

# アストロサイトによる脳血管内皮細胞特異形質の誘導とその機構

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9203">http://hdl.handle.net/2297/9203</a>

## アストロサイトによる脳血管内皮細胞特異形質の誘導とその機構

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

林 康 彦

血管内皮細胞には臓器、組織により機能、および構造上の多様性が存在する。中でも特に、脳毛細血管内皮細胞は血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) で知られる特異形質を示す。従来、BBB の形成と維持には、中枢神経系で脳毛細血管周囲を取り囲んで存在するアストロサイトが関わっているとの仮説が提唱されてきているが、未だ立証されるに至っていない。その最大の理由は、血管内皮細胞へのアストロサイトの作用を検証するための適切な試験管内モデル (in vitro model) が欠如していたためである。本研究で筆者は、ラット胎児脳より初代培養した I 型アストロサイトと非脳型血管内皮細胞であるヒト臍静脈内皮細胞を用いた共存培養系を確立した。すなわち、直径が 3.0 $\mu$ m の孔を有する膜の片面にアストロサイトを、さらに他面に内皮細胞を播種後共存培養し、種々の脳血管内皮細胞特異形質を指標としてアストロサイトの内皮細胞形質転換能を試験管内で直接解析しようとする実験系である。アストロサイトは実際、膜孔内に足突起を伸長させ、この足突起を介して、内皮細胞と接触することが電子顕微鏡で確認された。筆者は、臍静脈内皮細胞を脳アストロサイトと共存培養すると、代表的な脳血管内皮細胞特異形質の一つであるガンマグルトミルトランスベプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase,  $\gamma$ -GTP) 活性が、アストロサイトとの接触時間ならびに足突起を通過させる孔の密度に依存して上昇していることを見出した。また、この  $\gamma$ -GTP の誘導は、内皮細胞層をアストロサイト層から離して培養した場合やフィーダー層を COS-7 細胞に代替した場合には認められなかった。アストロサイトから調製した細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) は内皮細胞  $\gamma$ -GTP を部分的に誘導した。アストロサイトによる  $\gamma$ -GTP 活性の増大は当該酵素蛋白をコードする mRNA レベルの増大によることが逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法で明らかにされた。また、アストロサイトと接触培養した内皮細胞では、トランスフェリンレセプター (transferrin receptor), P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), I 型グルコーストランスポーター (glucose transporter-1, GLUT-1) といった血液脳関門関連遺伝子群の発現も著しく増大していた。さらに、アストロサイトとの接触により内皮細胞間に有意に結合装置 (junctional device) が形成され、細胞内のミトコンドリア (mitochondria) の数が増加することも電子顕微鏡で観察された。さらに拡散チャンパーを用いた物質移送アッセイで、内皮細胞がアストロサイトとの接触培養によりイヌリン (inulin) に対する障壁能 (barrier activity) を獲得することが見出され、この障壁能には生理的極性も保持されていた。したがって、本研究により、アストロサイトは細胞間の接触を介して非脳型血管内皮細胞を脳型へと誘導するトランス分化能 (trans-differentiation) を有し、血液脳関門を含む脳血管内皮細胞特異形質の誘導、維持に関わっていることが明らかにされた。

**Key words** astrocyte, endothelial cell, co-culture, blood-brain barrier, trans-differentiation

血管内皮細胞は機能および構造上の多様性を有し、臓器および組織により様々な特性を示す。特に脳毛細血管内皮細胞は血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) で知られる特異形質を有し、特殊環境である脳の恒常性 (homeostasis) 維持に重要な役割をはたしていると考えられる<sup>1)~7)</sup>。主な脳血管内皮細胞特異形質としては以下のものが挙げられる。1) 脳血管内皮細胞は完全に連続した基底膜 (basement membrane) を有しており、有窓形成 (fenestration) が見られない。また、内皮細胞間隙には閉鎖帯 (tight junction) が存在する<sup>8)~9)</sup>。2) 物質輸送に関係する飲み込み小胞 (pinocytotic vesicle) は正常状態ではきわめて少なく、蛋白などの透過性を制御している<sup>10)</sup>。3) ガンマグ

ルトミルトランスベプチダーゼ ( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase,  $\gamma$ -GTP)<sup>9)10)~14)</sup>、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP)<sup>15)16)</sup> など多種の酵素を多量に含んでいる。

4) 脳血管内皮細胞を通過する脳への物質輸送は単純拡散 (passive diffusion) よりも能動輸送 (active transport) によるものが大部分で、脳における必須の栄養素には各々固有の輸送担体 (transporter) が存在している<sup>15)16)</sup>。5) 細胞当りのミトコンドリア数は他臓器の血管内皮細胞に比べて約 3~5 倍多い。これは脳血管内皮細胞における ATP 要求性と代謝活性の高さを示している<sup>17)</sup>。これらの脳血管内皮細胞特異形質は中枢神経系の発生に伴って獲得され、出生時には十分に機能しているといわ

平成 7 年 12 月 15 日受付, 平成 8 年 2 月 8 日受理

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; BBB, blood-brain barrier; bp, base pair (s); BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; ECGS, endothelial cell growth supplement; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum;  $\gamma$ -GTP, gamma-glutamyltranspeptidase; GFAP, glial fibrillary

れている<sup>18)~20)</sup>。

脳毛細血管は、内皮細胞 (endothelial cell), アストロサイト (astrocyte), 周皮細胞 (pericyte), ニューロン (neuron), 基底膜から構成される<sup>21)</sup>。なかでも、アストロサイトは足突起 (foot processes) を内皮細胞に向かって伸ばし、この足突起末端は布状に広がって毛細血管周囲を覆うとともに内皮細胞の基底膜と強固に付着する。このような解剖学的な関係からアストロサイトより出されたシグナルもしくは液性因子により脳血管内皮細胞特異形質が誘導されているのではないかと従来推測されてきた<sup>22)~27) (11) (3) (16)</sup>。しかしながら、この概念は想定されるアストロサイトの役割を検証するための適当な試験管内モデル (in vitro model) がないことから、未だ証明をみるに至っていない。

本研究では、アストロサイトの血管内皮細胞への作用を直接試験管内で解析することを目的として、ラット胎児脳より初代培養した I 型アストロサイトと非脳型血管内皮であるヒト臍静脈内皮細胞の共存培養系を確立し、前者が後者に脳血管内皮細胞特異形質を誘導しうるかどうかを  $\gamma$ -GTP<sup>23) (10)~(14)</sup>, トランスフェリンレセプター (transferrin receptor)<sup>22)</sup>, P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)<sup>23)</sup>, I 型グルコーストランスポーター (glucose transporter-1, GLUT-1)<sup>24) (25)</sup> といった BBB 関連遺伝子や閉鎖帯形成を含む超微構造<sup>26)~28)</sup>, さらにイヌリンに対する障壁活性を指標<sup>18)</sup> に検討した。この結果、アストロサイトは内皮細胞との接触を介してこれらすべての BBB 機能を誘導しうるが見い出された。

## 材料および方法

### I. 細胞

#### 1. 血管内皮細胞

血管内皮細胞はヒト臍静脈より既述の方法により初代培養した<sup>29)</sup>。細胞は15%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA), 100U/ml ペニシリン

(和光純薬, 大阪), 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (和光純薬), 75 $\mu$ g/ml 内皮細胞増殖用添加物 (endothelial cell growth supplement, ECGS) (Collaborative Research, Bedford, USA), 25 $\mu$ g/ml ヘパリン (sigma, St. Louis, USA) を含む RPMI 1640 培地 (Gibco, Gland Island, USA) と 199 培地 (medium 199 containing Hank's salt, medium 199) (Gibco) を等量混合した培地にて維持し、実験には 8~14 継代目の細胞を用いた。95% 以上の細胞がアセチル化低密度リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 取り込み能を有し、血管内皮細胞と同定された (図 1-A, B)。

