

20063702/B

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16年度～18年度 総合研究報告書

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16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 大野 泰雄

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	23

総合報告書

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

研究代表者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨 血液脳関門の異物排泄過程における薬物間相互作用予測システムの構築を目指して研究を行った。アストロサイト、周皮細胞及び血管内皮細胞から構成される、*in vitro* BBB 常態モデルの作成に成功し、これにより薬物の BBB 移行性を評価することが可能となった。また、脳虚血、発熱及び炎症等の病態時の BBB 機能を評価するモデルとして、*in vitro* BBB 病態モデルの作成にも成功した。また、このモデルシステムを使い、情報検索により明らかとなった免疫抑制剤シクロスポリン A が病態時の物質移行性を増大させ、BBB 機能障害を引き起こすことが明らかとなった。BBB 機能障害誘発の分子メカニズムの解析により、細胞傷害時に例外なく放出される ATP が、その特異的 P2 受容体を介して BBB 構成因子であるアストロサイト及び周皮細胞の機能を制御していることが明らかとなった。特に、ATP 受容体シグナルの変調により、アストロサイト及び血管周皮細胞からマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9) が放出され、これが BBB 破綻と強く関連している可能性が示唆された。一方、脳への物質移行性を制御するトランスポーターの解析も行った。BBB に発現する ABC トランスポーター、BCRP、MRP4 について、発現系を用いた *in vitro* 輸送実験、ならびにノックアウトマウスを用いた *in vivo* 解析を行った。BCRP は薬物の脳内移行性を制御するトランスポーターとして、BBB 機能の一翼を担っていることが明らかとなった。また、BCRP と P-gp は重複した基質選択性を有していた。MRP4 については、薬物輸送における重要性については未だ明らかとなっておらず、今後さらなる研究が必要である。

A. 研究目的

非ステロイド性解熱鎮痛薬、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、血液脳関門 (BBB) により脳内移行が制限されているにも係わらず、中枢性有害作用が発現することから医薬品の 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、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計画した。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、密着結合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。

本研究は 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を調査すること、2) BBB 構成細胞を *in vitro* で組み合わせた *in vitro* BBB 状態モデル及び、病態時を意識した *in vitro* BBB 病態モデルを作成し、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すること、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周皮細胞及びアストロサイトに注目して解析し、その障害の分子メカニズムを明らかにすること、4) 各種 *in vivo* 病態モデルを作成し、3) で明らかにした分子群と BBB 機能破綻の関連性を明らかにすること、5) ABC トランスポータを介した 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、を達成目標として行う。

B. 研究方法

1) 副作用情報の収集・解析

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）、厚生労働省報道発表（医薬局安全対策課）資料、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。

2) 新規 *in vitro* BBB モデルの開発

①BBB モデルの作成：ラットより脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞およびアストロサイトを既報に従い単離した。モデルの作成は、Transwell®システムを用い、脳血管内皮細胞をメンブラン上に播種し、内皮細胞のみの単層培養系および任意の細胞2種あるいは3種からなる共培養系 BBB モデルを構築した。共培養系ではメンブランを介した脳血管内皮細胞との接着あるいは非接着モデルを作製し、合計7種類モデルのBBB機能を比較検討した。

②密着結合性の評価：脳血管内皮細胞の密着結合性は、経内皮電気抵抗（TEER）を指標に機能を評価し、ウエスタンブロットおよび免疫染色法により密着結合構成タンパク質（Occludin、Claudin、Zo-1）の発現量を比較した。

③輸送タンパク質の評価：輸送タンパク質はウエスタンブロット法および免疫染色法により発現量を比較した。

3) 発熱・炎症 *in vitro* BBB モデルの構築

①発熱-BBB モデル：脳血管内皮細胞単層培養系を用いて、高温培養条件（38-41℃）を負荷し、6時間培養後にBBB機能を評価した。

②炎症-BBB モデル：脳血管内皮細胞単層培養系およびマイクログリア共培養系を用い、任意の濃度のLPSを6時間処理した後、BBB機能を評価した。

②BBB透過性評価：

各モデルのBBB機能評価は、sodium fluorescein（Na-F）およびEvans-blue albumin（EBA）の透過性を指標とした。それぞれの試薬をTranswell®の血管側に添加後、一定時間毎に脳実質側の濃度を測定し、透過係数を算出した。

