漏出面積が有意に減少していた (Berberine vs Control : $2.16 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ vs $6.96 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, $P = 0.003$) (図 16)

6-2) 脊髄損傷モデルを用いた神経保護効果検証

BBSCB 保護効果に加え、Berberine の神経保護効果の有無を検証した。前述の

脊髄損傷モデルを用いて、損傷範囲（GFAP）と神経細胞死の範囲（NeuN）を評価した。なお、24 匹のマウスの内、Control 群 2 匹が術翌日に死亡した。

GFAP は損傷周囲を取り囲む様に染色され、GFAP 陽性の面積を評価した。また、NeuN は損傷周囲では不染域が存在し、灰白質における損傷部から NeuN 陽性境界までの距離（不染域幅）を評価した。Berberine 投与群と Control 群を比べ、頸髄損傷部の大きさには差はなかったものの、Berberine 投与群では、Control 群と比して GFAP 陽性の面積小さく（Berberine vs Control: $1.71 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ vs $2.57 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, $P = 0.003$ ）、NeuN 不染域幅が小さかった（Berberine vs Control: $115.0 \mu\text{m}$ vs $235.2 \mu\text{m}$, $P = 0.003$ ）（図 17）。

また、歩行解析では、両群間で Gait speed を含む粗大運動のパラメーターには有意な差を認めなかった。一方、Berberine 投与群では、Control 群に比べ、Gait symmetry, %Shared stance, Overlap distance の協調運動系に関わるパラメーターで有意に優れていた。これらの結果から、Berberine は BBSCB 保護効果のみならず、神経保護効果を有することが示された。

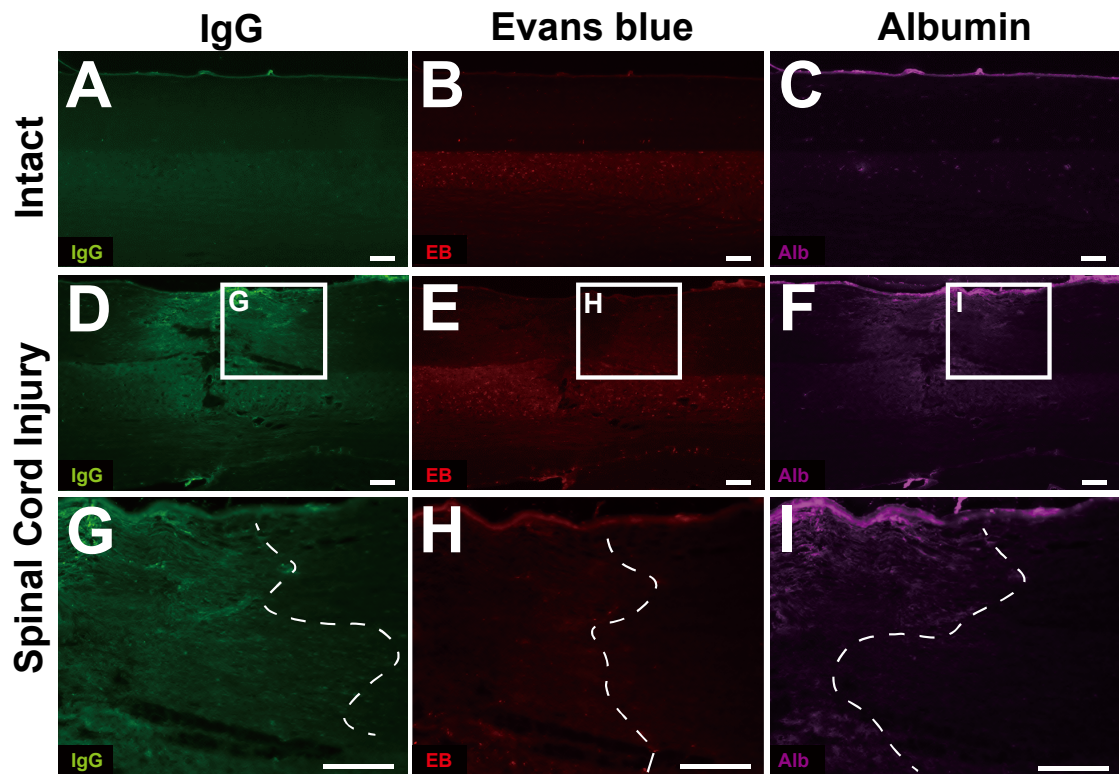


図 14. BBSCB 破綻の定量評価方法の検証

A-C: 正常脊髄では IgG (A)、Evans blue (B)、Albumin (C) はいずれも漏出を認めない。D-I: 第 4 頸椎高位の脊髄後索損傷部の矢状断切片 (左: 吻側)。D, E, F はすべて同一視野である。G, H, I は各々 D, E, F 相当部の同一視野の拡大図である。白点線は各染色の陽性の境界を示す。IgG (D, G) の陽性範囲は、Evans blue (E, H) や Albumin (F, I) の陽性範囲と比べて最も広く漏出されている。All scale bars, 100 μ m.