#### 2. アストロサイト

胎生 16~18 日目の Sprague-Dawley 系ラット胎児脳より既述の方法にてアストロサイトを初代培養した<sup>27)</sup>。培養化した細胞は 20% FBS, 100U/ml ペニシリン, 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むハム F-10 培地 (Ham's F-10 medium) (日本製薬, 東京) にて 2 日間静置培養した後、16% FBS, 100U/ml ペニシリン, 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むハム F-10 培地に交換して約 1 週間維持し、実験に用いた。95% 以上の細胞が、グリア線維酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 陽性で、A2B5 陰性であることから I 型アストロサイトと同定された (図 1-C)。

#### 3. COS-7 細胞

アフリカミドリザルの腎臓上皮由来細胞株である COS-7 細胞<sup>28)</sup> を 10% FBS, 100U/ml ペニシリン, 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (日本製薬) にて維持した。当細胞株は理化学研究所細胞銀行から分与された。

#### II. 共存培養系の作製

初代培養ラット胎児脳アストロサイトとヒト臍静脈内皮細胞を用い、図 2 に示す 2 種類の共存培養系を作製した。すなわち、一つの系では図 2-A の如く、孔径が 3.0 $\mu$ m のセルカル

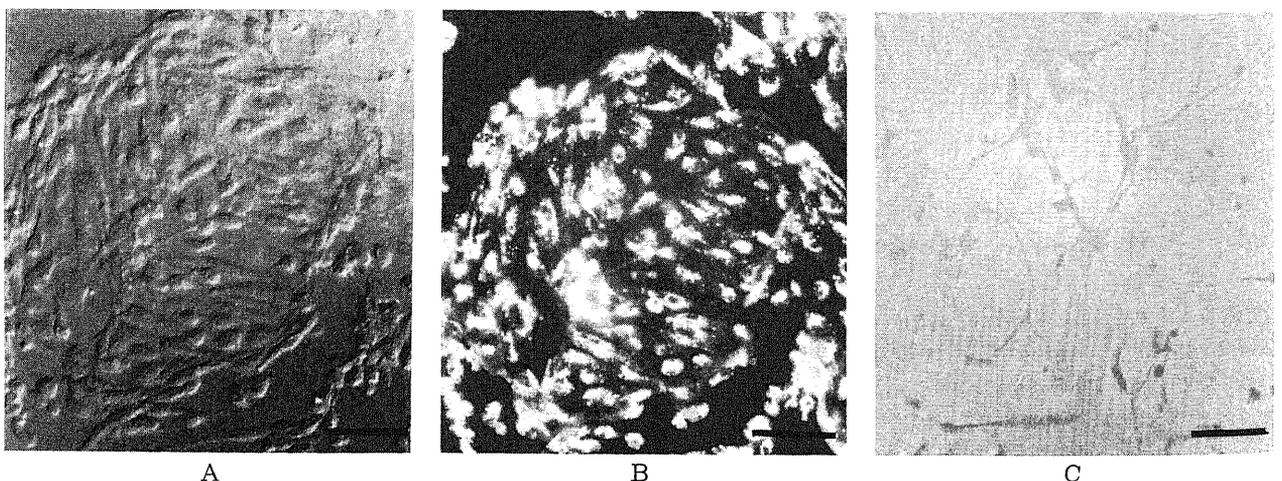


Fig. 1. Human umbilical vein endothelial cells and rat fetal cerebral astrocytes in culture. (A) Phase contrast micrograph of human umbilical vein endothelial cells. (B) Staining of endothelial cells in the same field with acetylated LDL labelled with 1, 1'-dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate. (C) Staining of rat fetal cerebral astrocytes with a monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein. Bars, 50  $\mu$ m.

acidic protein; GLUT-1, glucose transporter-1; HBSS, Hank's balanced salt solution; LDL, low density lipoprotein; PBS, phosphate-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SSPE, saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid

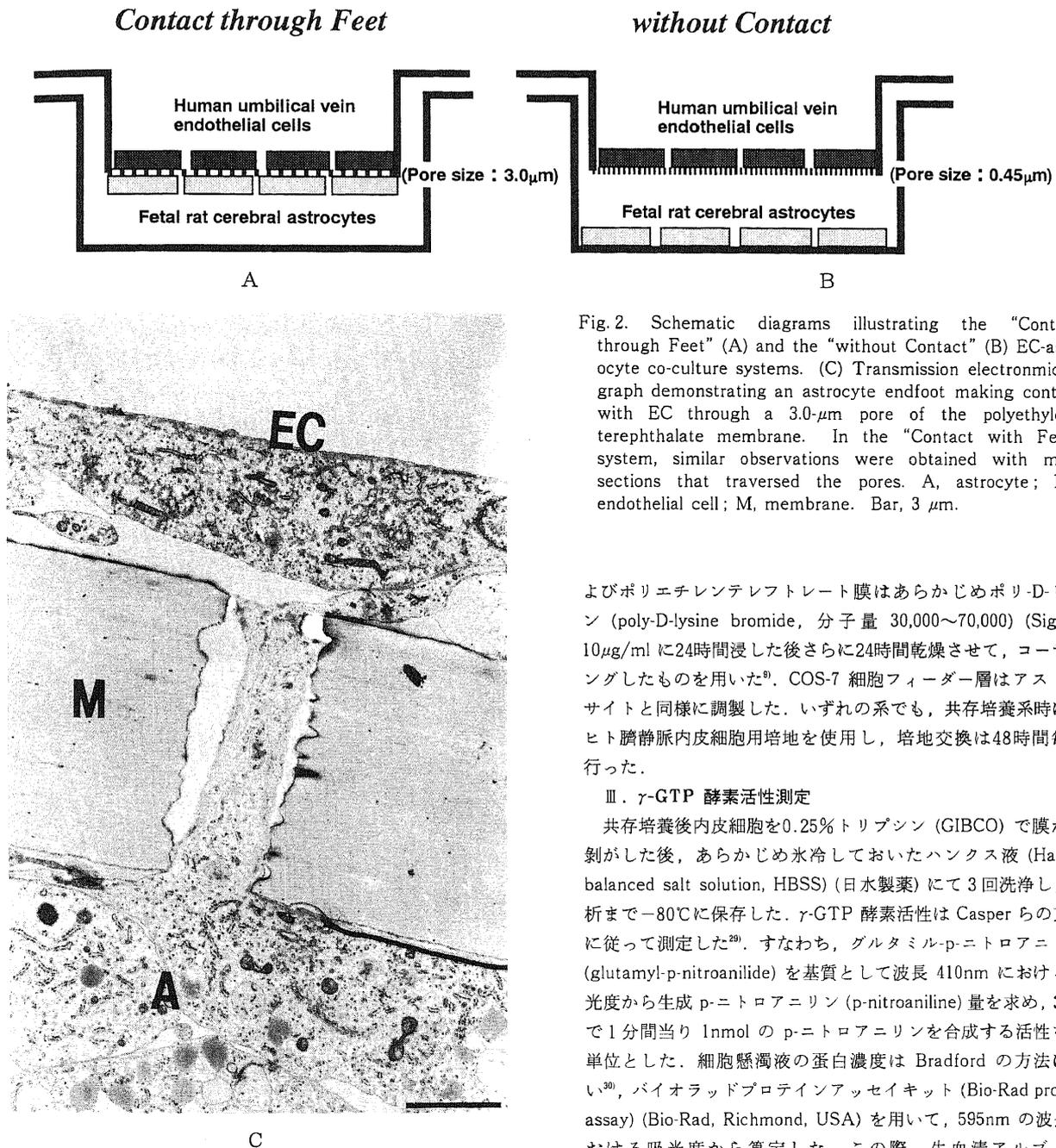


Fig. 2. Schematic diagrams illustrating the "Contact through Feet" (A) and the "without Contact" (B) EC-astrocyte co-culture systems. (C) Transmission electronmicrograph demonstrating an astrocyte endfoot making contact with EC through a 3.0- $\mu$ m pore of the polyethylene terephthalate membrane. In the "Contact with Feet" system, similar observations were obtained with most sections that traversed the pores. A, astrocyte; EC, endothelial cell; M, membrane. Bar, 3  $\mu$ m.