4) BBB機能障害の分子メカニズム解析

周皮細胞及びアストロサイトの培養は既報に従った。周皮細胞及びアストロサイトはそれぞれ、抗 α smooth muscle actin (aSMA)及び抗GFPA抗体でそれぞれ確認した。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。MMP9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MMP9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。インフルエンザ脳症マウスの作成：マウス（4-5週齢）の鼻腔に脳特異的インフルエンザウイルス（brain-adapted influenza A virus, H7N3）を感染させ、経時的にその脳内組織像を観察した。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。

4) 脳内薬物移行性に対するトランスポーターの役割に関する研究

①マウス *in situ* 脳灌流法：既報の *in situ* 脳灌流法を用い、BCRP阻害剤であるGF120918（10mg/kg、iv）による効果を検討した。BCRPおよびMRP4欠損マウスを用いて、野生型マウスについて、脳移行性の比較を行った。

②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。

③MDCK 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。基底膜側から頂側膜方向への経細胞輸送と反対方向への輸送の比をとり、トランスポーターの輸送活性を反映したパラメータとした。

C. 研究結果

1) 副作用情報の収集・解析

中枢神経系用剤以外で中枢神経系副作用を起こすものにはシクロスポリンやタクロリムスのような免疫抑制剤による振戦、痙攣、頭痛、意識障害、脳症、幻覚、副腎皮質ホルモンによる多幸感、気分高揚、躁鬱、けいれん、脳症状、NSAIDによる頭痛めまい、錯乱、睡眠障害、フェニルプロパノールアミンやフェントラミンによる脳出血、クモ膜下出血、クラリスロマイシン(マクロライド系)のような抗生物質によるけいれん、振戦、頭痛が知られている。以下に、今回調査した結果を示す。

①インフルエンザ脳症とNSAID

解熱鎮痛薬による中枢性副作用としてライ症候群 (Reye's Syndrome) が疑われている。これは1963年にオーストラリアの病理学者 Reyeら (Reye, Morgan and Baral) が原因不明の小児急性脳症として『Lancet』に報告したものであるが、1980年に米国での疫学調査により、ライ症候群にサリチル酸製剤(アスピリン等)の関与が指摘された。更に、1982年米国保健省長官が『アスピリン系の解熱剤を水痘やインフルエンザに使用するとライ症候群になりやすい』との警告文を公表し、1982年には米国小児科学会に『水痘の小児及びインフルエンザが疑われる小児には、通常アスピリンを処方すべきでない』との勧告文が掲載された。

わが国では、1982年に厚生省調査『Reye症候群に関する調査研究』が開始され、1990年には『重篤な後遺症をもたらす原因不明の急

性脳症と薬剤との関係に関する調査研究』がなされたが、ライ症候群とサリチル酸製剤の明確な関連性は立証できなかったが、1998年に厚生省は『サリチル酸製剤について、15歳未満の水痘、インフルエンザ患者に対する投与を原則禁忌』と通告し、1999年には厚生省科学研究『インフルエンザ脳炎・脳症の臨床疫学的研究班』(森島班)がサリチル酸製剤以外の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)とインフルエンザ脳炎・脳症との関連性を研究。作用の強いNSAIDs(ジクロフェナク・メフェナム酸)使用症例で死亡率が高かったが、重症患者ほど強力なNSAIDsを使用したことに起因する可能性も否定できないと報告した。2000年の森島班の継続研究で、ジクロフェナク使用群は他のNSAIDs使用群より高い有意性をもって死亡率が高いことが示された。また脳の病理学的検査により、脳血管に損傷が生じていることが特徴的に見出された。そこで、厚生省は『(明確な因果関係は認められないものの)インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクの投与を禁忌』と通告した。また、2001年には医薬品等安全対策部会は『小児のインフルエンザに伴う発熱に対し、メフェナム酸製剤の投与は基本的には行わないこと』との合意事項を発表した。

インフルエンザ脳症の発症機構は不明だが以下の可能性が示唆されている。

- 1) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、中枢神経系に進入して、脳症を起こす。
- 2) インフルエンザウイルスが、ウイルス血症を介して、血管内皮細胞に感染し、サイトカインが産生され、脳血管を障害し、脳症となる。
- 3) インフルエンザの全身症状(高熱、頭痛、四肢痛、倦怠感)は、呼吸器細胞や白血球、リンパ球から産生されるサイトカインによって生じると言われている。インフルエンザウイルス感染により、サイトカインが異常に強

