

200637021A

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立  
に関する研究

平成18年度 総括・分担報告書

主任研究者 大野泰雄

平成19（2006）年 4月

主任研究者

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・副所長）

分担研究者

小泉修一（国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部）

片岡泰文（福岡大学薬学部）

楠原洋之（東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室）

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

総括・分担研究者 大野 泰雄

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究-----	1
大野泰雄	
II. 分担研究者報告	
1. 医薬品による中枢性副作用例に関する収集・解析-----	9
大野泰雄	
2. In Vitro BBBモデルを用いた各種薬物の作用評価及び副作用機序の解明 -----	13
小泉修一	
3. In vitro BBB病態モデル作成及びかKしゅ薬物の脳内移行性評価-----	19
片岡泰文	
4. 血液脳関門を介した異物排泄メカニズムにおける薬物間相互作用の 予測システムの開発 -----	23
楠原洋之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27

「血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立」に関する研究

主任研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所、副所長）

**研究要旨** 非ステロイド性抗炎症薬や免疫抑制剤など種々の医薬品が引き起こす中枢毒性や病態の悪化が、血液脳関門（BBB）機能障害に起因している可能性が示唆されているが、両者の直接的な関連性は明らかにされていない。BBBは、毛細血管内皮細胞、血管周皮細胞及びアストロサイトにより構築されているが、これらの細胞機能に対する医薬品等の作用も明らかにされていない。In vitro BBB 病態モデル（発熱及び炎症性障害モデル）を作成し、本モデルが BBB 病態モデルとして病態時の薬物の脳内移行性を評価する有用なツールとなり得ることを示した。また、BBB 構成細胞であるアストロサイト及び血管周皮細胞は、傷害された細胞から放出される ATP を用いてコミュニケーションを取るが、この ATP シグナルの変調においてマトリックスメタロプロテアーゼ MMP9 が産生され、BBB 破綻の引き金となる可能性が強く示唆された。さらに、血液脳関門に発現する新規 ABC トランスポーターとして BCRP を見出し、発現系を用いた in vitro 輸送実験、ならびに BCRP ノックアウトマウスを用いた in vivo 実験を行い、BCRP が P-gp と一部基質を共有すること、またダントロレンが BCRP を介する薬物の脳内移行性評価のために有用な薬物であることを明らかとした。

分担研究者

片岡泰文 福岡大学薬学部・教授  
小泉修一 国立医薬品食品衛生研究所薬理部・室長/山梨大学医学部・教授  
楠原 洋之 東京大学大学院薬学系研究科・助教授

A. 研究目的

解熱鎮痛薬、免疫抑制剤等の薬物による脳炎、脳症、振戦、けいれんなどの重篤な中枢神経系の副作用が報告されている。これら薬剤は、BBB により脳内移行が制限されているにも関わらず、中枢性有害作用が発現することから医薬品の血液脳関門（BBB）透過への影響が懸念される。また、病態時の BBB 機能変化は明らかになっておらず、各医薬品によるその機能への影響も不明である。そこで昨年度来、BBB 機能に注目して、薬物の中枢性有害作用発現予測システム及び中枢性副作用を回避するシステムを構築することを目的として研究を進めてきた。物質の脳内移行性を制限する BBB 機能は、主に毛細血管内皮細胞に発現している各種トランスポーターと密着結合（tight junction）によって形成されているが、これらを取り巻く血管周皮細胞（pericytes）及びアストロサイトは、BBB 機

能に強く影響する。BBB 機能の破綻には、tight junction の傷害による生理的な破綻と併用薬との薬物間相互作用による異物排泄メカニズムの機能低下による薬物動態学的な破綻の 2 つの可能性を考慮することが必要である。

そこで本年度の研究は、1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査すること、2) 発熱・炎症 in vitro BBB モデルを作製し、医薬品による BBB 機能に対する影響を検討し、中枢性有害作用との関連性を明らかにし医薬品の安全性確立を目指すこと、3) BBB 機能障害の分子メカニズムを、血管内皮細胞を取り巻くアストロサイト-周皮細胞に注目して解析し、特に傷害時に必ず放出・漏出 ATP を介するシグナルがこれら細胞において BBB を破壊するマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) 産生する点に注目して解析を行うこと、さらに 4) トランスポーターに注目した BBB 機能解析を特に ABC トランスポーター-BCRP について、発現系を用いた in vitro 輸送実験、並びに BCRP ノックアウトマウスを用いた in vivo 実験を行い、BBB の薬物相互作用予測システムの開発を目指すこと、の 4 つの方向で研究を進める。

## B. 研究方法

B-1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査

医薬品・医療用具等安全性情報（厚生労働省医薬局）、医薬品安全性情報（国立医薬品食品衛生研究所）及び各種報道資料より中枢神経系副作用に関する情報を抽出し、BBB 機能障害との関連性を考察した。

B-2) 血液脳関門再構成系 *in vitro* BBB 常態モデルを用いた検討

脳微小梗塞周囲部-BBB モデル：マウス脳血管内皮細胞株 (MBEC4) を培養インサートに播種し、*in vitro* BBB モデルを作製した。本モデルを glucose-free Ringer、37°C、95% N<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 虚血条件下で 4 時間インキュベートした (hypoxia) 後、glucose 含有 Ringer、95% air / 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間 (reoxygenation)、さらに glucose+血清含有 Ringer、95% air / 5% CO<sub>2</sub> 下で 0-7 日間インキュベート (再構成) し、脳微小梗塞周囲部-BBB モデル (hypoxia 群) とした。

発熱-BBB モデル：高温培養条件を BBB モデルに負荷することにより病態モデルを作製した。すなわち、serum free DMEM、38.5, 39, 40, 41°C、95% Air / 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 6 時間インキュベートした。

BBB 透過性評価：上記の各病態モデルを使用し、血管側に sodium fluorescein (Na-F) および Evans blue albumin (EBA) を入れ、脳実質側から回収し透過係数を算出し、BBB 透過性の指標とした。