よびポリエチレンテレフタレート膜はあらかじめポリ-D-リジン (poly-D-lysine bromide, 分子量 30,000~70,000) (Sigma) 10 $\mu$ g/ml に24時間浸した後さらに24時間乾燥させて、コーティングしたものを用いた<sup>9)</sup>. COS-7 細胞フィーダー層はアストロサイトと同様に調製した. いずれの系でも, 共存培養時にはヒト臍静脈内皮細胞用培地を使用し, 培地交換は48時間毎に行った.

### Ⅲ. $\gamma$ -GTP 酵素活性測定

共存培養後内皮細胞を0.25%トリプシン (GIBCO) で膜から剥がした後, あらかじめ氷冷しておいたハンクス液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) (日本製薬) にて3回洗浄し, 分析まで-80 $^{\circ}$ Cに保存した.  $\gamma$ -GTP 酵素活性は Casper らの方法に従って測定した<sup>29)</sup>. すなわち, グルタミル-p-ニトロアニリド (glutamyl-p-nitroanilide) を基質として波長 410nm における吸光度から生成 p-ニトロアニリン (p-nitroaniline) 量を求め, 37 $^{\circ}$ C で1分間当り 1nmol の p-ニトロアニリンを合成する活性を1単位とした. 細胞懸濁液の蛋白濃度は Bradford の方法に従い<sup>30)</sup>, バイオラッドプロテインアッセイキット (Bio-Rad protein assay) (Bio-Rad, Richmond, USA) を用いて, 595nm の波長における吸光度から算定した. この際, 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を標準とした.

### Ⅳ. 細胞外基質, および調節培地の調製

Schor らの方法により<sup>31)32)</sup>, アストロサイト由来の細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) を調製した. 初代培養ラット胎児脳アストロサイトをあらかじめポリ-D-リジンにてコートしたフラスコ (Falcon, 3110) (Becton Dickinson) にてコンフルエントとなるまで培養後, 10mM リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) にて洗浄し, 0.02N 水酸化アンモニウム (和光純薬) を加えて室温で約10分間のインキュベーションを行った. 溶解または浮遊した細胞をピペッティングにて除去した後, PBS にて2回洗浄し, フラスコ底に残存した物質をアストロサイト由来 ECM として用いた. また, 対照として用いた COS-7 の ECM も同様に調製した. これらの ECM 上に内皮細胞を播き, コンフルエントとなるまで培養後,

チャーインサート (cell culture insert, Falcon, 3091) (Becton Dickinson, Lincoln Park, USA) のポリエチレンテレフタレート膜の片方の面にアストロサイトを  $4 \times 10^5$  個播いて接着させた後, ヒト臍静脈内皮細胞を別面に  $2 \times 10^5$  個播いて共存培養を行った. この系では, アストロサイトの足突起が 3.0 $\mu$ m の孔を通過して内皮細胞と直接の接触をもつことが期待される. 実際, 足突起を介する両細胞種の接触が電子顕微鏡による観察で確認された (図 2-C). もう一つの系では  $2 \times 10^5$  個の内皮細胞を孔径が 0.45 $\mu$ m のセルカルチャーインサート (Falcon, 3090) (Becton Dickinson) の膜上に, アストロサイトは6穴のマルチウエルセルカルチャープレート (multiwell cell culture plate, Falcon, 3502) (Becton Dickinson) 上にウエル当り  $8 \times 10^5$  個播き, 両者の接触を阻止した条件下で共存培養を行った (図 2-B). なお, アストロサイト培養用セルカルチャープレートお

$\gamma$ -GTP 酵素活性を測定した。また、内皮細胞をマトリゲル 400 $\mu$ g/ml (Matrigel, Collaborative Research), IV型コラーゲン 100 $\mu$ g/ml (Collagen type IV, Collaborative Research), ファイブロンネクチン 10 $\mu$ g/ml (Human Plasma Fibronectin, Upstate Biotechnology Incorporated, Lake Placid, USA), ポリ-D-リジン 10 $\mu$ g/ml (Sigma) でそれぞれコートしたフラスコで4日間培養後、 $\gamma$ -GTP 酵素活性を測定した。

調節培地を得るため、サブコンフルエントの状態にあるアストロサイトをPBSにて洗浄した後、15%のFBSを含む新鮮なRPMI 1640/M199 混合中で48時間培養後、培地を回収し、1,600rpm, 5分間の遠心上清を-20°Cに冷凍保存した。使用直前に解凍し、15%のFBSを含む新鮮なRPMI 1640/M199 混合培地と1:1になるように混合し、孔径0.22 $\mu$ mのフィルター(MILLEX-GV) (Millipore, Bedford, USA) を用いてろ過し、これをアストロサイト由来調節培地 (astrocyte conditioned medium) とした。

#### V. ポリ(A)<sup>+</sup>RNAの分離

共存培養を終えた内皮細胞を0.25%トリプシンにて分散し、氷冷したPBSにて3回洗浄した。PBSを完全に取除いた後の内皮細胞からQuick Prep mRNA精製キット(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを分離した<sup>39)</sup>。

#### VI. DNAの化学合成

代表的なBBBマーカーである $\gamma$ -GTP, トランスフェリンレセプター, P-gp, GLUT-1をコードするmRNAに特異的なプライマー, プローブとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計し、フォスフォアミダイド法によりDNA合成装置モデル392 (Applied Biosystems, CA, USA)を用いて化学合成した。合成したオリゴマーの精製にはOPCカラム (Applied Biosystems)を用いた。プライマーの配列は $\gamma$ -GTP mRNA上流プライマー(以下, U)が(5'-ATCGCGTCCACCTCATCG-3') (cDNA塩基番号493-511),  $\gamma$ -GTP mRNA下流プライマー(以下, D) (5'-CCCAAAGTCCTCTTCCTCA-3') (651-669)<sup>34)35)</sup>, トランスフェリンレセプター mRNA-U (5'-GTGACCCTTACACACCTGGA-3') (1180-1199), トランスフェリンレセプター mRNA-D (5'-TCCCTCTAGCCATTCAGTGG-3') (1651-1670)<sup>36)</sup>, P-gp mRNA-U (5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3') (3020-3039), P-gp mRNA-D (5'-GTTCAAACCTCTGCTCCTGA-3') (3157-3176)<sup>37)</sup>, GLUT-1 mRNA-U (5'-TCTGGCATCAACGCTGTCTT-3') (1032-1051), GLUT-1 mRNA-D (5'-AGCATGCCCCACAATGAAA-3') (1424-1443)<sup>38)</sup>, 内部プローブ (internal probe) の配列は $\gamma$ -GTP内部プローブ(以下, I)が(5'-TACTGATTGCTCCAGGCAGA-3') (622-641), トランスフェリンレセプター-I (5'-TGTGAAGCTCACTGTGAGCA-3') (1379-1398), Pgp-I (5'-GGCGCTGGGAAGATCGCTAC-3') (3098-3117), GLUT-1 I (5'-TTCTTTGAAGTGGGTCCTGG-3') (1311-1330)と設定した。ヒト $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin) mRNAに対するプライマー (actin-U, actin-D), プローブ (actin-I) の配列は文献39)に従った。

#### VII. 定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) と増幅産物のサザンブロット分析

Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)を用い、まずポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として逆転写酵素にてcDNAを合成し、ついで各mRNAに特異的なプライマーを