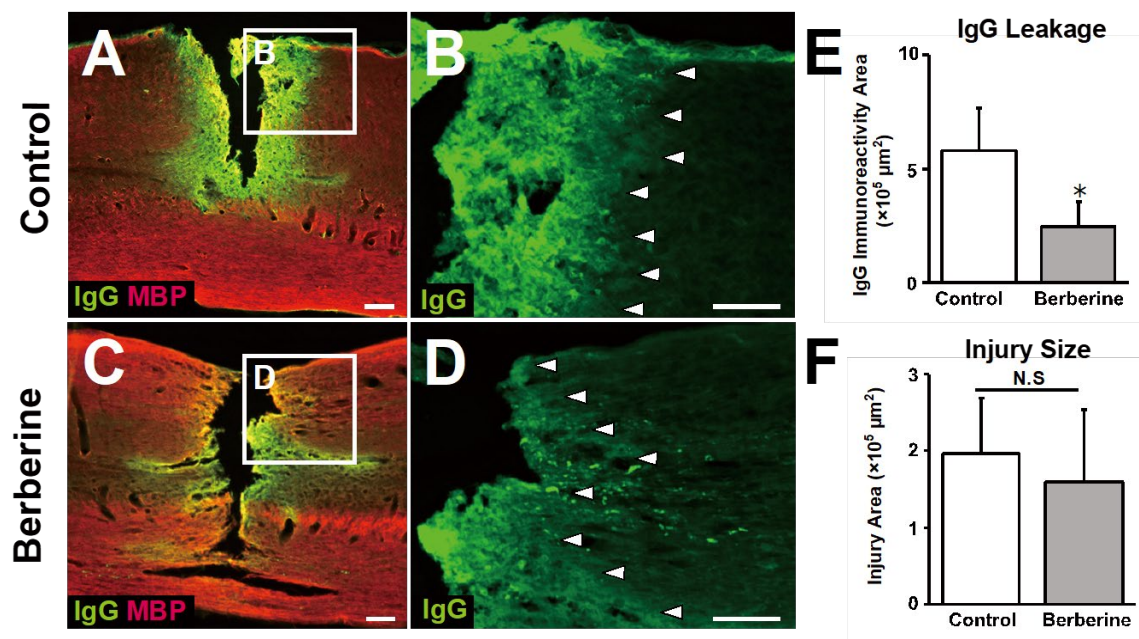


図 15. 脊髓損傷モデルを用いた Berberine の BBSCB 保護効果

A-D: 第 4 頸椎高位の脊髓後索損傷部における矢状断切片（左：吻側）。B, D は各々 A, C の相当部の拡大図である。白矢印は IgG 陽性の境界を示す。All scale bars, 100 μm . E: 損傷部周囲の IgG 染色範囲の定量評価。Berberine 投与群で有意に IgG 漏出範囲が減少した。* $P < 0.05$; Student's t test. F: 損傷部の大きさ定量。N.S.; 有意差なし。Data are presented as mean $\pm$ SD.

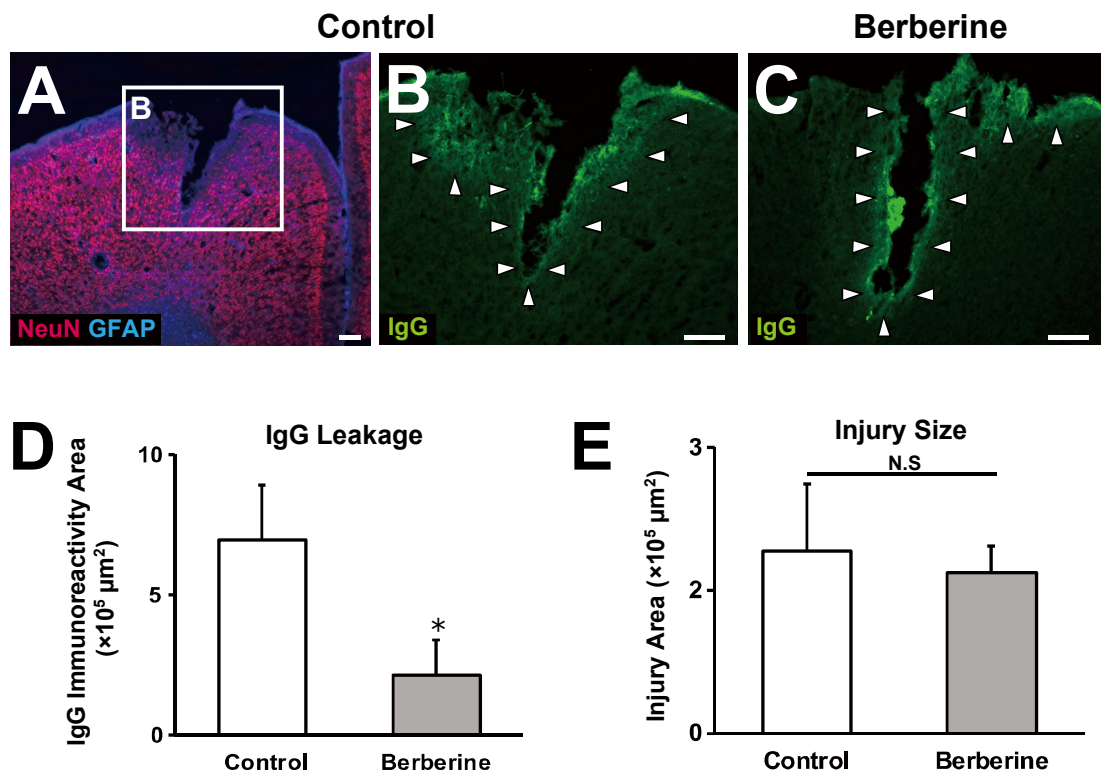


図 16. 外傷性脳損傷モデルを用いた Berberine の BBSCB 保護効果

A-C: 外傷性脳損傷モデルの損傷部冠状断。A: 左大脳半球皮質に損傷を作成した。B,C: 両群の IgG 染色領域。D: IgG 染色域の定量評価。Berberine 投与群で有意に IgG 漏出範囲が減少した。* $P < 0.05$; Student's *t* test. E: 損傷部の大きさ定量。N.S.; 有意差なし。Data are presented as mean $\pm$ SD.

