

## 脳血管の密着結合分子を標的とする血液脳関門制御技術の開発

岡田欣晃

大阪大学 大学院薬学研究科 生命情報解析学分野

### 【研究の背景】

高齢化、ストレス社会化により脳疾患の患者が増加している。国内外で脳疾患治療薬の開発が精力的に進められているが、その開発は難航している。その主な原因の一つに、薬物の脳内移行を阻む、血液脳関門の存在がある。血液脳関門の本体は低分子の脳移行を防ぐ脳血管に特有のバリア機能であり、異物から脳を守る重要な役割を担っている。一方で、この血液脳関門は、薬物の脳への移行も阻害してしまうため、優れた脳疾患治療効果を持つ候補分子も、脳送達されないため医薬品化できないことが問題となっている。血液脳関門は、血管の内腔を覆う内皮細胞間の Claudin-5 (CL-5) を介する密着結合により生み出される。CL-5 は脳血管に高発現する膜タンパク質であり、細胞外の 2 つのループを介して細胞を接着させ、バリア機能を生み出す。そこで我々は、CL-5 に結合する分子を創製し、CL-5 結合を一過的に弱めることで、脳血管のバリアを低下させ、物質の脳移行を促進する戦略を考えた。これまでに CL-5 結合分子として、CL-5 細胞外ループに結合する抗体を創製し、それらが血液脳関門の物質透過を促進する活性を有することを明らかにしている<sup>1,2)</sup>。

### 【目 的】

本研究では、これまでに開発した CL-5 抗体を用いた血液脳関門制御技術を低コスト化し、かつ汎用性の高い技術へ発展させる。具体的には、CL-5 に結合する低分子化合物を創製し、それを用いた血液脳関門制御技術を開発する。

### 【方 法】

- 1) CL-5 に結合する低分子化合物を取得するために、化合物ライブラリのスクリーニングを実施する。既に構築している CL-5 を膜に埋め込んだリポソームを用いた CL-5 結合分子のスクリーニング系を用いて、9600 化合物を含むライブラリのスクリーニングを行う。得られた候補化合物のバリア制御活性、物質透過促進活性を、培養細胞を用いた電気抵抗値測定、低分子色素透過実験により評価する。
- 2) 候補化合物の *in vivo* における血液脳関門制御活性を評価する。まず、評価に用いる、ヒト型 CL-5 を持つノックインマウスを作製する。本マウスに候補化合物と、トレーサー蛍光色素を共投与し、色素の脳血管外漏出量を測定する。得られた結果から、脳への物質送達促進活性が最も高い化合物を同定する。

### 【結 果】

- 1) CL-5 に結合する低分子化合物のスクリーニングにより、2 種の候補化合物を選定した。これら化合物の血液脳関門制御活性を、細胞シートを用いた電気抵抗値測定により解析したところ、CL-5 依存性的にかつ、一過的にバリア機能を減弱させることが明らかになった。さらに、培養細胞を用いた *in vitro* 血液脳関門モデルを用いた解析から、これら化合物が血液脳関門のバリア制御活性、物質透過促進活性を有することが明らかになった。
- 2) マウス ES 細胞のゲノム中の CL-5 をコードする配列を、ヒト CL-5 のコード配列に相同組換えにより置換した。得られた ES 細胞からキメラマウスを作製し、ヒト CL-5 マウスを樹立した。得られたマウスに低分子蛍光色素を投与したが、脳血管

外への漏出は観察されなかったことから、ヒト CL-5 マウスが正常な血液脳関門を有することが示された。現在、得られたマウスに CL-5 結合化合物と蛍光色素を共投与し、血液脳関門を介する物質透過促進活性を評価している。

### 【考 察】

化合物ライブラリのスクリーニングにより、*in vitro* 血液脳関門モデルでバリア制御活性を有する低分子化合物の取得できた。取得した化合物は、CL-5 結合抗体と異なり一過的にバリアを減弱させる活性を有する。血液脳関門を緩める時間が短い点において安全性が高い分子と考えられるが、この一過的な活性で、脳内に充分量の薬物を送達することが可能かについては、ヒト CL-5 マウスを用いて解析していく必要がある。また、取得した低分子化合物は *in vitro* 血液脳関門モデルでは良好な活性を示しているが、*in vivo*での安定性については体内動態を解析し、化合物の構造展開を図っていく必要がある。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

アルツハイマー、パーキンソン病など脳疾患の患者が増加の一途をたどっているが、治療薬開発は難航している。製薬会社、アカデミアの研究者が開発した優れた脳疾患治療薬の候補分子の脳移行性を高め医薬品化するために、本技術は大きな貢献をすると期待される。特に低分子化合物を用いた血液脳関門制御技術は、医薬品のコスト低減と、安定性の向上が可能となり、世界中に安価な脳疾患治療薬を届けられることにつながる。本研究を継続し汎用性の高い血液脳関門制御技術を開発し、脳疾患治療薬の開発スピードの加速に貢献していきたい。

### 【参考・引用文献】

1. Hashimoto Y, Zhou W, Hamauchi K, Shirakura K, Doi T, Yagi K, Sawasaki T, Okada Y, Kondoh M, Takeda H. Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci Rep.* 2018;8(1):8383.
2. Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Takeda H, Endo K, Tamura M, Watari A, Sadamura Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;363(2):275-283.