用いてTaq DNAポリメラーゼにてcDNA断片を増幅した<sup>40)</sup>。反応にはDNAサーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus)を使用した。PCR反応産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンフィルター (ハイボンドN<sup>+</sup>, Amersham, Buckinghamshire, UK) に転写後、UVストラタリンカー-2400 (Stratagene, La Jolla, USA)を用いてフィルターに波長254nmの紫外線を120ミリジュール照射しDNAを固定した。ついで、フィルターを50%ホルマリン, 5 $\times$ 食塩-リン酸ソーダエチレンジアミン四酢酸液 (saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid, SSPE), 5 $\times$ デンハルト液 (0.1%ポリビニールピロリドン, 0.1%ウシアルブミン, 0.1%フィコール), 1%SDS, 500 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA (Sigma) からなる溶液中で50°C, 4時間プレハイブリダイズさせた後, 50%ホルマリン, 5 $\times$ SSPE, 5 $\times$ デンハルト液, 1%SDS, 500 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNA, <sup>32</sup>P標識オリゴヌクレオチドプローブ10pmolからなる溶液中で50°C, 16時間ハイブリダイズさせた。プローブ標識には, DNA5'末端標識キット (宝酒造, 京都) と [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] アデノシン三リン酸 (NEN Research Product, Wilmington, USA)を使用した。ハイブリダイゼーション後, フィルターを2 $\times$ SSC, 0.1% SDSにて室温で20分間, 1回, ついで0.5 $\times$ SSC, 0.1% SDSにて室温で20分間, 1回洗浄し, -80°Cでオートラジオグラフィを行った。さらにバイオイメージアナライザーFUJIX BASI000 (富士, 浜松)にて<sup>32</sup>P放射活性を測定した<sup>41)</sup>。

#### VIII. 経内皮透過性試験 (transendothelial permeability assay)

Grassらの方法に従い<sup>42)</sup>, 内皮細胞を介した移送アッセイ (permeability assay)を行った。これに先だって, アストロサイト-内皮細胞の接触培養系では, 孔径3.0 $\mu$ mのスナップウエル (Snapwell, 9350) (Costar, Pleasanton, USA) 膜裏面にアストロサイトを培養化した後, 同じ面の表面に内皮細胞を播き, 15%FBSを含むRPMI1640/Medium199培地にて4日間共存培養した。非接触培養系では膜表面に内皮細胞を播いたスナップウエルを, あらかじめアストロサイトを播いておいたプレート内に移して共存培養した。共存培養後, 膜に内皮細胞が付着していることを確認し, スナップウエルをクレブス・リンガー緩衝液 (Krebs-Ringer's biocarbonate buffer, pH7.4) でリンス後, 温水灌流により37°Cに予熱しておいた移送拡散研究用チャンバースystem (Costar) に装着した。装着後直ちに, あらかじめ37°Cに暖めておいたクレブス・リンガー緩衝液を供給側および受容側の両側のチャンバーに8mlずつ加えた後, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> でバブリングさせて同液を攪拌させた。20 $\mu$ Ci/mlの濃度で [<sup>3</sup>H] イヌリン (260mCi/g, NEN Research Product) を, 10 $\mu$ Ci/mlの濃度で [<sup>14</sup>C] ブタノール (1.01mCi/mmol, NEN Research Product) を供給側のチャンバーに加え, 30分後に受容側より1ml, 60分後に両側チャンバーより1mlずつ採取し, 各々全量を10ml液体シンチレーションカクテルと混和後, <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C放射活性を測定して, 次式により透過性を算出した。

$$P = \frac{V \cdot dC}{A \cdot Co \cdot dt}$$

(dC/dt, 1秒間にスナップウエルを通過するRI値 (dpm/ml/sec); V, 受容側のチャンバーの容量 (ml); A, スナップウエルの膜面積 (cm<sup>2</sup>); Co, 供給側のチャンバーの最初のRI濃度

(dpm/ml.)

バリアー活性は [H] イヌリンについての P の値を [C] ブタノールについての P の値で除したものを内皮細胞単独の場合を100とした相対値で表現した。

**X. 電子顕微鏡による観察**

共存培養後、セルカルチャーインサートのポリエチレンテレフタレート膜を PBS にて洗浄し、1%のカコジル酸グルタルアルデヒドで1時間、後固定し、ショ糖溶液にて洗浄した。さらに、2%四酸化オスミウムを1時間反応させた後、アルコール系列およびプロピレンオキシドにて脱水した。その後、エポキシ樹脂に包埋し、1μmの薄切切片を作製した。トルイジンブルー染色にて光顕的に観察して超薄部位を選定後、薄切切片から超薄切片を作製した。超薄切片はウラニールと酢酸鉛で2重染色し、H-600型電子顕微鏡(日立製作所、日立)にて観察した。

**成 績**

**1. アストロサイト-内皮細胞共存培養系の確立**

Grobstein らの提唱した誘導組織 (inducing tissue) と応答組織 (competent responding tissue) 間の近接組織間相互作用 ("proximate tissue interactions") の様式<sup>43-45)</sup>に基づき、筆者は初代培養ラット胎児脳アストロサイトとヒト臍静脈内皮細胞を

用いた2種の共存培養系を確立した。それらの模式図を図2-A および-B に示した。接触共存培養系 ("Contact through Feet" model) では、直径 3.0μm の孔を有するセルカルチャーインサートのメンブランの片方の面に内皮細胞を、さらにもう片方の面にアストロサイトを培養した (図 2-A)。このモデルは、Grobstein らの細胞間接触モード ("cell-to-cell contact" mode) に基づいており、アストロサイトの足突起が3.0μmの孔を通過して内皮細胞と直接の接触を持つことができ、両者の細胞の接触による影響を見ることになる。もしこのモデルで内皮細胞になんらかの変化が誘導されれば、この誘導にはアストロサイトの細胞表面もしくは細胞外基質に結合したことによるシグナルが関与している可能性が強い。電子顕微鏡による観察で、接触共存培養系では実際アストロサイトが足突起を介して内皮細胞と接触していることが確認された (図 2-C)。もう一方のモデルは非接触共存培養系 ("without Contact" model) として、0.45μm の孔を有するセルカルチャーインサートのメンブラン上に内皮細胞を、さらにセルカルチャープレート上にアストロサイトを培養した (図 2-B)。このモデルは Grobstein らの液性因子の拡散モード ("diffusion of soluble signals" mode) に基づいており、両細胞種間の物理的接触を妨げていることから、アストロサイト由来の液性因子の影響のみをみることになる。また、このアストロサイト由来のシグナルが能動的