P-糖蛋白 (P-gp) 排出機能評価：MBEC4 培養プレートもしくは上記モデルを使用し、rhodamine 123 を加えて、一時間後に NaOH で可溶化し、MBEC4 内 rhodamine 123 (R123) 蓄積量を測定し、P-gp 機能の指標とした。

B-3) BBB 機能障害の分子メカニズムの検討

血管周皮細胞の培養：既報に従い、幼弱ラットの前脳より血管周辺組織を取り出し、内皮細胞が増殖しない条件で、初代培養を行った。血管周皮細胞は抗  $\alpha$  smooth muscle actin (aSMA) 抗体で確認した。

アストロサイトの培養：既報に従い、一日齢ラットの前脳より、初代培養を行った。アストロサイトの精製は、一晩の振とうにより行った。アストロサイトは、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体により確認した。

細胞内カルシウム濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 測定法：既報に従い、fura2 法及び fluo4 による共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

MMP 9 の測定：培養血管周皮細胞及びアストロサイトを各種 ATP アナログで刺激した後、24 時間後に細胞内の MMP 9 量を、Western blotting 法及びゼラチンの可溶性を観察するザイモグラフィにて定量的に観察した。

カイニン酸 (KA) 誘発 BBB 傷害モデル動物の作成：ラットに KA (10 mg/kg, i. p.) を投与して BBB 障害モデル動物を作成した。BBB 機能はエバンスブルー色素の漏出を指標とした。

B-4) トランスポーターを介した BBB の異物排泄機構への影響の検討

マウスに静脈内定速静注を行い、定常状態での血漿中濃度ならびに脳内濃度を測定した。特に脳毛細血管内皮細胞の管腔側に発現していることが明らかにされている ABC トランスポーター-BCRP に注目し、そのノックアウト動物を用い、*in situ* 脳灌流法を適用し、薬物の脳移行性を検討し、野生型マウスと比較した。さらに、MDCK II 細胞に BCRP を、LLC-PK1 細胞に P-gp/Mdr1a をそれぞれ発現させた細胞を多孔性フィルター上に単層培養し、経細胞輸送を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験等倫理委員会の承認の元、動物実験を行った。

## C. 研究結果

C-1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査

前年度に引き続き、中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こす医薬品を検索した。抗生物質テリスロマイシン、高コレステロール血症治療薬エゼチミブが、中枢性副作用を誘発する可能性が報告されていた。抗ウイルス薬リン酸オセルタミビル服用と異常行動の報道がなされているが、明確な因果関係は未だに不明であった。また、これらの中枢性有害事象と、BBB 及び脳血管系への作用との直接的な因果関係を示すような報告は無かった。

C-2) 血液脳関門再構成系 *in vitro* BBB 病態モデルを用いた検討

1) 各種 *in vitro* BBB モデルの比較：

各 BBB モデルの TEER は脳血管内皮細胞単層培養系と比較し、共培養系 (アストロサイト、ペリサイト) で上昇した。脳血管内皮細胞と

ペリサイトが接着し、アストロサイトが非接着である3種共培養系(EPA型)で、TEERが有意に上昇し最高値を示した。EPA型モデルでは、脳血管内皮細胞接合部位で密着結合構成タンパク質の発現が認められ、発現量は他のモデルと比較して高かった。また、輸送タンパク質に関してもEPA型ではグルコーストランスポーター、LDLレセプター、多剤耐性タンパク質およびP-糖タンパク質の発現が認められた。

## 2) 発熱・炎症 *in vitro* BBBモデル:

高温度負荷(38-41°C)により、脳血管内皮細胞のNa-FおよびEBA透過係数は、温度依存的に増加した。またこのときの細胞傷害は認められなかった。

脳血管内皮細胞単層培養系では、LPS刺激によって透過性は変化しなかった。一方、マイクログリア共培養系では、LPS濃度(10, 100ng/mL)依存的にNa-F、EBA透過係数が増加した。

## C-3) BBB機能障害の分子メカニズムの検討

1) ペリサイト-アストロサイト連関: これまでの研究により、培養ペリサイトにはP2Y2受容体が、またアストロサイトにはP2Y1受容体が非常に強く発現していることが明らかとなった。両細胞の共培養系を用いた検討により、アストロサイトの刺激及びアストロサイトの傷害は、ATPの化学シグナルとしてペリサイトに伝わる事が明らかとなった。さらに、アストロサイトは自発的なATP放出能を有しており、これにより、アストロサイト自身及びペリサイトは常に一定程度のATP刺激に曝されていることが明らかとなった。

2) ペリサイト及びアストロサイトのMMP-9産生: アストロサイト及びペリサイトが恒常的なATP刺激に曝されている生理的な意義を明らかにする目的から、aprase及びP2受容体拮抗薬により恒常的なP2受容体刺激シグナルを遮断した。Apyraseはペリサイト及びアストロサイトの両者において、非常に強いMMP-9産生を引き起こした。これは、TNF- $\alpha$ の産生とリンクしていた。つまり、アストロサイト及びペリサイトは、ATPによる恒常的な抑制的な支配を受けていることが明らかとなった。

3) *In vivo* BBB破壊モデル: カイニン酸(KA)投与により痙攣を誘発した動物では、BBB機能が破壊され、特に海馬におけるエバンスブルー色素の脳内漏出が顕著に観察された。またこのとき、アストロサイトは肥大し、突起が短くなった所謂反応性アストロサイトとなっていた。KA投与動物の海馬ではMMP-9の発現が強く観察された。MMP-9発現細胞の同定は未決定ではあるが、血管状の構造に沿った部位を中心に観察されていた。

## C-4) トランスポーターを介したBBBの異物排泄機構への影響の検討

1) 定常状態での脳内薬物濃度の比較により、MeIQx(2.4)、dantrolene(6.3)、flavopiridol(1.7)、prazosin(1.5)、triamterene(2.1)について、脳-血漿濃度比が増加した(カッコ内は増加した比を表す)。