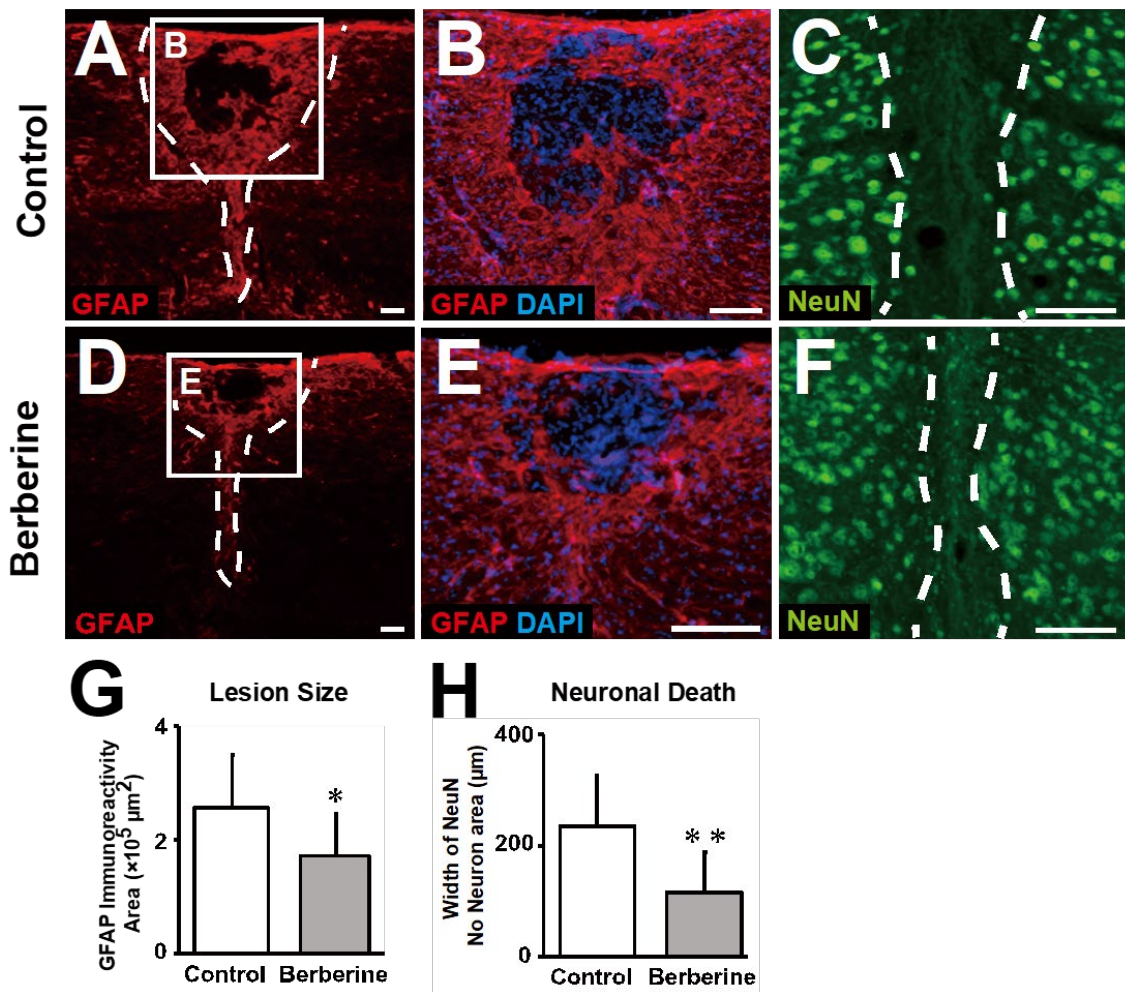


図 17. 脊髓損傷モデルを用いた Berberine の神経保護効果

A-F: 第4頸椎高位の脊髓後索損傷部における矢状断切片（左：吻側）。B, E は各々A, Dの相当部の拡大図である。A, Dの白点線はGFAP陽性の境界、C, Fの白点線はNeuN陽性の境界である。All scale bars, 100 μm . G, H: 損傷部周囲のGFAP (G)とNeuN (H)の染色範囲の定量。Berberine投与群で有意にGFAP陽性面積とNeuN不染幅が減少した。*P < 0.05; Student's t test. Data are presented as mean $\pm$ SD.