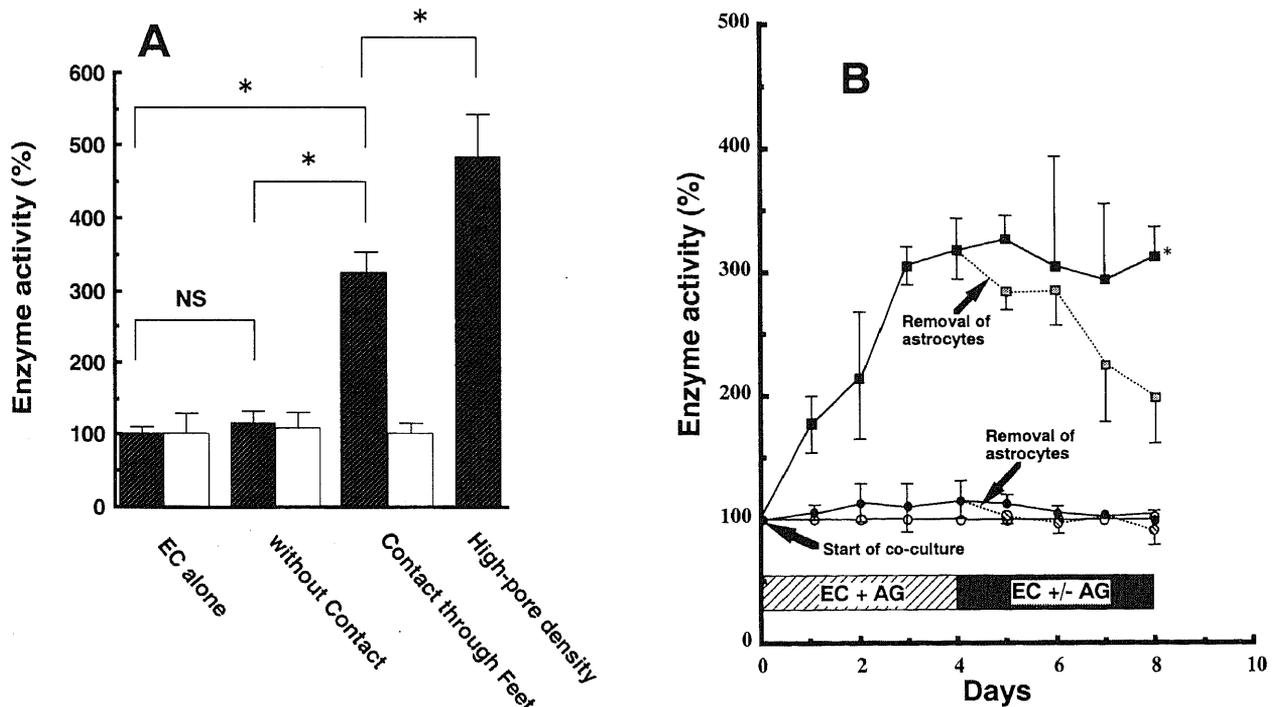


Fig. 3. Induction of  $\gamma$ -GTP in EC by contacting astrocytes. (A)  $\gamma$ -GTP activity in EC co-cultured with astrocytes. Four days after co-culture in the "without Contact" or the "Contact through Feet" systems, EC were assayed for  $\gamma$ -GTP activity as described under Materials and Methods. The values are expressed as  $\bar{x} \pm SD$  ( $n=4\sim5$ ) and related to the value for EC cultured alone. ■, co-culture with astrocytes; □, co-culture with COS-7 cells; High-pore density, co-culture using a cell culture insert which has 2.5-fold higher density of 3.0- $\mu$ m pores. \*and NS,  $p < 0.01$  and not significant, respectively, analyzed by Student's t test. Three separate experiments gave similar results. (B) Time course of astrocyte induction of EC  $\gamma$ -GTP. EC were harvested at the indicated time point and assayed for  $\gamma$ -GTP activity. The astrocyte feeder layer was removed on day 4 with a cell scraper. The values are expressed as  $\bar{x} \pm SD$  ( $n=3$ ) and related to the value without co-culture on each day. \*,  $p < 0.01$ , analyzed by Student's t test. —○—, EC alone; —■—, Contact through Feet; —□—, Contact through Feet (removal of astrocytes on day 4); —●—, without Contact; —⊖—, without Contact (removal of astrocytes on day 4). AG, astroglia=astrocytes.

(instructive) か受動的 (permissive) かを判定するために、コントロール細胞として COS-7 細胞を用いた。

## II. アストロサイトとの接触培養による内皮細胞 $\gamma$ -GTP の誘導

まず、これらの2つのモデルで、アストロサイトと共存培養した内皮細胞の  $\gamma$ -GTP 活性を測定した。対照としてアストロサイトの非存在下に純培養した内皮細胞と COS-7 細胞と共存培養した内皮細胞を用いた。 $\gamma$ -GTP は代表的な BBB マーカーの一つで、その脳血管内皮細胞における生理的役割としては、1) アミノ酸能動輸送と共役して  $\gamma$ -グルタミル基転移反応 (transpeptidation) を触媒すること<sup>46)</sup>、2) 血管透過性を上昇させるロイコトリエン C4 (leukotriene C4) を不活性型であるロイコトリエン D4 (leukotriene D4) に変換して脳微小環境を保護すること<sup>47)</sup> が知られている。

図 3-A に示すように、内皮細胞の  $\gamma$ -GTP 活性は接触共存培養系で有意に上昇し、非接触共存培養系では明らかな変化は認められなかった。アストロサイトと4日間接触培養した内皮細胞の  $\gamma$ -GTP 活性は単独培養した内皮細胞に比し約3倍高く、さらに  $3.0\mu\text{m}$  の孔の密度を2.5倍に増加させる (高頻度孔接触共存培養系, "High pore density" model) と約5倍にまで上昇した (図 3-A)。また、COS-7 細胞をアストロサイトの対照として用いた群では、いずれの共存培養系でも有意な  $\gamma$ -GTP 活性の上昇は認めなかった (図 3-A)。

つぎに、アストロサイトと共存培養した内皮細胞における  $\gamma$ -GTP 活性の経時変化を調べた (図 3-B)。接触共存培養系においては共存培養開始後1日目より酵素活性の上昇を認め、その

値は5~6日目まで次第に上昇を続けた後、ピークに達した。ところが、共存培養開始後4日目にアストロサイトを膜裏面から除くと、内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性は次第に下降することが見いだされた。一方、非接触共存培養系では、アストロサイト層除去前後で内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性に有意な変化はなく、内皮細胞を単独で培養した場合の経時変化とほとんど変わらなかった。

アストロサイトとの接触培養で観察された内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性の誘導が、Grobstein のいう細胞外基質による誘導モード ("induction by extracellular matrix" mode) によるかどうかを調べるため、アストロサイトから調製した ECM 上で内皮細胞を4日間培養後  $\gamma$ -GTP 活性を測定した。その結果、図 4-A に示すように、アストロサイト由来 ECM は内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性を約80%増大させた。また、アストロサイト ECM 自体の  $\gamma$ -GTP 活性は測定限界以下であり、アストロサイトの調節培地は内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。COS-7 細胞由来 ECM には有意な  $\gamma$ -GTP 誘導効果は認められず、アストロサイト ECM の構成成分として記載されている<sup>48)</sup> ラミニン (laminin)、4型コラーゲン (collagen type IV)、さらに他の ECM 成分であるファイブロネクチン (fibronectin) やポリ-D-リジンも内皮細胞  $\gamma$ -GTP 活性に影響を及ぼさなかった (図 4-B)。

## III. 血液脳関門関連遺伝子群の誘導

筆者はつぎに、アストロサイトによる内皮細胞  $\gamma$ -GTP の誘導がこの酵素をコードする mRNA のレベルの上昇によるものかどうかを RT-PCR 法で調べた。このため、まず、セルカルチャーインサート内で純培養した内皮細胞から分離したポリ