2) 定常状態での脳内濃度が増加した化合物について、マウス *in situ* 脳灌流法を用いて脳移行性を測定した。その結果、dantrolene、daidzeinについてはBCRPノックアウトマウスで有意に増加していたが、定常状態で観察されたほど大きな変化ではなかった。

3) 昨年度報告したPhIPとこれらの化合物、植物エストロゲンについて、単層培養したBCRP発現MDCK II細胞を用いて経細胞輸送について評価した。いずれの化合物も、基底膜側から頂側膜側への経細胞輸送が促進されていた。BCRP発現細胞における基底膜側から頂側膜側、頂側膜側から基底膜側への経細胞輸送の比を非発現細胞での輸送比で除して得られるパラメータをCFR(corrected flux ratio)として、*in vivo*での脳-血漿濃度比の増加とプロットしたところ、両者の間に明確な相関は観察されなかった。P-gp/Mdr1a発現LLC-PK1細胞を用いて、経細胞輸送実験をおこない、CFRを計算した。BCRPノックアウトマウスで得られた脳内濃度の増加は、このP-gp/Mdr1aでのCFRとは逆相関を示した。

## D. 考察

外傷、炎症及び虚血性傷害時に必ず漏出するATPに注目し、ペリサイト-アストロサイト連関に与える影響を観察し、BBB機能との関連性を明らかとした。ペリサイトはP2Y2受容体を、またアストロサイトはP2Y1受容体を発現しており、両者はATPとこれら受容体を介して、非常に積極的にコミュニケーションを取っていることが明らかとなった。外傷及び脳虚血時には細胞外にATPが漏出し、細胞は高濃度ATPに曝されることが知られている。しかし、細胞外に大量に存在するATP分

解酵素 (NTPDase) により ATP は速やかに分解され、さらに NTPDase の upregulation により、細胞外 ATP 濃度は外傷・虚血前のレベルよりむしろ低下する可能性が示唆されている

(Braun et al., J. Neurosci., 18, 4891-4900, 1998)。今回、ペリサイト及びアストロサイトが常に ATP の刺激に曝され、またこの恒常的な ATP シグナルを遮断すると、アストロサイト及びペリサイト両細胞で MMP-9 が産生されることを明らかとした。MMP9 はマトロプロテアーゼであり、細胞外マトリックスを消化するだけでなく、オクルディン、クラウディン-5 といった密着結合を形成する蛋白を壊し、BBB 破綻を引き起こすことが知られている

(Yang, et al., J Cereb Blood Flow Metab., 27, 697-709, 2007)。一方、in vivo の BBB 破壊モデルにおいても、KA で BBB が破壊された脳部位では、MMP-9 の発現が顕著に亢進していた。今回、MMP-9 発現細胞を同定するには至らなかったが、アストロサイト様の細胞である可能性が強く示唆された。今回は、in vivo で投与可能な MMP-9 阻害薬が入手困難であったことから、MMP-9 と BBB 破綻との直接的なリンクは証明出来なかったが、今後 MMP-9 を RNA 干渉法等によりノックダウンすることにより、両者の関連性を明らかとする予定である。

以上外傷、炎症、虚血時には、恒常的な ATP シグナルの遮断に起因する MMP-9 の産生亢進が惹起され、これにより BBB 破綻が引き起こされる可能性が強く示唆された。

BCRP が脳内濃度を制御している化合物群を複数明らかにした。P-gp/Mdr1a の場合には、CFR と P-gp/Mdr1a ノックアウトマウスで増加する血漿-脳内濃度比の増加との間には良好な正の相関関係が見られるが、BCRP についてはこれは成立しないことが明らかとなった。一方で、BCRP ノックアウトマウスでの血漿-脳内濃度比は、P-gp/Mdr1a の CFR とは逆相関を示したことから、BCRP と P-gp/Mdr1a の基質選択性は重複しており、一部の BCRP 基質は P-gp/Mdr1a により血液脳関門でくみ出されるため、BCRP ノックアウトマウスで脳内濃度が見かけ上増加しないものと考えられる。

#### E. 結論

本研究では、簡便な BBB 透過性評価を可能とする新規 in vitro BBB モデルおよび発熱・炎症病態 BBB モデルを確立した。本モデルは常態時あるいは病態時の薬物の脳移行性を評価するうえで有用なツールとなり得る。また BBB を構成するアストロサイト及び血管

周皮細胞は、傷害細胞から漏出した ATP を用いてコミュニケーションを図るが、このコミュニケーション変調により、MMP-9 が産生され、BBB 破綻に繋がる可能性を示した。最後に、新規 ABC トランスポーター BCRP が BBB 機能に重要な役割を果たすが、これは P-gp/Mdr1a と一部基質選択性が重複していること、またダントロレンは、BCRP の脳内移行性を評価する有用な薬物であった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y: Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  production in brain pericytes contributes to cyclosporine A-induced dysfunction of the blood-brain barrier. Cell. Mol. Neurobiol. (in press)
2. Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y: An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. Cell. Mol. Neurobiol. (in press)
3. Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y: Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine. Cell. Mol. Neurobiol. (in press)
4. Nishioku T, Takata F, Yamauchi A, Sumi N, Yamamoto I, Fujino A, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y: Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells. J. Pharmacol. Sci. (in press)
5. 小泉修一 (2006) グリア細胞によるシナプス伝達制御に関する研究. ブレインサイエンス・レビュー2006 (伊藤正男、川合述史編)、105-120.
6. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) G 蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み. ペインクリニック、27, 560-568.
7. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み、Pain Research、21, 133-139.