く産生され脳症を起こす。

4) ジクロフェナクは血管内皮の修復に関与する酵素を抑制する作用が強い。NSAIDsが脳症誘発・重症化に関与する機序の一つかもしれない。

②アマンタジン

パーキンソン症候群治療薬である塩酸アマンタジンにも精神症状(幻覚、妄想、せん妄、錯乱等)(発現頻度不明)痙攣、意識障害(昏睡を含む)などの中枢性副作用が報告されている。今のところ、BBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

③フェニルプロパノールアミン

フェニルプロパノールアミンは鼻水、鼻づまりの症状緩和に使用されているが、2000年に米国での大規模な疫学調査により、女性が食欲抑制剤として用いた場合に、その服用と出血性脳卒中の関連性が有意に高い結果が得られた。米国食品医薬局は、PPAを含む医薬品の自主的販売中止を要請した。これを受けて、同年、厚労省は心臓病の人及び脳出血の既往がある人等は使用しないように注意喚起し、適正使用を徹底させた。この措置の後、一般医薬品で5例、医療用医薬品で2例の脳出血等の副作用報告がなされた。これらは適切な用量・用法の範囲を超えたことに起因していると考えられた。しかし、厚労省は関係企業、関連団体に、PPAを含む医薬品からプソイドエフェドリン(PES)を含有する医薬品に可及的速やかに切り替えを行うように指示した。PPAの中枢性副作用は脳出血、悪心、頭痛で発現頻度は少ない。副作用症例としては、女性(20代)が鼻炎症状のためPPA服用(通常の3倍量服用)したところ、服用30分後に、頭痛、意識障害を起こし、血圧が通常の100/mmHg~160mm/Hgへと上昇した。CTによる出血は確認されず、中止1日後、痙攣発作を起こし、MRI検査によりくも膜下出血が確認され、中止

26日後に退院した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

④抗生物質

マクロライド系抗生物質であるクラリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されているが、希に、中枢性副作用として間代性痙攣が現れる。症例としては、上気道炎のため服用した60代男性が服用8日目で間代性痙攣(両肩を上下させる運動、回/0.2~0.3秒)を起こした。患者は10ヶ月前にもマクロライド系抗生物質で同様の間代性痙攣を起こしていた。なお、投与中止後2~5日後に症状が回復した。

なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

ケトライド系抗生物質であるテリスロマイシンは主としてグラム陽性菌、マイコプラズマ等感染症に使用されている。特に他の抗生物質が効きにくい耐性肺炎球菌にも効果とされている。希に中枢性副作用として意識消失(2004.12.28現在、累計15例)が現れる。

副作用症例としては、歯根膜感染のためジクロフェナクと併用で服用した50代男性が服用約3時間後、車運転中に意識消失した。突発性で前駆症状は無かった。

また、急性咽喉頭炎のために服用した70代男性(アレルギー体質有り)に投与4時間後、意識消失発作が現れた。同日の内に回復したが、次の日、本剤服用約4時間後、再度意識消失した。頭部精査するも異常はなし。同日回復した。なお、本薬の副作用とBBB及び脳血管系への作用との因果関係は不明である。

⑤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)

⑥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)の中樞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)

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樞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。

⑦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)。

2) 新規 in vitro BBB モデルの開発

トランスウェル・メンブランに播種・培養した毛細血管内皮細胞由来細胞株(qM BEC 4)に、周皮細胞、アストロサイトを重層化した in vitro BBB モデルを作成した。BBB 透過性の変化は、sodium fluorescein (Na-F) を用いその密着結合性を、細胞内 rhodamine 123 濃度を指標として、P-糖蛋白のトランスポーター機能を評価した。再現性よく BBB 機能評価を行うことができる in vitro BBB 常態モデルが作成できた。

3) In vitro BBB 病態モデル

① In vitro BBB モデルに hypoxia (4 hr) /reoxygenation (1 hr) 負荷を行うことにより虚血性 in vitro BBB 病態モデルを作成した。再構成1および7日後では細胞数および Na-F と Evans blue albumin (EBA) 透過係数についてはコントロール群のそれらと有意な差は認められなかった。しかし rhodamine 123 細胞内取り込み量はコントロール群と比較して有意に増加し、P-gp 蛋白量は減少していた。虚血性 in vitro BBB 病態モデルにおける免疫抑制剤シクロスポリン A (CsA) の作用を検討した。Hypoxia 負荷、再構成7日目において、CsA は、病態モデルの Na-F の透過性を上昇させ、rhodamine 123 細胞内取り込み量を顕著に増加させた。