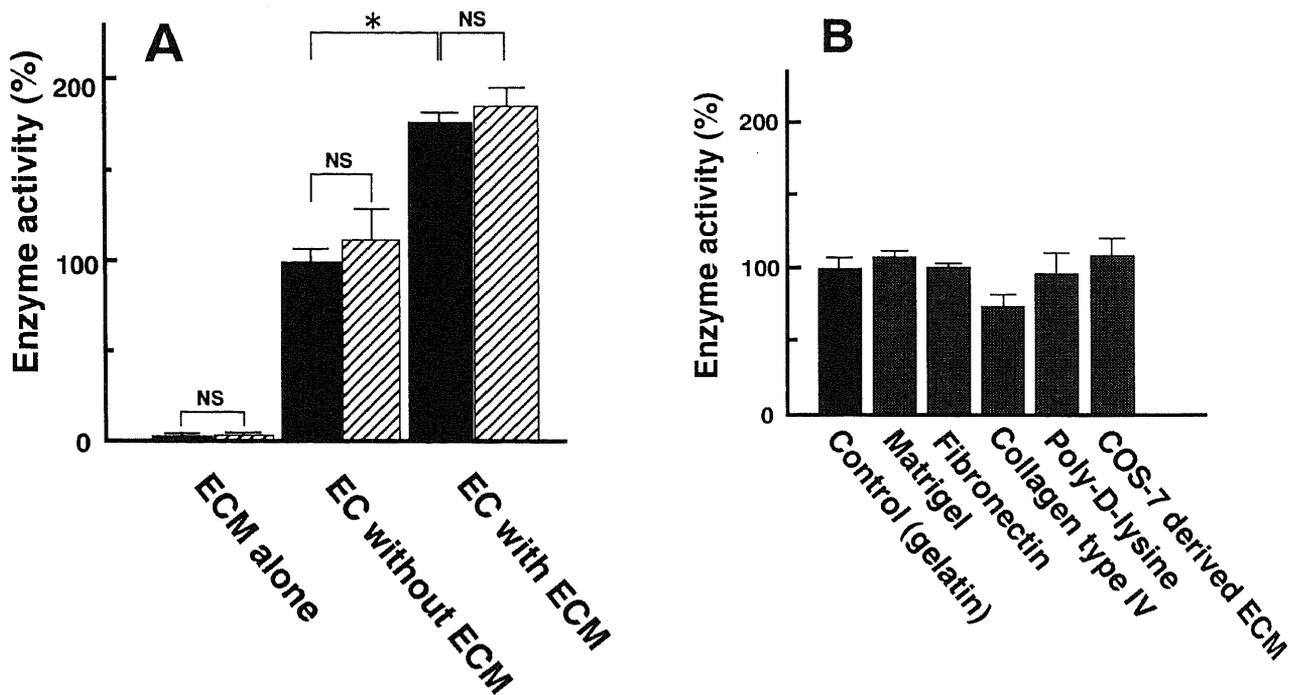


Fig. 4. Induction of  $\gamma$ -GTP in EC by ECM. (A) Effect of astrocyte-derived ECM on EC  $\gamma$ -GTP. Confluent culture of EC was incubated on astrocyte-derived ECM for 4 days, and then processed for  $\gamma$ -GTP assay. M, medium. Conditioned medium was collected on day 7 after the primary culture of fetal rat cerebral astrocytes, and used at 50%. ■, control medium; □, conditioned medium. \*and NS,  $p < 0.01$  and not significant, respectively, analyzed by Student's t test. Note that the ECM, but not the conditioned medium, caused a significant increase in EC  $\gamma$ -GTP. (B) Confluent culture of EC were incubated on several kinds of ECM for 4 days before  $\gamma$ -GTP was measured. All points represent  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . No significant effects were recognized in each case, when compared with control by Student's t test.

(A)<sup>+</sup>RNA を鋳型として、RT-PCR 反応条件の検定を行った。図 5-A は、横軸に鋳型 RNA 量、縦軸には増幅産物のシグナル強度をプロットした検定曲線である。177塩基対 (base pairs, bp) の  $\gamma$ -GTP cDNA 断片の増幅は鋳型 RNA 量が 50ng までは鋳型量に依存して直線的に進行したが、鋳型 RNA 量が 50ng を超えると曲線は平坦化した。次にサイクル数依存度を見ると、図 5-B に示すように、177bp の  $\gamma$ -GTP cDNA 断片の増幅は30サイクルまでは直線的に進行したものの35サイクル以降は平坦化した。したがって、以下の実験では定量性を持つと考えられる鋳型 RNA 量 30ng, 増幅サイクル回数30回の条件で RT-PCR を行った。対照の  $\beta$ -アクチンについても同様な増幅曲線を作成し、鋳型 RNA 量 30ng, 増幅サイクル回数20回の条件でコントロール反応の RT-PCR を行った。また、この反応の陽性コントロールとしてはヒト肝細胞癌由来の細胞株である Hep G2 を用いた<sup>49</sup>。

図 6-A は、アストロサイトと共存培養した内皮細胞から分離したポリ (A)<sup>+</sup>RNA を上記の定量的 RT-PCR 法で分析した結果である。接触共存培養系において最も強いシグナルが得られ、 $\gamma$ -GTP mRNA レベルは内皮細胞単独培養時の約2.7~3.2倍に増大していることが見いだされた。一方、非接触共存培養系では内皮細胞の  $\gamma$ -GTP mRNA レベルは、内皮細胞単独培養時とはほぼ同程度であった。したがって、以上の結果から  $\gamma$ -GTP の酵素活性の増大は対応する mRNA レベルの上昇によるものと考えられた。

筆者は、 $\gamma$ -GTP と並んで代表的な脳血管内皮細胞のマーカーとされているトランスフェリンレセプター、P-gp, GLUT-1 をコードする mRNA についても同様の定量的 RT-PCR 分析を行った。トランスフェリンレセプターは全身のほとんどすべての実質臓器に存在しているが、内皮細胞での発現は脳血管内皮細胞で最も高く<sup>29</sup>、役割としては脳における鉄の取り込みやある種の薬剤の BBB 通過への関与が報告されている<sup>50</sup>。P-gp は脳毛細血管の内腔側に存在し、ATP 依存性に脂溶性薬剤を排泄し<sup>51</sup>、細胞の容積調節を行うクロライドチャンネルとしても機能すると言われている<sup>52</sup>。GLUT-1 は脳血管内皮細胞に選択的に発現し、ニューロンやグリア細胞へのグルコースの輸送を仲介する<sup>20,25</sup>。RT-PCR 反応の陽性コントロールとしてトランスフェリンレセプター mRNA および P-gp mRNA の検出にはヒト腎臓<sup>25,51</sup>、GLUT-1 mRNA 検出には Hep G2<sup>30</sup> を用いた。 $\gamma$ -GTP mRNA の場合と同様に検量曲線を作成して (図 5-A, -B), トランスフェリンレセプター、P-gp, GLUT-1 mRNA の定量域を決定し、前 2 者の場合には 30ng, 30サイクル、GLUT-1 の場合には 30ng, 25サイクルの条件を採用した。

図 6-B に示すように内皮細胞のトランスフェリンレセプター mRNA レベルは接触共存培養系において内皮細胞単独培養時の4.8~6.5倍に上昇していた。しかし、非接触共存培養系ではトランスフェリンレセプター mRNA レベルに変化は認められなかった。また、P-gp をコードする *mdr-1* 遺伝子の mRNA