8. Tozaki-Saito, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Retinoic acids increase P2X<sub>2</sub> receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Mol. Pharmacol.**, 70(1):319-328.
9. Shinozaki, T., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Activation of P2Y<sub>1</sub> receptors in astrocytes interferes the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked death promoting signaling cascades. **Glia**, 54(6):606-618.
10. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2007) UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis. **Nature**, in press.
11. Lee Y.J., Maeda J., Kusuhara H., Okauchi T., Inaji M., Nagai Y., Obayashi S., Nakao R., Suzuki K., Sugiyama Y. and Suhara T. In Vivo Evaluation of P-glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier in Nonhuman Primates Using [11C]Verapamil. **J Pharmacol Exp Ther.** 316: 647-53, 2006.
12. Ikoma Y., Takano A., Ito H., Kusuhara H., Sugiyama Y., Arakawa R., Fukumura T., Nakao R., Suzuki K. and Suhara T. Quantitative Analysis of 11C-Verapamil Transfer at the Human Blood-Brain Barrier for Evaluation of P-glycoprotein Function. **J Nucl Med.** 47: 1531-1537, 2006.
13. Takano A., Suhara T., Yasuno F., Suzuki K., Takahashi H., Morimoto T., Lee Y.J., Kusuhara H., Sugiyama Y. and Okubo Y. The antipsychotic sultopride is overdosed - a PET study of drug-induced receptor occupancy in comparison with sulpiride. **Int J Neuropsychopharmacol.** 9: 539-45, 2006.
- (2) 学会発表
1. Yamauchi A, Dohgu S, Takata F, Sumi N, Nishioku T, Shuto H, Niwa M, Kataoka Y.: Immunosuppressant and blood-brain barrier. Biofunction and Drug Discovery Symposium 2006, September 8-9, 2006, Fukuoka, Japan.
2. Koizumi, S., Fujishita, K., Sueishi, K., Kataoka, Y., Ohkubo, S. and Inoue, K. Intimate interaction mediated by P2Y<sub>2</sub> receptors between astrocytes and pericytes. 8<sup>th</sup> ISAAN, 2006年5月24日-28日、Ferrara, Italy.
3. Fujishita, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Upregulation of P2Y<sub>2</sub> receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. 8<sup>th</sup> ISAAN, 2006年5月24日-28日、Ferrara, Italy.
4. 小泉修一、後根神経節細胞の P2Y<sub>2</sub> 受容体と機械刺激応答、生理研シンポジウム、2006年6月26日-27日、岡崎
5. 小泉修一、アストロサイトの機能変化とシナプス伝達の可塑性、生理研シンポジウム、2006年6月28日-29日、岡崎
6. 末石浩二、多田薫、藤下加代子、片岡泰文、小泉修一、血管周皮細胞 (ペリサイト) -ATP/P2 受容体シグナルを介したマトリックスメタロプロテアーゼ放出-、生理研研究会 (ATP 研究会)、2006年9月7日-8日、岡崎
7. 藤下加代子、末石浩二、井上和秀、小泉修一、血管周皮細胞 (ペリサイト) -ATP/P2 受容体シグナルを介したアストロサイト-毛細血管連関-、生理研研究会 (ATP 研究会)、2006年9月7日-8日、岡崎
8. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、道具伸也、高田芙友子、Deli, M.A., 井上和秀、片岡泰文、BBB 機能とアストロサイトの P2 受容体、生体機能と創薬シンポジウム、2006年9月7日-8日、福岡
9. Koizumi, S., Nasu-Tada, K. Inoue, K. Absence of P2Y signal induces astrocytes to release TNF-alpha, which provides autocrine regulation of MMP-9. 第49回日本神経化学会、2006年9月14-16日
10. Koizumi, S., Nasu-Tada, K., Tsuda, M., Kunifusa, E. and Inoue, K. Involvement of spinal fibronectin in upregulation of microglial P2X<sub>4</sub>, a key molecule for mechanical allodynia. 日本神経科学会 2006年7月19日-21日、京都
11. 小泉修一、多田 薫、井上和秀、アストロサイトの P2Y 受容体抑制による MMP-9 産生と放出、2006年11月11日、第11回グリア研究会、東京
12. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイト P2Y<sub>1</sub> 受容体を介した神経保護作用、2006年11月11日、第11回グリア研究会、東京
13. Koizumi, S., Nasu-Tada, K., Inoue, K. Synthesis and secretion of MMP-9 by inhibition of P2Y receptors in astrocytes. Society for Neuroscience Meeting, 2006年10月14日-18日、Atlanta, USA.
14. Ohkubo, S. and Koizumi, S. Lipopolysaccharide alters P2Y receptor-mediated signaling in rat astrocytes via RGS-mediated mechanisms. Society for Neuroscience Meeting, 2006年10月14日

- 18 日、Atlanta, USA.
15. Koizumi, S., Shinozaki, Y., Nasu-Tada, K. and Inoue, K., Glial P2 receptors are attractive targets for drug discovery. (シンポジウム) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  16. Fujishita, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Upregulation by astrocytic ATP of M1 muscarinic acetylcholine receptor in hippocampal neurons. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  17. Nasu-Tada, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Release of matrix metalloproteinase-9 from pericytes via ATP/P2 receptor-mediated signals. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  18. Sueishi, K., Fujishita, K., Nasu-Tada, K., Takata, F., Kataoka, Y. and Koizumi, S. Release of matrix metalloproteinase-9 from pericytes via ATP/P2 receptor-mediated signals. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  19. Ohkubo, S., Koizumi, S. Enhancement of P2Y6 receptor-mediated signaling by lipopolysaccharide in rat hippocampal astrocytes. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  20. Suto, K., Ohkubo, S., Honda, K. and Koizumi, S. Adenosine enhances fluoxetine-induced BDNF production in rat hippocampal astrocytes. 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  21. Tozaki-Saito, H., Tsuda, M., Koizumi, S. and Inoue, K. Retinoid signaling regulates microglial P2X4 receptor expression and development of allodynia. 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  22. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Tonic and wide-ranging regulation of neurons by gliotransmitters. 第 84 回日本生理学会 (シンポジウム)、2007 年 3 月 20 日-22 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