② 高温度を負荷することにより発熱性 in vitro BBB モデルを、またミクログリアを混在させ LPS 刺激を行うことにより炎症性 in vitro BBB モデルを作成した。高温度負荷(38-41℃)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、ミクログリア共培養系では、LPS 濃度 (10, 100 ng/mL) 依存的に Na-F 及び EBA 透過係数が増加し、BBB 機能破綻が生じていることが明らかとなった。

4) BBB 機能障害の分子メカニズム解析

①インフルエンザ脳症マウス：マウスをインフルエンザウィルスに感染させると、体重減少が生じ、1週間後には対照群の約60%程度にまで達した。感染後2週間目までに、ほぼすべてのマウスは死亡した。感染後3日目から脳組織に顕著な毛細血管の肥大が観察され、そのような血管周囲ではアストロサイトの肥厚及び周皮細胞の消失が観察された。神経細胞そのものの病理像は観察されなかった。

②周皮細胞-アストロサイトのコミュニケーション：培養周皮細胞はを各種 ATP アナログで刺激すると、顕著な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察され、薬理的解析により $P2Y_2$ 受容体が責任受容体であることが明らかとなった。毛細血管はアストロサイトの endfeet により囲まれていること、アストロサイトが細胞外 ATP のソースとしてよく知られていること、また傷害時には大量の ATP を放出することが知られていることから、アストロサイト-周皮細胞共培養系を用い、アストロサイトの刺激及びアストロサイトの傷害が周皮細胞にシグナルを送るか否かを検討した。アストロサイトの刺激・傷害により ATP が放出され、これは周皮細胞の $P2Y_2$ 受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。これにより $P2Y_2$ 受容体依存的に(1)細胞の収縮(剥離)、(2)bleb形成(アポトーシス)、及び(3)MMP9産生が引き起こされた。

③アストロサイトの MMP-9 産生

アストロサイト及び周皮細胞が 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 はアストロサイト及び周皮細胞(特に前者で)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- α の産生とリンクしていた。つまり、ATP はアストロサイト及び周皮細胞における MMP-9 産生を恒常的に抑制していることが明らかとなった。

④In 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 Evans blue albumin (EBA) 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。

5) 各種トランスポーターによる脳内薬物移行性の制御

①GF120918 処理群では、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、ならびに抗癌剤 mitoxantrone の脳移行性は増加した。しかし、BCRP 欠損マウスにおいても、この GF120918 処理による効果は観察された。更に、BCRP 欠損マウスと野生型マウスで、脳内移行性を比較した場合に、BCRP 欠損による脳内移行性の増加は観察されなかった。mitoxantrone については、P-gp/Mdr1a 欠損マウスにおいて、脳内濃度が増加していることから、GF120918 の効果は一部 P-gp の阻害であることが示唆されている。

②定常状態での脳内薬物濃度の比較により、PhIP (2.8)、N-OH PhIP (1.8)、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)。しかし、pitavastatin とニューキノロン系抗生物質については、脳内濃度の増加は観察されなかった。

③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。PhIP については有意な差は観察されなかった。

④ 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。

⑤ 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。

⑥ Mrp4 欠損マウスを用いて同様の実験をおこなったところ、Mrp4 欠損マウスでは、DHEAS の脳内移行性が野生型マウスに比べて 1.6 倍に増加した。しかし、GF120918 の効果は、依然として Mrp4 欠損マウスにおいても観察された。

D. 考察

今回示した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因果関係は不明なところが多い。これは BBB 破綻を詳細に調べることで適切な *in vitro* 試験系が無かったことによるものである。BBB は脳毛細血管内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトの 3 種類の細胞が互いに協調することで機能を維持することから、我々の研究班で用いている血液脳関門再構成

系 *in vitro* BBB 常態モデルや特異的トランスポーター発現 BBB モデルを用いた検討、また、*in vivo* モデルによる、今後の研究が待たれる。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。

虚血性 *in vitro* BBB 病態モデルにおいて、CsA が非常に特徴的な BBB の破綻を引き起こした。つまり虚血傷害後の再構築により BBB 機能は見かけ上修復され Na-F 透過性はコントロール群のそれとほぼ等しいレベルに回復する。しかし CsA を加えると、BBB 機能が格段に傷害される。P-gp 機能は hypoxia の負荷のみで低下したが、これも CsA により増悪された。虚血傷害後に再構成された BBB では CsA 透過性が亢進することが考えられる。