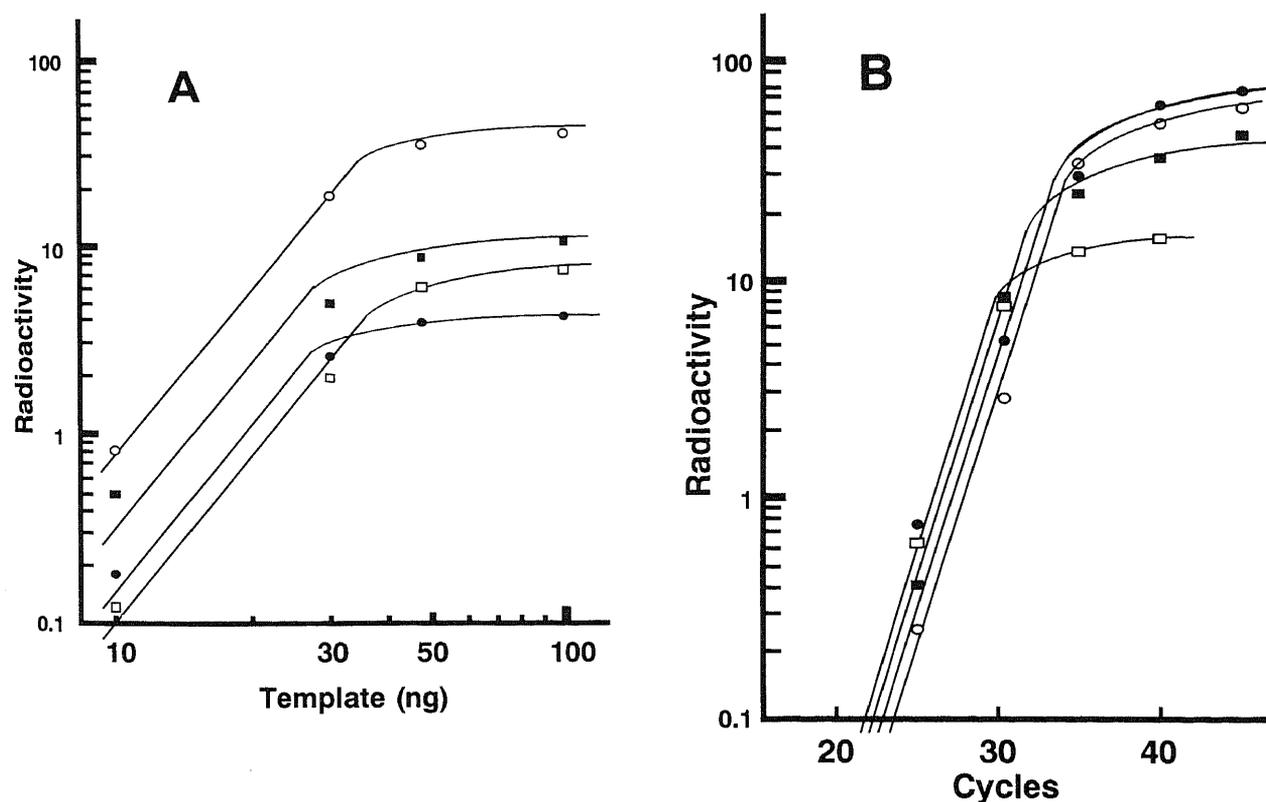


Fig. 5. Quantitative RT-PCR analysis of  $\gamma$ -GTP, transferrin receptor, *mdr-1*, GLUT-1 mRNA. Poly (A)<sup>+</sup>RNA from human umbilical vein EC was used as template for the determination of the exponential range. Serial dilution for  $\gamma$ -GTP, transferrin receptor, *mdr-1* were carried out 30 cycles, but GLUT-1 was 25 cycles. All sequential cycles were initiated with 30 ng of poly (A)<sup>+</sup>RNA. Signal intensities of RT-PCR products were expressed as the arbitrary logarithm values of radioactivities, and plotted against template amount (A) and cycle number (B), respectively. Radioactivities of hybridization bands were measured with a Fujix BAS1000 Bio Image Analyser. ●,  $\gamma$ -GTP; ■, transferrin receptor; ○, *mdr-1*; □, GLUT-1.

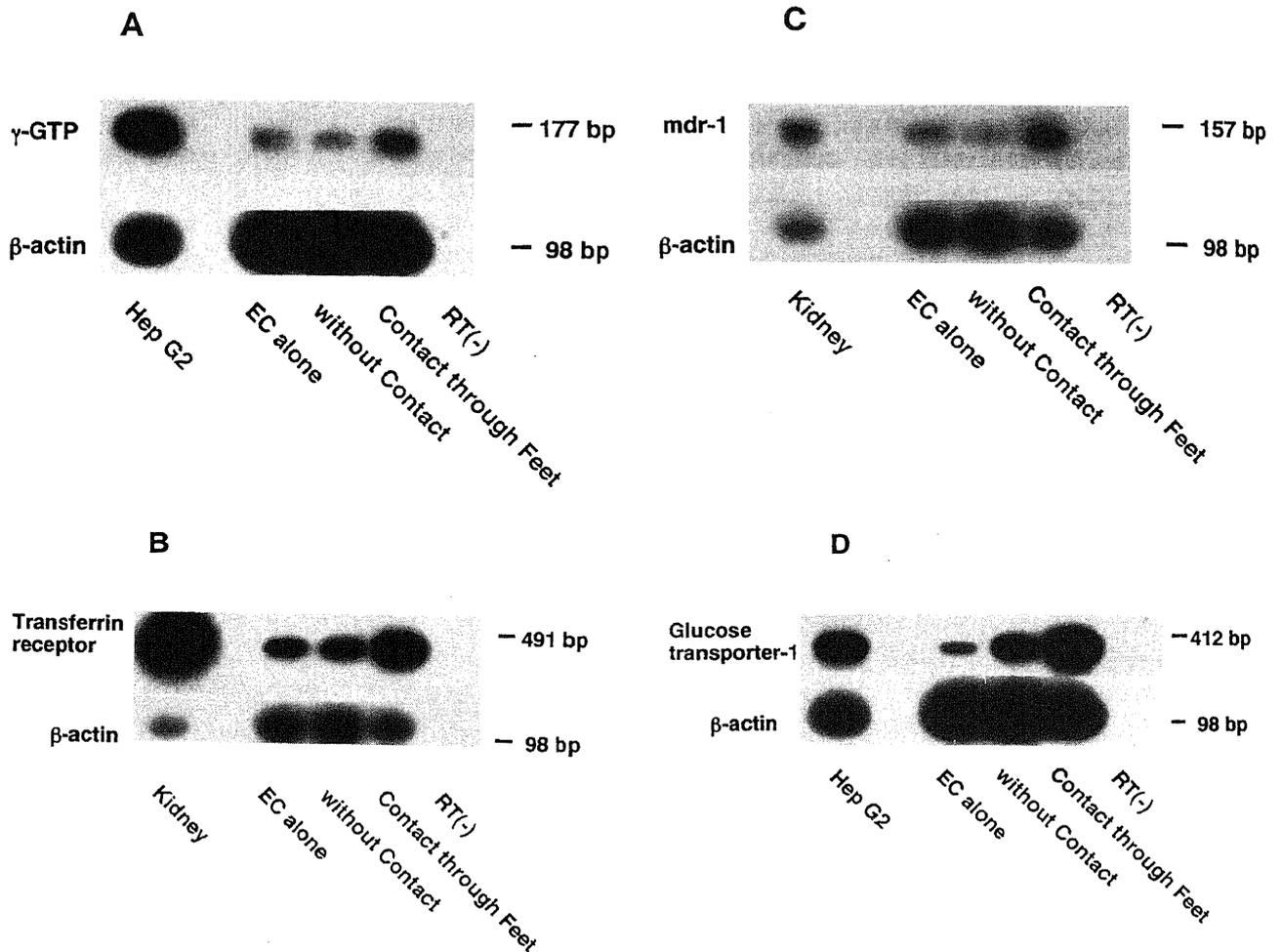


Fig. 6. Quantitative RT-PCR analysis of poly (A)<sup>+</sup>RNAs from EC cultured with or without astrocytes. (A)  $\gamma$ -GTP mRNA. (B) transferrin receptor mRNA. (C) mdr-1 mRNA. (D) GLUT-1 mRNA. Thirty ng of poly (A)<sup>+</sup>RNA was reverse-transcribed and amplified by PCR. Products were electrophoresed on 2% agarose gel, transferred onto nylon membranes and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled probes specific to respective mRNAs. Bars on the right indicate the size of each product in base pairs (bp). Without Contact; EC co-cultured with astrocytes but without contact between the two. Contact through Feet; EC co-cultured with astrocytes with physical contact. RT (-) indicates the reaction minus reverse transcriptase.

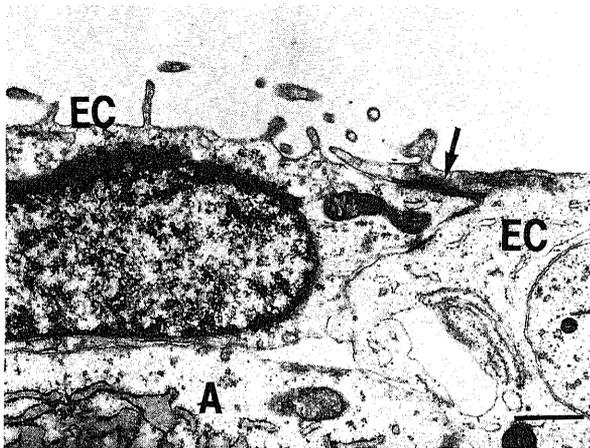


Fig. 7. A close membrane apposition resembling a zonula occludens (arrow) between EC that have contact with astrocytes. A, astrocyte; EC, endothelial cell. Bar, 1  $\mu$ m.