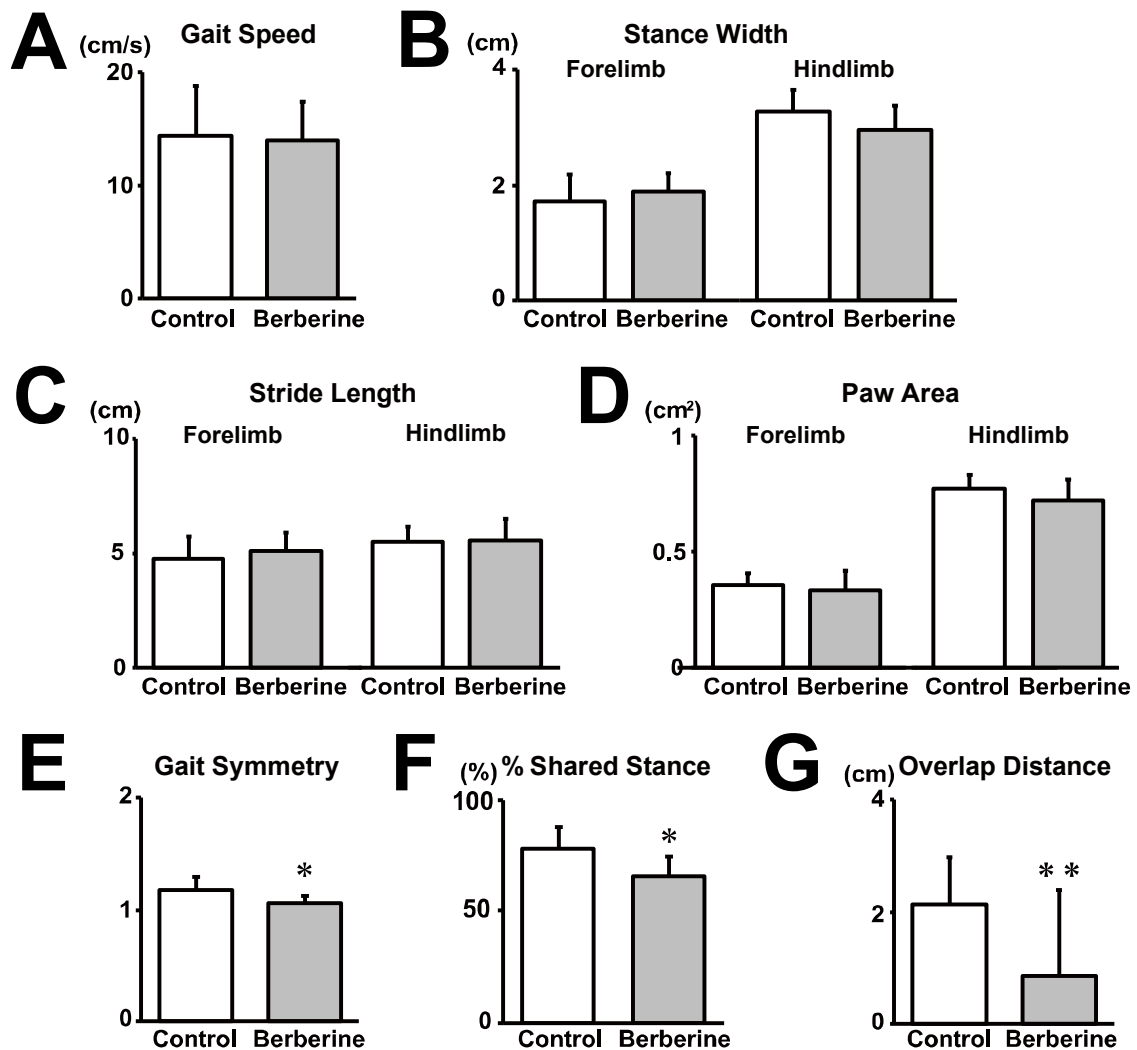


図 18. 脊髄損傷モデルの歩行解析

Berberine 投与群と Control 群では、粗大運動のパラメーター (Gait speed (A)、Stance width (B)、Stride length (C)、Paw area (D)) には有意差を認めなかったが、協調運動のパラメーター (Gait symmetry (E)、% shared stance (F)、Overlap distance (G)) は Berberine 投与群で有意に優れていた。* $P < 0.05$; Student's t test. Data are presented as mean $\pm$ SD.

7. 北大オリジナル化合物ライブラリーの HTS

新規 HTSA を用いて、ライブラリー化合物 2,385 種をスクリーニングした (図 19)。Z'-factor、S/B ratio は、全スクリーニングプレートの 31 プレート中、各々 26 プレート、25 プレートで基準を満たしていた。一方、CV は 8 プレートで 0.1 以上 0.2 未満、6 プレートで 0.2 以上であった。HTS では 59 種 (2.5%) が 2SD 以上の活性を有し、ヒット候補化合物となった。再現性試験を 3 回行った結果、45 種 (1.9%) がヒット化合物となった。また、これらの化合物の内、化合物 A の類縁体の一群が 7 剤あった。