NSAIDs はインフルエンザ等の感染症により誘発された発熱下で使用される。また、炎症も併発する。そこで、発熱病態下での NSAIDs の作用を検討するため、発熱性 *in vitro* BBB 病態もでの及び炎症性 *in vitro* BBB 病態モデル作製に着手した。高温環境を負荷すると BBB 透過性は温度依存的に亢進した。また同様にミクログリア共培養 BBB モデルにおいて、LPS 刺激は透過性亢進作用を示した。LPS 刺激により産生される炎症性サイトカイン類は BBB 機能を低下させることが知られている。これらのモデルは、インフルエンザ等の発熱・炎症性疾患時の BBB モデルとして薬物の病態依存的な脳移行性の評価に使用できる。これらの病態モデル系を用いて各種薬物の作用を評価することにより、医薬品による中枢性有害作用の回避対策に関して、BBB の病態生理を踏まえた試案を築くことが可能となることが期待される。

BBB 破綻の分子メカニズムを探った。インフルエンザ脳症モデルマウスでは、最も顕著に認められる病理像が毛細血管の極端な肥大で

あった。このとき、アストロサイトは反応性になり、周皮細胞は消失していた。つまり、脳症の初期に先ず、毛細血管を構築するこれらの細胞群の機能変化・低下が惹起され、脳症・脳炎の悪化に繋がっていくものと考えられた。そこで外傷、炎症及び虚血性傷害時に必ず漏出する ATP に注目し、ATP がアストロサイトに与える影響を検討した。周皮細胞は P2Y₂ 受容体を発現し、これにより、[Ca²⁺]_i 上昇が誘発され、収縮、bleb 形成、及び MMP9 産生を引き起こした。収縮に関しては、脳の微小循環の制御との関連性を示唆するが、一方では血管外腔からの剥離を誘発している可能性が考えられる。また、bleb の形成が観察されたが、これはアポトーシス時に認められる典型的な胞構造である。収縮後の bleb 形成は、ペリサイトの機能障害と強く関連しているものと考えられる。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。これにより、自身及び周辺の血管構築構造が破壊され、以って BBB の機能障害が誘発されている可能性が強く示唆された。

さらに、アストロサイト及び周皮細胞は ATP による恒常的な刺激を受容しており、これにより MMP-9 産生が抑制されていることも明らかとなった。つまり ATP を除去するとこの抑制系が外れて、MMP-9 の産生が誘発された（特にアストロサイト）。細胞外 ATP を介するシグナルのバランス崩壊が、MMP-9 産生に繋がり、それが細胞外マトリックスや、オクルディン、クラウディンといった密着結合蛋白の破壊を起こし、BBB 破綻を引き起こす可能性が示唆された。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 EBA 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たことより、血管の niche に存在する周皮細胞及びアストロサイトである可能性が高い。

各種トランスポーターの薬物移行性と BBB の機能関連研究により、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。ノックアウトとの効果は短時間での取り込みにはほとんど影響を与えず、定常状態など長時間での暴露により、その影響が見えてくることが明らかになった。

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、このような明確な正の相関関係は見られなかった。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。Mrp4 を欠損した場合には、DHEAS の脳内移行性が増加していることから、Mrp4 が血液脳関門において異物排泄に関与していることが示唆された。

B. 結論

In vitro BBB 常態モデル及び各種 in vitro BBB 病態モデルの作成により、医薬品の中枢性有害作用と BBB の関連性が明らかになることが期待される。また本モデルシステムは、中枢性有害作用の危険因子の探索とその回避対策に関する実験証拠を提供し得る。BBB 機能障害の分子メカニズムの解析では、BBB 構成成分のアストロサイト及び周皮細胞から MMP-9 産生が亢進することが、強く関連している可能性が示唆された。MMP-9 産生は、細胞傷害、炎症及び脳虚血時に必ず放出される ATP により制御されていた。