小泉修一 (2006) グリア細胞によるシナプス伝達制御に関する研究. ブレインサイエンス・レビュー2006 (伊藤正男、川合述史 編)、105-120.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K. A., Kohsaka, S. and Inoue, K	UDP acting at P2Y <sub>6</sub> receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis.	Nature			in press
Shinozaki, T., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K.	Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-Mediated Death-Promoting Signaling Cascades in Astrocytes	Glia	54	606-618	2006
Tozaki-Saito, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M., Nagao, T. and Inoue, K.	Retinoic acids increase P2X <sub>2</sub> receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells.	Mol. Pharmacol.	319-328	319-328	in press
小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀	ATPを介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み	Pain Research	21,	133-139	2006
小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀	G蛋白質共役型ATP受容体と痛み	ペインクリニック	27	560-568	2006
Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Sumi N, Nakagawa S, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, Kataoka Y	Inhibition of transforming growth factor-β production in brain pericytes contributes to cyclosporine A-induced dysfunction of the blood-brain barrier	Cell Mol Neurobiol			in press
Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y	An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function	Cell Mol Neurobiol			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, <u>Kataoka Y</u>	Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both anti-prion activity and brain endothelial permeability than quinacrine	Cell Mol Neurobiol			in press
Nishioku T, Takata F, Yamauchi A, Sumi N, Yamamoto I, Fujino A, Naito M, Tsuruo T, Shuto H, <u>Kataoka Y</u>	Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells	J. Pharmacol. Sci.			in press
Lee Y.J., Maeda J., Kusuhara H., Okauchi T., Inaji M., Nagai Y., Obayashi S., Nakao R., Suzuki K., Sugiyama Y. and Suhara T.	In Vivo Evaluation of P-glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier in Nonhuman Primates Using [ <sup>11</sup> C]Verapamil	J Pharmacol Exp Ther.	316	647-53	2006
Ikoma Y., Takano A., Ito H., Kusuhara H., Sugiyama Y., Arakawa R., Fukumura T., Nakao R., Suzuki K. and Suhara T.	Quantitative Analysis of <sup>11</sup> C-Verapamil Transfer at the Human Blood-Brain Barrier for Evaluation of P-glycoprotein Function.	J Nucl Med	47	1531-1537	2006
Takano A., Suhara T., Yasuno F., Suzuki K., Takahashi H., Morimoto T., Lee Y.J., Kusuhara H., Sugiyama Y. and Okubo Y.	The antipsychotic sultopride is overdosed - a PET study of drug-induced receptor occupancy in comparison with sulpiride	Int J Neuropsychopharmacol	9	539-545	2006

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

血液脳関門破綻に基づく医薬品副作用の予測系の確立に関する研究  
医薬品による中枢性副作用例に関する収集・解析

分担研究者 大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）

研究要旨

中枢性有害作用は重篤なものが多い。そのなかで、医薬品等が血液脳関門（BBB）に作用することに起因すると考えられ有害作用も報告されている。インフルエンザ脳症と非ステロイド性抗炎症薬との関係、免疫抑制剤や抗生物質など種々の医薬品が引き起こす中枢毒性や病態の悪化が、BBB の機能障害に起因している可能性が示唆されているが、両者の直接的な関連性は明らかにされていない。本研究は前年度に引き続き、BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査を行った。抗生物質テリスロマイシン、高コレステロール血症治療薬エゼチミブが、中枢性副作用を誘発する可能性が報告されているが、明確な因果関係は未だに不明であった。

A. 研究目的

解熱鎮痛薬、免疫抑制剤等の薬物による脳炎、脳症、振戦、けいれんなどの重篤な中枢神経系の副作用が報告されている。これら薬剤は、BBB により脳内移行が制限されているにも関わらず、中枢性有害作用が発現することから医薬品の血液脳関門（BBB）透過への影響が懸念される。また、病態時の BBB 機能変化は明らかになっておらず、各医薬品によるその機能への影響も不明である。そこで、本研究は BBB 機能に注目し、薬物の中枢性有害作用発現予測システム及び中枢性副作用を回避するシステムを構築することを目的とした。

BBB 機能は、主に毛細血管内皮細胞が発現している各種トランスポーターと密着結合（tight junction）によって形成されているが、これらを取り巻く血管周皮細胞及びアストロサイトは、BBB 機能に強く影響すると共に、BBB としての機能も有する。

BBB 機能の破綻には、tight junction の障害による生理的な破綻と併用薬との薬物間相互作用による異物排泄メカニズムの機能低下による薬物動態学的な破綻の 2 つの可能性を考慮することが必要である。

そこで本研究では 1) BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査、2) BBB 構成細胞を *in vitro* で組み合わせ、

常態時および病態時の *in vitro* BBB モデルを作製し、医薬品による BBB 機能に対する影響を検討し、中枢性有害作用との関連性を明らかにし医薬品の安全性確立を目指した。3) BBB 機能障害の分子メカニズムを、血管内皮細胞を取り巻く周皮細胞及びアストロサイトに注目して解析し、特に傷害時に必ず放出・漏出する ATP による機能制御機序との関連性で探り、医薬品等の有害作用発生機序の及び薬物評価の為の指標と出来るべく検討を行った。更に、4) トランスポーターを介した BBB の異物排泄機構での薬物相互作用による BBB 機能の破綻に焦点をあて、異物排泄に働く ABC トランスポーターを明らかにし、薬物間相互作用評価系を確立することを目的とした。分担研究者は 1) の BBB 機能障害が関係していると思われる中枢神経系副作用の調査を担当した。

B. 研究方法

医薬品・医療機器等安全性情報（厚生労働省医薬食品局）、医薬品安全性情報（国立医薬品食品衛生研究所）及び各種報道資料より、中枢神経系副作用に関する情報を抽出し、BBB 機能障害との関連性を考察した。

(倫理面への配慮)