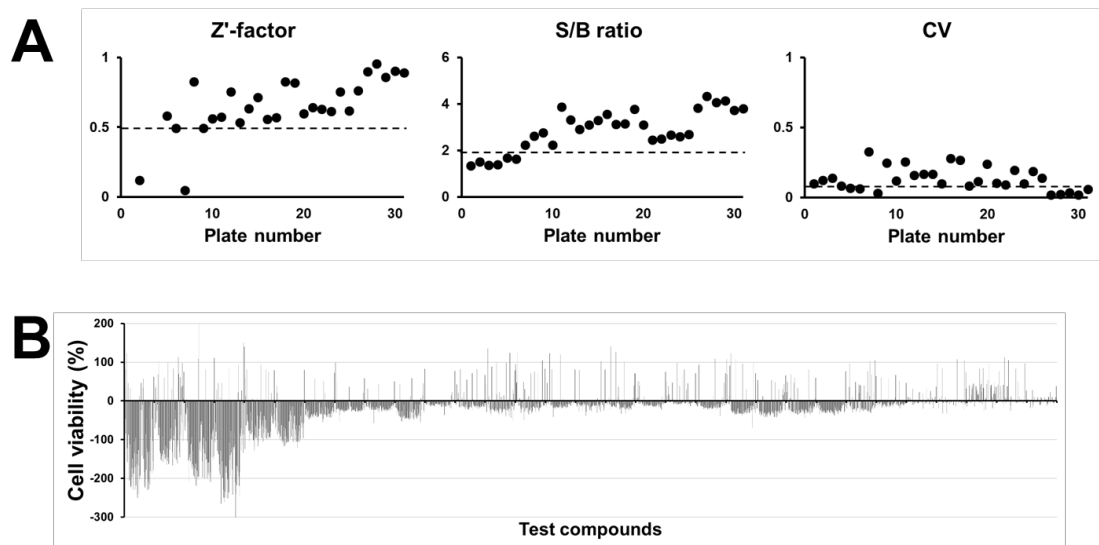


図 19. 新規 HTSA を用いたライブラリー既存薬の HTS

A: HTS を行った全プレートの信頼性・妥当性を評価指標 (Z'-factor, S/B ratio, CV)。点線は各パラメーターの基準値 (Z'-factor=0.5、S/B ratio=2、CV=0.1) を表す。B: 化合物 2,385 種の HTS 結果。各棒グラフは化合物毎の細胞活性を表す。

考察

本研究では、まず脳脊髄血管内皮細胞および BBSCB 機能に対して保護効果を持つ薬剤を探索するための HTSA を確立した。この HTSA 確立のために、幾つかの工夫をしたが、1 つ目は、ヒト脳血管内皮細胞株である hCMEC/D3 を用いたことである。一般的に、細胞を用いた HTSA は不安定であるため、細胞を用いない系を構築することが多いが(Beske and Goldbard, 2002; Di et al., 2003; Lundholt et al., 2003)、まだ脳血管内皮細胞機能を保護するための詳細な分子機構が解明されていないため、分子を標的とした非細胞の系ではなく、細胞状態を評価する系とした。我々が渉猟し得た範囲では、脳血管内皮細胞を用いた HTSA は、齧歯類由来の細胞株を用いた報告が一つあるだけであり(Qosa et al., 2016)、ヒト細胞を使用しているものは、本 HTSA が初めてのものになる。hCMEC/D3 を選択した理由は、BBSCB の表現型を維持する稀な細胞株であるからである(Weksler et al., 2013; Weksler et al., 2005)。また、酸化ストレスと BBSCB の破綻は、様々な中枢神経疾患で共通であるため、この HTSA は外傷だけでなく、他の多くの中枢神経疾患に共通する病態を模擬するものであると考える。

HTSA の細胞状態の評価方法に関しては、PrestoBlue は LDH assay や PI 染色に比べ、より低い H_2O_2 濃度で鋭敏に細胞状態の変化を検出した。PrestoBlue が生細胞による resazurin の還元を利用した試薬である一方、LDH assay は細胞死により細胞膜破壊が起こることで放出された LDH を検出する手法である。この違いが酸化ストレス下の細胞評価に対する感度の違いとなったと考える。細胞活性を細胞評価に用いたことで、本 HTSA は、HTSA 確立に必要な 3 つの統計学的パラメーターを満たすことに成功した。

HTSA が同定した候補薬剤 Berberine は、in vitro BBSCB モデルでの OGD + Reox ストレス下や、外傷性脳損傷モデルや脊髄損傷モデルにおいて、BBSCB 機能を保護した。このことは、本 HTSA が BBSCB 保護薬を効果的にスクリーニングできることを証明している。また、前述のように、BBSCB の破綻は多くの中枢神経疾患に共通の病態であるため(Bartanusz et al., 2011; Di et al., 2003; Lee et al., 2004; Lok et al., 2011; Rosenberg, 2012; Youdim et al., 2000; Zhao et al., 2011)、本 HTSA のヒット薬剤は、他の中枢神経疾患でも保護効果を示す可能性がある。さらに、本研究で同定された薬剤は、血管内皮細胞が標的で、他の薬剤のように神経細胞やグリア細胞を標的としないため、薬剤の BBSCB 透過性を必要としない(Kristensen and Brodin, 2017; Nzou et al., 2018; Saraiva et al., 2016)。神経保護薬の開発において、薬剤の BBSCB 透過性を担保することが、開発の障害となることが多いため、その点で、本 HTSA で同定される候補薬剤の臨床応用は進めやすい。

今回、本研究で同定された候補薬剤は、既存薬であるため安全性が担保されており早

期臨床応用が可能である。一方、候補化合物は、臨床応用に向けた最適化、代謝動態の解明、至適濃度の確定、安全性の確認などが必要であるが、既存薬以上の効能、高い安全性と汎用性を持つ可能性があり、研究開発を継続する価値があると考ええる。