BBB における排出輸送系として、BCRP が異物排泄に働くことを明らかにした。MRP4 については、薬物輸送における重要性については未だ明らかとなっておらず、今後の研究が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y: Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production. *Brain Res.*, 1038: 208-215, 2005
- 2) Satoh K, Shirabe S, Eguchi K, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M, Nishida N, Katamine S: Toxicity of quinacrine can be reduced by co-administration of P-glycoprotein inhibitor in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Cell Mol Neurobiol.*, 24: 873-875, 2004
- 3) Yamauchi A, Dohgu S, Shuto H, Oishi R, Kataoka Y. *Cell. Mol. Neurobiol.* Tacrolimus-induced neurotoxicity and nephrotoxicity is ameliorated by the administration in the dark period in rats. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 24: 695-704, 2004
- 4) Dohgu S, Yamauchi A, Nakagawa S, Takata F, Kai M, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y: Nitric oxide mediates cyclosporine-induced impairment of the blood-brain barrier in coculture of mouse brain endothelial cells and rat astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 505: 51-59, 2004
- 5) Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Naito M, Tsuruo T, Higuchi S, Sawada Y, Kataoka Y: Transforming growth factor- β supports maintenance of the blood-brain barrier function. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24: 491-497, 2004
- 6) Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Sawada Y, Higuchi S, Naito M, Tsuruo T, Shirabe S, Niwa M, Kataoka Y: Uptake and efflux of quinacrine, a candidate for the treatment of prion diseases, at the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24: 205-217, 2004
- 7) Nakajima M, Yamada T, Kusuhara T, Furukawa H, Takahashi M, Yamauchi A, Kataoka Y: Results of Quinacrine Administration to Patients with Creutzfeldt-Jakob Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17: 158-163, 2004
- 8) Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, Kohsaka, S. and Inoue, K. (2004). Activation of p38MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to neuropathic pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*, 89, 89-95. 2004
- 9) Inoue, K., Tsuda, M. and Koizumi, S. (2004) ATP- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Chronic Pain and Microglia: Involvement of the ATP Receptor P2X(4). *J. Pharmacol. Sci.*, 94, 112-114. 2004
- 10) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. (2004) Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors. *Biochem. J.*, 380,

- 329-338. 2004
- 11) Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y., and Inoue, K. Cytoprotection against oxidative-stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. (2005) *Glia*, 49, 288-300.
 - 12) Lee YJ, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y.: Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 312 :44-52, 2005
 - 13) Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y.: Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 145 :4384-91, 2004.
 - 14) Kusuhara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 :1741-63, 2004
 - 15) 橋原洋之、竹内 健二、杉山 雄一 肝シヌソイド側における異物排泄トランスポーター(MRP4)の機能解析 薬理と治療
 - 17) Shuto H, Yamauchi A, Ikeda M, Sohda Y, Koga A, Tominaga K, Egawa T, Kataoka Y Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes *J. Pharmacol. Sci.*, 98, 323-326, (2005)
 - 18) Yamauchi A, Shuto H, Dohgu S, Nakano Y, Egawa T, Kataoka Y. Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 25(5), 923-928, (2005)
 - 19) Inoue, K., Denda, M., Tozaki, H., Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 756-763.
 - 20) Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., Koizumi, S., Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K. and Suzuki, T. (2005) Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 93, 1383-1392.
 - 21) Nasu-tada, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2005) The involvement of $\beta 1$ integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. *Glia*, 52, 98-107.
 - 22) Fujishita, K., Koizumi, S. and Inoue, K. (2006) Upregulation by retinoic acid of P2Y2 receptors in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signaling*, in press.
 - 23) Nasu-Tada, K. *, Koizumi, S.*, Tsuda, M.*, Kunifusa, E. and Inoue, K. (2006) Possible involvement of increase in spinal fibronectin following peripheral nerve injury in upregulation of microglial P2X₁, a key molecule for mechanical allodynia. *Glia*, in press. (*equal contribution)
 - 24) 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、印刷中

- 25) 小泉修一、藤下加代子、津田誠、井上和秀 (2006). G-蛋白共役型 ATP 受容体と痛み、Pain Clinic、印刷中
- 26) Kuroda M, Kusuhara H., Endou H, Sugiyama Y. Rapid elimination of cefaclor from the cerebrospinal fluid is mediated benzylpenicillin-sensitive mechanism distinct from organic anion transporter 3. J Pharmacol Exp Ther. 314:855-61, 2005.
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) Tozaki-Saito, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Retinoic acids increase P2X₂ receptor expression through the 5' -flanking region of P2rx2 gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. Mol. Pharmacol., 70(1):319-328.
- 35) Shinozaki, T., Koizumi, S., Ohno, T., Nagao, T. and Inoue, K. (2006) Activation of P2Y₁ receptors in astrocytes interferes the H₂O₂-evoked death promoting signaling cascades. Glia, 54(6):606-618.
- 36) 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 P2Y₆ receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis. Nature, in press.
- 37) 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.