全て、公表されているデータを使用した。  
また、個人を特定する情報は扱っていない。

### C. 研究結果

前年度に引き続き、中枢神経系用剤以外で  
中枢神経系副作用を起こす医薬品を検索した。

#### テリスロマイシン

テリスロマイシン服用による、突然の意識消  
失が4件報告されている。意識消失までの時  
間は、それぞれ、投与3時間、4時間、1日  
及び2日である。前例とも回復したが、一件  
は自動車運転中に意識消失を起こし、事故を  
起こした。(薬食案発第0415001号、及び安全  
性情報2005.1.14)

#### エゼチミブ (日本未発売、申請中)

エゼチミブは高コレステロール血症治療薬と  
して欧米で認可されている薬剤で、日本では  
未発売だが、現在申請中である。2003年6月に  
オーストラリアで発売された後、報告された  
副作用265件のうち、うつ病(9)及び抑うつ  
症状(3)の中枢性副作用が報告されている。  
これら全例において、エゼチミブが唯一の被  
疑薬であった。報告のうち、7件では投与後  
4日以内、別の3件では4-6週間後に症状  
が発現した。再投与での再発に関する報告5  
件の他、4例はエゼチミブの中止後に回復、  
さらに1例はエゼチミブ中止後の抗うつ剤治  
療により回復した。他の高脂血症薬に比べて、  
副作用報告数中、うつ病/抑うつ気分の報告が  
占める割合は、エゼチミブが高かった(エゼ  
チミブ、4.5%; データベース全体、1.4%)。

(医薬品安全性情報 Vol 4, No. 22)

昨年度、一昨年度の検索により、中枢性副作  
用が疑われた免疫抑制剤、NSADsシクロスポ  
リン及びタクロリムスのような免疫抑制剤、  
NASID等以外では、以上の2例であるが、抗ウ  
イルス薬リン酸オセルタミビル服用と中枢性  
副作用が疑われる事例が新聞報道等でなされ  
て社会的な問題となっているので、それに対  
する厚労省の見解をまとめた。

#### インフルエンザ脳症とリン酸オセルタミビル インフルエンザの治療薬リン酸オセルタミビ

ル(商品名、タミフル)と異常行動による事  
故死との関連性が社会的にも医学的にも問題  
となっている。横田班のこれまでの報告では、  
インフルエンザ患者(主に0-12歳)ではオ  
セルタミビル服用群及び非服用群それぞれ、  
11.9及び10.6%に異常行動が現れ、両群間  
に発生率の有意差は認められず、多変量解析で  
も、オセルタミビルの投与と種々の異常言動  
との間に明確な関連性は認められない、とされ  
ている(『インフルエンザに伴う随伴症状の発  
現状況に関する調査研究』)。しかし、2007年  
2月にタミフルを服用した中学生が自宅マン  
ションから転落死する事故が2件続いたこと  
を受け、厚労省は、今後、十分な情報収集及  
び専門家による十分な検討を行う必要性があ  
るとの報道を行った(厚労省)。

### D. 考察

今回も医薬品による中枢神経系への副作用  
発現において、それらのBBB及び脳血管系への  
作用との直接的な因果関係を示すような報告  
は無かった。また、特に昨年度以降、新たに  
中枢性有害作用が報告された医薬品としては、  
テリスロマイシン及びエゼチミブ(日本未発  
売)の2薬品のみであった。リン酸オセルタ  
ミビルの中枢性有害作用に関する報道が社会  
的な問題となっており、慎重に調査検討が行  
われているが、現時点では、同薬物と異常行  
動との明確な因果関係は明らかとなってい  
ない。従って、昨年度から問題になっている、  
免疫抑制剤シクロスポリン及びNSAIDsメフ  
ナム酸及びジクロフェナクに注目して、その  
BBB破綻との因果関係、作用の詳細および作  
用機序を*in vitro*及び*in vivo*試験系を用いて明  
らかにすることが必要と考えられる。作用機  
序の解明に関しては、BBBを構成する毛細管  
内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトの3  
種類の細胞それぞれに対する作用に加え、内  
皮細胞に存在する特異的トランスポーター機  
能との関連性を明らかにする必要がある。

### E. 結論

昨年度の検索以降、新たな中枢性副作用を  
呈する医薬品はテリスロマイシン及びエゼチ  
ミブであった。免疫抑制剤、NSAIDsの頻度  
が高い医薬品等に絞り、BBB機能と中枢性有害

作用発症との因果関係を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし  
2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)

1. 特許取得  
該当なし  
2. 実用新案登録  
該当なし  
3. その他  
該当なし

## 別紙5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社 名	出版地	出版 年	ページ
該当なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

**研究要旨** 血液脳関門(BBB)は、血管内皮細胞、血管周皮細胞（ペリサイト）及びアストロサイトより構成され、物質の脳への移行を制限している。病態下での BBB 機能は極度に変化し、時に医薬品による中枢性有害作用発現を引き起こす。カイニン酸(KA)投与動物ではエバンスブルー色素の漏出が顕著に増大し、BBB が破壊されていることが明らかとなった。この KA 投与動物では BBB 破壊部位で MMP-9 の産生が顕著に認められた。MMP-9 は細胞外マトリックスと共に BBB の密着結合を壊すことが良く知られている。一昨年度は、BBB 構成要素のうちアストロサイトに、昨年度はペリサイトに注目して検討を行ったが、本年度はペリサイトーアストロサイト連関に注目して検討を行い、両者が恒常的な ATP による抑制性支配を受けていること、この抑制の遮断により MMP-9 が産生され、BBB 機能が障害される可能性を示唆した。