Berberine は天然由来のアルカロイドであり様々な作用機序を持つ(Imenshahidi and Hosseinzadeh, 2016; Kumar et al., 2015; Liu et al., 2019)。明らかになっているものとして、AMPK 活性化や TNF- α , NF- κ B, prostaglandin (PGE) 2, COX-2 の制御などがある(Imenshahidi and Hosseinzadeh, 2016; Kumar et al., 2015)。これまでに、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発硬化症、外傷性脳・脊髄損傷などの中枢神経疾患に対して、Berberine の抗炎症作用による神経保護効果の報告がある(Kulkarni and Dhir, 2010; Lin and Zhang, 2018; Wang and Zhang, 2018; Zhang et al., 2012)。また、一部の報告は、抗炎症作用の結果として BBSCB 機能が保たれたと報告している(Chen et al., 2014; Lin and Zhang, 2018; Zhang et al., 2012)。今回、本研究は、Berberine が抗炎症作用を介さずに、直接 BBSCB 機能を保護することを、初めて見出した。これは、Berberine の新たな薬理作用であり、これまでの神経保護に関する報告も、抗炎症効果と BBSCB 機能保護効果の両方によるものであると考える。

今回、Berberine が頸髄損傷マウスの損傷範囲や神経細胞死を抑え、歩行機能を改善させたことから、Berberine は脊髄損傷に対する神経保護薬となりうる可能性が示された。最近、同様の報告がなされているが(Wang et al., 2017)、本研究は、BBSCB 機能保護を示した点、より詳細な運動機能解析を行っている点、より臨床を模擬した頸髄損傷で検討している点などより、Berberine の脊髄損傷治療への可能性をさらに示すものと考ええる。実際に脊髄損傷に臨床応用するためには、脳脊髄血管内皮細胞に対する分子生物学的機序の解明が必要であり、更なる研究が必要である。

総括および結論

- 脳脊髄血管内皮細胞保護効果を持つ薬剤探索のための HTSA を開発し、既存薬 1,600 種をスクリーニングした。
- 新規スクリーニング方法により、既存薬 37 種 (2.3%) がヒットし、そのうち脳脊髄血管内皮細胞保護薬の候補として、Berberine を同定した。
- Berberine は in vitro BBSCB モデル、外傷性脳損傷モデル、脊髄損傷モデルにおいて、BBSCB 機能を保護した。
- Berberine は脊髄損傷後の損傷範囲を縮小させ、歩行機能を改善した。
- Berberine は脊髄損傷に対する新規神経保護薬となる可能性がある。
- 本研究で開発した HTSA は、脳脊髄血管内皮細胞保護、BBSCB 保護を介した新規中枢神経保護薬の探索に有用である。
- 北大オリジナル化合物 2,385 種をスクリーニングし、化合物 49 種 (2.1%) がヒットし、新規神経保護薬の候補化合物 A とその類縁体が同定された。

一連の研究結果から、我々が開発した新規 HTSA は BBSCB 保護を介した新規中枢神経保護薬の探索に有用であると証明された。今回、既存薬ライブラリーと北大所有の化合物ライブラリーに対するスクリーニングにより、Berberine や化合物 A が同定されたが、他のライブラリーを使用した、更なるスクリーニングを進める予定である。また、候補薬剤の臨床応用のためには、BBSCB 保護効果の分子生物学的メカニズムの解明が重要であり、既存薬の既知の作用機序に加えて、RNA sequencing による網羅的解析に基づいた検討を行う予定である。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野博士課程の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表します。また、本研究全般にわたり、直接のご指導ご鞭撻を賜りました同運動器先端医学分野・角家健准特任准教授に心より感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費（JP17K10913）、日本医療研究開発機構（JP18gm6210004）、一般社団法人・日本損害保険協会（2017～2019年）、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）JP19am0101093（支援番号0652、1114）、次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発革新的中分個創薬技術の開発（AMED）、特別経費“バイオサーフィス国際連携研究教育拠点の構築”、先端研究基盤共用促進事業、武田科学振興財団の助成を受けたものです。関係各所の皆様にお礼申し上げます。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様、北海道大学大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センターの皆様（北海道大学薬学研究院 教授 前仲勝実教授、乙黒聡子技術職員）、長崎大学医歯薬学総合研究科医療科学専攻医科薬理学 中川慎介講師、Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale（Inserm, Paris, France）の Pierre-Olivier Couraud 氏のすべてのみなさまに、心より感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13-25.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol* 70, 194-206.
- Beske, O.E., and Goldbard, S. (2002). High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies. *Drug Discov Today* 7, S131-135.
- Borgens, R.B., and Liu-Snyder, P. (2012). Understanding secondary injury. *Q Rev Biol* 87, 89-127.
- Chen, C.C., Hung, T.H., Lee, C.Y., Wang, L.F., Wu, C.H., Ke, C.H., and Chen, S.F. (2014). Berberine protects against neuronal damage via suppression of glia-mediated inflammation in traumatic brain injury. *PLoS One* 9, e115694.
- Chen, K., Marsh, B.C., Cowan, M., Al'Joboori, Y.D., Gigout, S., Smith, C.C., Messenger, N., Gamper, N., Schwab, M.E., and Ichiyama, R.M. (2017). Sequential therapy of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training leads to cumulative improvements after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 292, 135-144.
- Chen, Z.L., Indyk, J.A., Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., Degen, J.L., and Strickland, S. (1999). Neuronal death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *J Neurosci* 19, 9813-9820.
- Cohen, D.M., Patel, C.B., Ahobila-Vajjula, P., Sundberg, L.M., Chacko, T., Liu, S.J., and Narayana, P.A. (2009). Blood-spinal cord barrier permeability in experimental spinal cord injury: dynamic contrast-enhanced MRI. *NMR Biomed* 22, 332-341.
- Cowan, K.M., and Easton, A.S. (2010). Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood-brain barrier. *Brain Res* 1332, 20-31.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412.
- del Valle, J., Camins, A., Pallas, M., Vilaplana, J., and Pelegri, C. (2008). A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue-Hoechst cocktail. *J Neurosci Methods* 174, 42-49.
- Deli, M.A., Abraham, C.S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25, 59-127.
- Deli, M.A.S., C.; Dung, N.; Joo, F. (1997). Immunohistochemical and electron microscopy