- 38) 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.
- 39) 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.

学会発表等

- 1) Dohgu S, Takata F, Nakagawa S, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M.: The brain pericytes contribute to the up-regulation of the blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β (TGF- β) production. Potsdam, Germany, Sep., 2004
- 2) Koizumi, S., Miyatake, M., Tsuda, M. and Inoue, K. Tonic regulation of signaling cascades by spontaneously released ATP in astrocytes, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
- 3) Fujishita, K., Koizumi, S., Inoue, K. Skin-to-sensory neuron communication mediated by ATP and activation of P2Y2 receptors in NHEKs, Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
- 4) Shinozaki, Y., Koizumi, S. and Inoue, K. Cytoprotective action against oxidative stress by ATP/P2Y1 receptors-mediated pathways in astrocytes. Purines2004, 6-9 June, 2004, Chapel Hill, U.S.A.
- 5) 小泉修一、藤下加代子、井上和秀：ATPによる血管周皮細胞周皮細胞第10回アストロサイト連関、ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 6) 多田 薫、小泉修一、井上和秀、 β 1インテグリンを介するミクログリアの増殖・ケモタキシスとP2Y12受容体、第10回ATP・アデノシン研究会、8月26-27日、岡崎
- 7) 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀：ATPによるアストロサイトの酸化ストレスからの細胞保護作用：第10回ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 8) 藤下加代子、小泉修一、井上和秀：レチノイン酸による皮膚P2Y2受容体の発現制御：第10回ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 9) 重本-最上由香里、小泉修一、多田薫、津田誠、井上和秀：P2Y6受容体活性化によるミクログリア細胞のファゾサイトーシス脳の増大：第10回ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 10) 國房恵巳子、多田薫、小泉修一、津田誠、井上和秀：細胞外マトリックスとミクログリアのP2受容体、第10回ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 11) 津田誠、國房恵巳子、小泉修一、井上和秀：神経因性疼痛モデルにおけるグリア細胞の活性化様式、第10回ATP・アデノシン研究会、2004年8月26-27日、岡崎
- 12) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Neuro2004, 2004年、9月21-23日、大阪
- 13) Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y., Tsuda, M. and Inoue, K.: Ca^{2+} waves in keratinocytes

- are transmitted to sensory neurons; involvement of extracellular ATP and activation of P2Y2 receptors, Society for Neurosciences, 23-28, Oct., 2004, SanDiego, U. S. A.
- 14) 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀：ATPによるアストロサイトの酸化ストレス抵抗性の獲得、グリア研究会、2004年11月20日、福岡
- 15) 戸崎秀俊、小泉修一、井上和秀：核内受容体の介した初代培養ミクログリアのP2X4受容体発現増強：第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
- 16) 藤下加代子、小泉修一、井上和秀：レチノイン酸による皮膚P2受容体の発現制御、第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
- 17) 小泉修一、篠崎陽一、井上和秀：アストロサイトはP2Y1受容体を介して酸化ストレス耐性を獲得する：第29回クロマフィン研究会、2004年11月27-28日、軽井沢
- 18) Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. P2Y1 receptor-mediated Ca²⁺ wave propagation in the hippocampus. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 19) Fujishita, F., Koizumi, S. and Inoue, K. Pericyte-to-astrocyte communication via extracellular ATP. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 20) Shinozaki, S., Koizumi, S. and Inoue, K. Mechanisms underlying protection of astrocytes by extracellular ATP via P2Y₁ receptors. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 21) Tozaki, H., Koizumi, S., Sato, Y., Tsuda, M. and Inoue, K. Retinoic acid upregulates P2X4 receptor expression in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 22) Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tada, K., Tsuda, M. and Inoue, K. The physiological function of P2Y6 receptor in rat microglial cells. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 23) Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. The involvement of β1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: P2Y12/13 receptor has opposite roles. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 24) Kunifusa, E., Tsuda, M., Hasegawa, S., Tada-Nasu, K., Koizumi, S. and Inoue, K. Up-regulation by fibronectin of P2X4 receptors in microglia. 第78回日本薬理学会、2005年3月22-24日、横浜
- 25) Takata F, Dohgu S, Sumi N, Yamauchi A, Shuto H, Kataoka Y. Dysfunction of the Blood-Brain Barrier with RAGE ligands. VI th Conference on Cerebral Vascular Biology, Munster, Germany, June, 2005
- 26) Koizumi, S. and Inoue, K. Dynamic astrocyte-to-neuron communication mediated by astrocytic ATP in hippocampal cultures. Euroglia Meeting, 17-21 May 2005, Amsterdam, Holland.
- 27) 小泉修一、大野泰雄、井上和秀、アストロサイトによるシナプス伝達制御（シンポジウム）、日本薬理学会関東部会、2005年6月18日、東京
- 28) Koizumi, S. Astrocytes function as an