## A. 研究目的

医薬品による副作用の中で、中枢性有害作用は重篤なものが多い。例えばインフルエンザ時のある種の解熱鎮痛薬の服用は脳症及びその増悪作用を引き起こし、それは死に直結する。通常医薬品は血液脳関門 (BBB) によりその脳内移行性が制限されているが、BBB の病態生理については不明な点が多く、各医薬品による BBB 機能への影響も明らかではない。インフルエンザ脳症モデル動物による病理組織解析によると、最も顕著な形態変化は BBB を形成するアストロサイト及び周皮細胞（ペリサイト）であった。一昨年度はアストロサイトに注目して BBB との関連性を追求し、昨年度は BBB 構成成分のうち、ペリサイトに注目し、その機能を傷害時に漏出する ATP との関連性から解析を行った。本年度は、アストロサイトーペリサイト機能連関の側面から検討を行った。また BBB 破綻を引き起こす、*in vivo* 病態モデル動物を作成し、実際の BBB 機能と医薬品の副作用との関連性を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

ペリサイトの培養：既報に従い、幼弱ラットの前脳より血管周辺組織を取り出し、内皮細胞が増殖しない条件で、初代培養を行った。ペリサイ

トは抗  $\alpha$  smooth muscle actin (aSMA) 抗体で確認した。

アストロサイトの培養：既報に従い、一日齢ラットの前脳より、初代培養を行った。アストロサイトの精製は、一晩の振とうにより行った。アストロサイトは、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体により確認した。

細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 測定法：既報に従い、fura2 法及び fluo4 による共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

MMP 9 の測定：培養ペリサイトを各種 ATP アナログで刺激した後、24 時間後に細胞内の MMP 9 量を、Western blotting 法及びゼラチンの可溶性を観察するザイモグラフィにて定量的に観察した。

*In vivo* BBB 破綻モデル動物の作成：ラット (12-15 週齢) にカイニン酸 (10 mg/kg) を腹腔投与して痙攣を誘発させた。その後、尾静脈より青色色素 (エバンスブルー) を投与し、脳内に漏れ出した色素を吸光度法により検出した。

(倫理面への配慮)

本研究施設に設置されている動物実験等倫理委員会の承認の元、実験を行った。

## C. 研究結果

ペリサイトーアストロサイト連関：これまでの研

究により、培養ペリサイトには P2Y2 受容体が、またアストロサイトには P2Y1 受容体が非常に強く発現していることが明らかとなった。両細胞の共培養系を用いた検討により、アストロサイトの刺激及びアストロサイトの傷害は、ATP の化学シグナルとしてペリサイトに伝わる事が明らかとなった。さらに、アストロサイトは自発的な ATP 放出能を有しており、これにより、アストロサイト自身及びペリサイトは常に一定程度の ATP 刺激に曝されていることが明らかとなった。

ペリサイト及びアストロサイトの MMP-9 産生: アストロサイト及びペリサイトが恒常的な ATP 刺激に曝されている生理的な意義を明らかとする目的から、apyrase 及び P2 受容体拮抗薬により恒常的な P2 受容体刺激シグナルを遮断した。Apyrase はペリサイト及びアストロサイトの両者において、非常に強い MMP-9 産生を引き起こした。これは、TNF- $\alpha$  の産生とリンクしていた。つまり、アストロサイト及びペリサイトは、ATP による恒常的な抑制的な支配を受けていることが明らかとなった。

In vivo BBB 破壊モデル: カイニン酸 (KA) 投与により痙攣を誘発した動物では、BBB 機能が破壊され、特に海馬におけるエバンスブルー色素の脳内漏出が顕著に観察された。またこのとき、アストロサイトは肥大し、突起が短くなった所謂反応性アストロサイトとなっていた。KA 投与動物の海馬では MMP-9 の発現が強く観察された。MMP-9 発現細胞の同定は未決定ではあるが、血管状の構造に沿った部位を中心に観察されていた。

#### D. 考察

外傷、炎症及び虚血性傷害時に必ず漏出する ATP に注目し、ペリサイト-アストロサイト連関に与える影響を観察し、BBB 機能との関連性を明らかとした。ペリサイトは P2Y2 受容体を、またアストロサイトは P2Y1 受容体を発現しており、両者は ATP とこれら受容体を介して、非常に積極的にコミュニケーションを取っていることが明

らかとなった。外傷及び脳虚血時には細胞外に ATP が漏出し、細胞は高濃度 ATP に曝されることが知られている。しかし、細胞外に大量に存在する ATP 分解酵素 (NTPDase) により ATP は速やかに分解され、さらに NTPDase の upregulation により、細胞外 ATP 濃度は外傷・虚血前のレベルよりむしろ低下する可能性が示唆されている (Braun et al., J. Neurosci., 18, 4891-4900, 1998)。今回、ペリサイト及びアストロサイトが常に ATP の刺激に曝され、またこの恒常的な ATP シグナルを遮断すると、アストロサイト及びペリサイト両細胞で MMP-9 が産生されることを明らかとした。MMP9 はメタロプロテアーゼであり、細胞外マトリックスを消化するだけでなく、オクルディン、クラウディン-5 といった密着結合を形成する蛋白を壊し、BBB 破綻を引き起こすことが知られている (Yang, et al., J Cereb Blood Flow Metab., 27, 697-709, 2007)。一方、in vivo の BBB 破壊モデルにおいても、KA で BBB が破壊された脳部位では、MMP-9 の発現が顕著に亢進していた。今回、MMP-9 発現細胞を同定するには至らなかったが、アストロサイト様の細胞である可能性が強く示唆された。今回は、in vivo で投与可能な MMP-9 阻害薬が入手困難であったことから、MMP-9 と BBB 破綻との直接的なリンクは証明出来なかったが、今後 MMP-9 を RNA 干渉法等によりノックダウンすることにより、両者の関連性を明らかとする予定である。

以上外傷、炎症、虚血時には、恒常的な ATP シグナルの遮断に起因する MMP-9 の産生亢進が惹起され、これにより BBB 破綻が引き起こされる可能性が強く示唆された。