- detections on primary cultures of rat cerebral endothelial cells. In: Boer AG, Sutanto W (eds) Drug transport across the blood–brain barrier: In vivo and in vitro techniques.
- Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., and Carter, G.T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem* 38, 223-232.
- Ekmark-Lewen, S., Flygt, J., Kiwanuka, O., Meyerson, B.J., Lewen, A., Hillered, L., and Marklund, N. (2013). Traumatic axonal injury in the mouse is accompanied by a dynamic inflammatory response, astroglial reactivity and complex behavioral changes. *J Neuroinflammation* 10, 44.
- Entzeroth, M., Flotow, H., and Condron, P. (2009). Overview of high-throughput screening. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 9*, Unit 9 4.
- Galgano, M., Toshkezi, G., Qiu, X., Russell, T., Chin, L., and Zhao, L.R. (2017). Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplant* 26, 1118-1130.
- Imenshahidi, M., and Hosseinzadeh, H. (2016). Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. *Phytother Res* 30, 1745-1764.
- Iversen, P.W., Beck, B., Chen, Y.F., Dere, W., Devanarayan, V., Eastwood, B.J., Farnen, M.W., Iturria, S.J., Montrose, C., Moore, R.A., *et al.* (2004). HTS Assay Validation. In *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J.M.M. Caaveiro, T.D.Y. Chung, *et al.*, eds. (Bethesda (MD)).
- Jones, L.L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W.B., and Tuszynski, M.H. (2002). NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22, 2792-2803.
- Kadoya, K., Lu, P., Nguyen, K., Lee-Kubli, C., Kumamaru, H., Yao, L., Knackert, J., Poplawski, G., Dulin, J.N., Strobl, H., *et al.* (2016). Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat Med* 22, 479-487.
- Kim, S.M., Waters, P., Vincent, A., Go, M.J., Park, K.S., Sung, J.J., and Lee, K.W. (2011). Cerebrospinal fluid/serum gradient of IgG is associated with disability at acute attacks of neuromyelitis optica. *J Neurol* 258, 2176-2180.
- Kristensen, M., and Brodin, B. (2017). Routes for drug translocation across the blood-brain barrier: Exploiting peptides as delivery vectors. *J Pharm Sci* 106, 2326-2334.
- Kulkarni, S.K., and Dhir, A. (2010). Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res* 24, 317-324.
- Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R., and Dhull, D.K. (2015). Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur J Pharmacol* 761, 288-297.
- Lee, H.S., Namkoong, K., Kim, D.H., Kim, K.J., Cheong, Y.H., Kim, S.S., Lee, W.B., and Kim, K.Y. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain

- microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 68, 231-238.
- Lin, X., and Zhang, N. (2018). Berberine: Pathways to protect neurons. *Phytother Res* 32, 1501-1510.
- Liu, D.Q., Chen, S.P., Sun, J., Wang, X.M., Chen, N., Zhou, Y.Q., Tian, Y.K., and Ye, D.W. (2019). Berberine protects against ischemia-reperfusion injury: A review of evidence from animal models and clinical studies. *Pharmacol Res* 148, 104385.
- Lok, J., Leung, W., Zhao, S., Pallast, S., van Leyen, K., Guo, S., Wang, X., Yalcin, A., and Lo, E.H. (2011). gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects cerebral endothelial cells during injury and decreases blood-brain barrier permeability after experimental brain trauma. *J Neurochem* 118, 248-255.
- Lundholt, B.K., Scudder, K.M., and Pagliaro, L. (2003). A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen* 8, 566-570.
- Mayr, L.M., and Fuerst, P. (2008). The future of high-throughput screening. *J Biomol Screen* 13, 443-448.
- Morofuji, Y., Nakagawa, S., So, G., Hiu, T., Horai, S., Hayashi, K., Tanaka, K., Suyama, K., Deli, M.A., Nagata, I., *et al.* (2010). Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 30, 727-735.
- Nakagawa, S., Deli, M.A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K., and Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54, 253-263.
- Nakagawa, S., Deli, M.A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 27, 687-694.
- Natarajan, R., Northrop, N., and Yamamoto, B. (2017). Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-Dextran extravasation as a measure of blood-brain barrier permeability. *Curr Protoc Neurosci* 79, 958.1-958.15.
- Nzou, G., Wicks, R.T., Wicks, E.E., Seale, S.A., Sane, C.H., Chen, A., Murphy, S.V., Jackson, J.D., and Atala, A.J. (2018). Human cortex spheroid with a functional blood brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling. *Sci Rep* 8, 7413.
- Onose, G., Anghelescu, A., Muresanu, D.F., Padure, L., Haras, M.A., Chendreau, C.O., Onose, L.V., Mirea, A., Ciurea, A.V., El Masri, W.S., *et al.* (2009). A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury. *Spinal Cord* 47, 716-726.
- Oyinbo, C.A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71, 281-299.
- Park, J.Y., Kim, S.D., Park, J., Lim, D.J., Lee, H.K., and Chung, H.S. (2006). A new and simple