- interface of neurovascular system (Symposium), 26-28, July, Neuro2005, Tokyo
- 29) Koizumi, S., Fujishita, K. Inoue, K. Tsuda, M. and Inoue, K. ATP を介した表皮ケラチノサイト間情報連絡と痛み (シンポジウム)、第 27 回日本疼痛学会、7 月 26-27 日、宇都宮
- 30) Koizumi, S., Fujishita, K. and Inoue, K. Glia-to-vascular communication mediated by extracellular ATP (Symposium). 第 48 回日本神経化学会、28-30 Oct., Fukuoka
- 31) Koizumi, S., Tsuda, M. and Inoue, K. Mechanical allodynia induced by P2Y2 receptor activation. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov., 2005
- 32) Tsuda, M. Kunifusa, E., Nasu-Tada, K., Hasegawa S., Koizumi, S. and Inoue, K. Fibronectin increases expression of P2X₄ receptors in microglia. Society for Neuroscience, Washington DC., 12-16 Nov., 2005.
- 33) 小泉修一、藤下加代子、末石浩二、高田英友子、片岡泰文、ATP 受容体を介するアストロサイトーペリサイト系による毛細血管制御 (シンポジウム)、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 34) 津田誠、国房恵巳子、多田薫、小泉修一、井上和秀、フィブロネクチンはミクログリアにおける P2X₄ 受容体の発現を増強する、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 35) 藤下加代子、末石浩二、片岡泰文、井上和秀、小泉修一、血管周皮細胞ペリサイトに発現する P2 受容体の生理的役割、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 37) 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイトにおける P2Y₁ 受容体活性化を介した酸化ストレス誘導製細胞死シグナリングに対する拮抗作用、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 38) 多田薫、斉藤秀俊、井上和秀、小泉修一、アストロサイトの pinocytosis における P2Y₆ 受容体の関わり、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 39) 大久保聡子、多田薫、斉藤秀俊、小泉修二、ラットアストロサイトにおけるリポポリサッカライドによる P2 受容体の変化、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 38) 戸崎秀俊、津田誠、小泉修一、井上和秀、レチノイン酸による初代培養ミクログリアの P2X₄ 受容体発現増強、第 79 回日本薬理学会、2006 年 3 月 8-10 日、横浜
- 39) Koizumi, S., Fujishita, K. Sueishi, K., Kataoka, Y., Ohkubo, S. and Inoue, K. Intimate interaction mediated by P2Y₂ receptors between astrocytes and pericytes. 8th ISAAN, 2006 年 5 月 24 日-28 日、Ferrara, Italy.
- 40) Fujishita, K., Inoue, K. and Koizumi, S. Upregulation of P2Y₂ receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. 8th ISAAN, 2006 年 5 月 24 日-28 日、Ferrara, Italy.
- 41) 小泉修一、後根神経節細胞の P2Y₂ 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
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 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
- 48) 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
- 49) 篠崎陽一、小泉修一、井上和秀、アストロサイト P2Y₁ 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
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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
- 53) 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
- 54) 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
- 55) 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
- 56) 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
- 57) 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
- 58) 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
- 59) 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
- 60) 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

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
Tsuda M, Mizokoshi, A, Shigemoto-Mogami, Y Koizumi, S, Kohsaka S, and Inoue K	Activation of p38 MAPK in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury	Glia	89	89-95	2004
Inoue K, Tsuda M, and Koizumi S	ATP and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: Chronic Pain and Microglia: Involvement of the ATP Receptor P2X (4)	J. Pharmacol. Sci	94	112-114	2004
Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, Shigemoto-Mogami Y Tuda M and Inoue K	Ca ²⁺ waves in Keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 Receptor activation	Biochem. J	380	329-338	2004
Shinozaki Y Koizumi S Ishida S, Sawada J Ohno Y, and Inoue K	Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y 1 receptors	Glia	49	288-300	2005
Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Niwa M, Kataoka Y	Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production.	Brain Res.	1038	208-215	2005