#### E. 結論

KA 投与動物では、エバンスブルーの漏出を伴った BBB 破壊が起きており、これは MMP-9 の産生を伴っていた。MMP-9 は BBB を破壊する非常に強い因子であるが、主に ATP による恒常的な抑制を受けていると考えられる。この恒常的抑制の遮断により、毛細血管 niche を構成するアストロサイト及びペリサイトでは顕著な MMP-9 産生が引き

起こされる。外傷、炎症、及び虚血後に漏出する ATP に端を発する細胞外 ATP 濃度の劇的な変化は、MMP-9 の発現を介して、BBB 機能に非常に強い影響を与えることが明らかとなった。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 小泉修一 (2006) グリア細胞によるシナプス伝達制御に関する研究. プレインサイエンス・レビュー2006(伊藤正男、川合述史 編)、105-120.
2. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) G 蛋白質共役型 ATP 受容体と痛み. ペインクリニック、27、560-568.
3. 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006) ATP を介した皮膚ケラチノサイト間情報連絡と痛み、**Pain Research**、21、133-139.
4. Tozaki-Saito, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Retinoic acids increase P2X<sub>2</sub> receptor expression through the 5'-flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Mol. Pharmacol.**, 70(1):319-328.
5. Shinozaki, T., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Activation of P2Y<sub>1</sub> receptors in astrocytes interferes the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked death promoting signaling cascades. **Glia**, 54(6):606-618.
6. Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi,

B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. and Inoue, K. (2007) UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis. **Nature**, in press.

### 2. 学会発表

1. Koizumi, S., Fujishita, K., Sueishi, K., Kataoka, Y., Ohkubo, S. and Inoue, K. Intimate interaction mediated by P2Y<sub>2</sub> receptors between astrocytes and pericytes. 8<sup>th</sup> ISAAN, 2006年5月24日-28日、Ferrara, Italy.
2. Fujishita, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Upregulation of P2Y<sub>2</sub> receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. 8<sup>th</sup> ISAAN, 2006年5月24日-28日、Ferrara, Italy.
3. 小泉修一、後根神経節細胞の P2Y<sub>2</sub> 受容体と機械刺激応答、生理研シンポジウム、2006年6月26日-27日、岡崎
4. 小泉修一、アストロサイトの機能変化とシナプス伝達の可塑性、生理研シンポジウム、2006年6月28日-29日、岡崎
5. 末石浩二、多田薫、藤下加代子、片岡泰文、小泉修一、血管周皮細胞 (ペリサイト) -ATP/P2 受容体シグナルを介したマトリックスメタロプロテアーゼ放出-、生理研研究会 (ATP 研究会)、2006年9月7日-8日、岡崎
6. 藤下加代子、末石浩二、井上和秀、小泉修一、血管周皮細胞 (ペリサイト)・ATP/P2 受容体シグナルを介したアストロサイト・毛細血管関連-、生理研研究会 (ATP 研究会)、2006年9月7日-8日、岡崎
7. 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、道具伸也、高田芙友子、Deli, M.A., 井上和秀、片岡泰文、BBB 機能とアストロサイトの P2 受容体、生体機能と創薬シンポジウム、2006年9月7日

- 8 日、福岡

8. Koizumi, S., Nasu-Tada, K. Inoue, K. Absence of P2Y signal induces astrocytes to release TNF-alpha, which provides autocrine regulation of MMP-9. 第 49 回日本神経化学会、2006 年 9 月 14-16 日
  9. Koizumi, S., Nasu-Tada, K., Tsuda, M., Kunifusa, E. and Inoue, K. Involvement of spinal fibronectin in upregulation of microglial P2X4, a key molecule for mechanical allodynia. 日本神経科学会 2006 年 7 月 19 日-21 日、京都
  10. 小泉修一、多田 薫、井上和秀、アストロサイトの P2Y 受容体抑制による MMP-9 産生と放出、2006 年 11 月 11 日、第 11 回グリア研究会、東京
  11. 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイト P2Y<sub>1</sub> 受容体を介した神経保護作用、2006 年 11 月 11 日、第 11 回グリア研究会、東京
  12. Koizumi, S., Nasu-Tada, K., Inoue, K. Synthesis and secretion of MMP-9 by inhibition of P2Y receptors in astrocytes. Society for Neuroscience Meeting, 2006 年 10 月 14 日-18 日、Atlanta, USA.
  13. Ohkubo, S. and Koizumi, S. Lipopolysaccharide alters P2Y receptor-mediated signaling in rat astrocytes via RGS-mediated mechanisms. Society for Neuroscience Meeting, 2006 年 10 月 14 日-18 日、Atlanta, USA.
  14. Koizumi, S., Shinozaki, Y., Nasu-Tada, K. and Inoue, K., Glial P2 receptors are attractive targets for drug discovery. (シンポジウム) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  15. Fujishita, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Upregulation by astrocytic ATP of M1 muscarinic acetylcholine receptor in hippocampal neurons. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  16. Nasu-Tada, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Release of matrix metalloproteinase-9 from pericytes via ATP/P2 receptor-mediated signals. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  17. Sueishi, K., Fujishita, K., Nasu-Tada, K., Takata, F., Kataoka, Y. and Koizumi, S. Release of matrix metalloproteinase-9 from pericytes via ATP/P2 receptor-mediated signals. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  18. Ohkubo, S., Koizumi, S. Enhancement of P2Y6 receptor-mediated signaling by lipopolysaccharide in rat hippocampal astrocytes. ) 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  19. Suto, K., Ohkubo, S., Honda, K. and Koizumi, S. Adenosine enhances fluoxetine-induced BDNF production in rat hippocampal astrocytes. 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  20. Tozaki-Saito, H., Tsuda, M., Koizumi, S. and Inoue, K. Retinoid signaling regulates microglial P2X4 receptor expression and development of allodynia. 第 80 回日本薬理学会年会、2007 年 3 月 14 日-16 日、名古屋
  21. Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Tonic and wide-ranging regulation of neurons by gliotransmitters. 第 84 回日本生理学会 (シンポジウム)、2007 年 3 月 20 日-22 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1.特許取得

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し