- transection knife for study of neurodegeneration and neuroregeneration in animal model. *Acta Neurochir Suppl* 99, 145-150.
- Prakash, R., and Carmichael, S.T. (2015). Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 28, 556-564.
- Qosa, H., Mohamed, L.A., Al Rihani, S.B., Batarseh, Y.S., Duong, Q.V., Keller, J.N., and Kaddoumi, A. (2016). High-throughput screening for identification of blood-brain barrier integrity enhancers: A drug repurposing opportunity to rectify vascular amyloid toxicity. *J Alzheimers Dis* 53, 1499-1516.
- Radu, M., and Chernoff, J. (2013). An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*, e50062.
- Ramon y Cajal, S. (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system* (Clarendon Press).
- Rosenberg, G.A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1139-1151.
- Salewski, R.P., Mitchell, R.A., Li, L., Shen, C., Milekovskaia, M., Nagy, A., and Fehlings, M.G. (2015). Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells mediate functional recovery following thoracic spinal cord injury through remyelination of Axons. *Stem Cells Transl Med* 4, 743-754.
- Saraiva, C., Praca, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., and Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release* 235, 34-47.
- Sashindranath, M., Daglas, M., and Medcalf, R.L. (2015). Evaluation of gait impairment in mice subjected to craniotomy and traumatic brain injury. *Behav Brain Res* 286, 33-38.
- Saunders, N.R., Dreifuss, J.J., Dziegielewska, K.M., Johansson, P.A., Habgood, M.D., Mollgard, K., and Bauer, H.C. (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci* 8, 404.
- Saunders, N.R., Dziegielewska, K.M., Mollgard, K., and Habgood, M.D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci* 9, 385.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.
- Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D., and Friedman, A. (2010). Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 6, 393-403.
- Sifat, A.E., Vaidya, B., and Abbruscato, T.J. (2017). Blood-brain barrier protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke. *AAPS J* 19, 957-972.

- Sommer, C.J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 245-261.
- Sorby-Adams, A.J., Marcoionni, A.M., Dempsey, E.R., Woenig, J.A., and Turner, R.J. (2017). The role of neurogenic inflammation in blood-brain barrier disruption and development of cerebral oedema following acute central nervous system (CNS) injury. *Int J Mol Sci* 18.
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., and Hickman, J.J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* 20, 107-126.
- Sweeney, M.D., Ayyadurai, S., and Zlokovic, B.V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* 19, 771-783.
- Takeshita, T., Nakagawa, S., Tatsumi, R., So, G., Hayashi, K., Tanaka, K., Deli, M.A., Nagata, I., and Niwa, M. (2014). Cilostazol attenuates ischemia-reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction enhanced by advanced glycation endproducts via transforming growth factor-beta1 signaling. *Mol Cell Neurosci* 60, 1-9.
- Wang, H., Liu, C., Mei, X., Cao, Y., Guo, Z., Yuan, Y., Zhao, Z., Song, C., Guo, Y., and Shen, Z. (2017). Berberine attenuated pro-inflammatory factors and protect against neuronal damage via triggering oligodendrocyte autophagy in spinal cord injury. *Oncotarget* 8, 98312-98321.
- Wang, J., and Zhang, Y. (2018). Neuroprotective effect of berberine agonist against impairment of learning and memory skills in severe traumatic brain injury via Sirt1/p38 MAPK expression. *Mol Med Rep* 17, 6881-6886.
- Weksler, B., Romero, I.A., and Couraud, P.O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 10, 16.
- Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., *et al.* (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 19, 1872-1874.
- Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., and Searson, P.C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6, 7.
- Xu, C.J., Peng, Z., Dai, T.L., Niu, X.Y., Wang, J.L., Jin, M.S., and Min, L. (2014). Evaluation of blood-brain barrier permeability in tryptophan hydroxylase 2-knockout mice. *Exp Ther Med* 8, 1467-1470.
- Xue, H., Li, J., Xie, H., and Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *Int J Biol Sci* 14, 1232-1244.
- Youdim, K.A., Avdeef, A., and Abbott, N.J. (2003). In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today* 8, 997-1003.
- Youdim, K.A., Martin, A., and Joseph, J.A. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 51-

60.

Zhang, X., Zhang, X., Wang, C., Li, Y., Dong, L., Cui, L., Wang, L., Liu, Z., Qiao, H., Zhu, C., *et al.* (2012). Neuroprotection of early and short-time applying berberine in the acute phase of cerebral ischemia: up-regulated pAkt, pGSK and pCREB, down-regulated NF-kappaB expression, ameliorated BBB permeability. *Brain Res* 1459, 61-70.

Zhao, R., Fang, S.H., Lin, K.N., Huang, X.Q., Lu, Y.B., Zhang, W.P., and Wei, E.Q. (2011). Pranlukast attenuates hydrogen peroxide-induced necrosis in endothelial cells by inhibiting oxygen reactive species-mediated collapse of mitochondrial membrane potential. *J Cardiovasc Pharmacol* 57, 479-488.