のレベルも、トランスフェリンレセプターの場合と同様に接触共存培養系において内皮細胞単独培養時の3.3~4.3倍に上昇し、非接触共存培養系ではmRNAレベルは影響されなかった(図6-C)。GLUT-1 mRNAの場合には内皮細胞のmRNAレベルは接触共存培養系において内皮細胞単独培養時の9.0~11.6倍にまで上昇し、分析したmRNA中最も強い誘導を受けていることが判った。しかし、GLUT-1 mRNAの場合には非接触共存培養系でも内皮細胞単独培養時の3.2~3.4倍にまで上昇していることが観察された(図6-D)。

#### IV. 電子顕微鏡的観察

電子顕微鏡による観察で、アストロサイトの足突起と直接の接触を持つ内皮細胞の間に結合装置(junctional device)が形成されていることが確認された(図7)。アストロサイトと接触のない内皮細胞には結合装置の形成は稀であった。さらに、アストロサイトと接触を持つ内皮細胞では細胞内のミトコンドリアの数が非接触内皮細胞の約4倍に増加していた(図8-A, -B, 表1)。

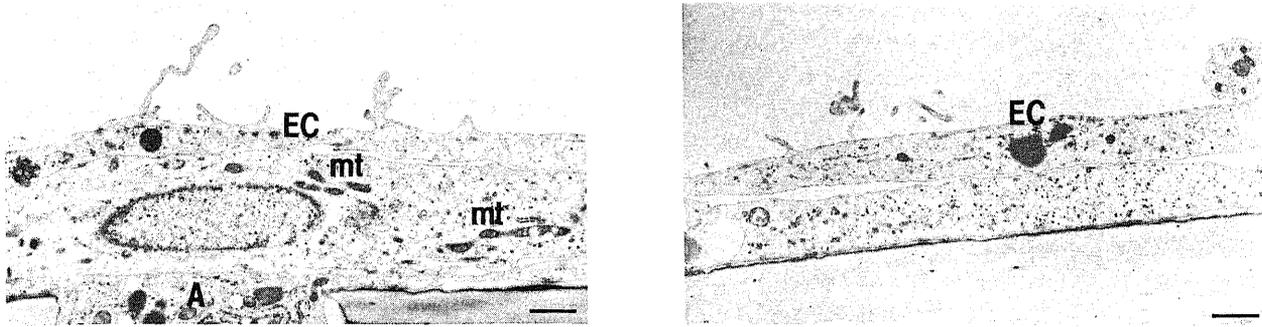


Fig. 8. Astrocytes-induced change in the number of mitochondrion in EC. The number of mitochondrion increased in EC contacting with astrocytes (A) and few mitochondrion were encountered in EC lacking contact with astrocytes (B). A, astrocyte; EC, endothelial cell; mt, mitochondrion. Bars, 1  $\mu$ m.

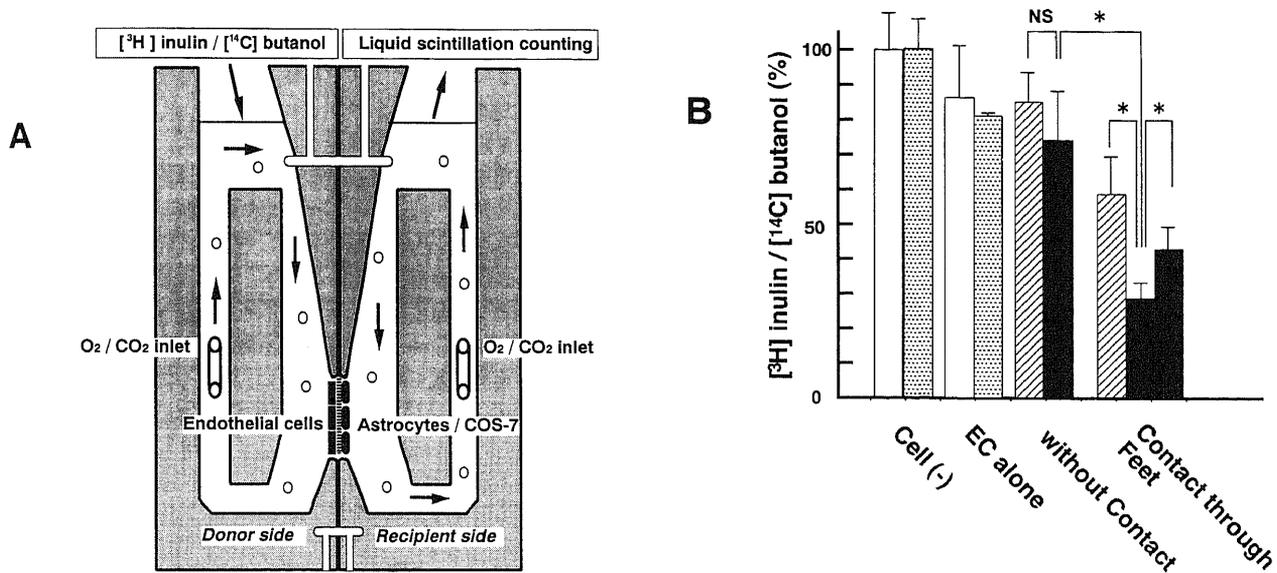


Fig. 9. Induction of a barrier property against inulin on EC by contacting astrocytes. (A) The side-by-side diffusion apparatus for transendothelial transport assay. Before being assayed with this apparatus, EC-astrocyte/COS cell co-cultures were maintained for 4 days. In the "without Contact" system,  $3 \times 10^4$  EC were seeded on the membrane of the Snapwell and placed in a well of a 6-well culture plate, at the bottom of which  $8.0 \times 10^6$  astrocytes or  $1.0 \times 10^6$  COS cells had been seeded. In the "Contact through Feet" system, the same number of EC were seeded on the membrane, on the opposite surface of which  $1.5 \times 10^6$  astrocytes or  $3.0 \times 10^6$  COS cells had been seeded. After the co-culture, Snapwells harboring EC with or without astrocyte/COS cell lining were dislodged from their adaptors, rinsed with Krebs-Ringer's bicarbonate buffer and mounted between acrylic half-cells of the apparatus. Transport buffer was stirred by gas ( $O_2/CO_2$ ) lift and flows in the direction of the arrows parallel to the surface of the cell layer(s). Temperature was kept at  $37^\circ C$  with heating blocks connected to a circulating water bath. (B) A barrier activity of EC-astrocyte co-culture against inulin. The activity was assessed by the ratio of the permeability coefficient for [<sup>3</sup>H] inulin to that for [<sup>14</sup>C] butanol. Values are expressed as  $\bar{x} \pm SD$  ( $n=6\sim 12$ ) and related to the value with  $3.0\text{-}\mu$ m insert alone. For co-cultures in either the "without Contact" or "Contact through Feet" systems,  $3.0\text{-}\mu$ m pore-sized inserts were used. \* and NS,  $p < 0.01$  and not significant, respectively, analyzed by Student's t test. Three separate experiments gave similar results. □,  $0.45\text{-}\mu$ m cell culture insert; ▨,  $3.0\text{-}\mu$ m cell culture insert; ▩, EC→COS-7; ■, EC→AG; ■, AG→EC.

Table 1. Comparison of the number of mitochondrion between EC with or without contact to astrocytes

Contact with AG	Number of visual fields examined	Number of mitochondrion in EC ( $\bar{x} \pm SD$ )
(+)	20	$8.40 \pm 2.10^*$
(-)	20	$2.10 \pm 0.29$

AG, astroglia=astrocyte.

\* $p < 0.01$ , compared to the value without contact.

### V. 障壁能の誘導

筆者はさらに、内皮細胞とアストロサイトとの共存培養系が BBB の中心的な機能であるバリアー機能を発揮しうるかどうかを調べるため移送研究用拡散チェインバースシステム (図 9-A) を用いた物質透過アッセイを行った。基質として  $[^3\text{H}]$  イヌリンと  $[^{14}\text{C}]$  ブタノールを用いた。前者は、経内皮細胞チャンネル (transendothelial channel) を介して非脳型内皮細胞を通過しうるが、BBB を通過しにくいことが知られている<sup>59</sup>。後者は脳型、非脳型にかかわらず内皮細胞内を単純拡散する<sup>50</sup>。本実験では、受容側チャンパーに移行した  $[^3\text{H}]$  イヌリンと  $[^{14}\text{C}]$  ブタノールの放射能から Beck らの方法に従って<sup>10</sup>透過係数を算定し、後者の透過係数に対する前者の透過係数の割合からバリアー活性 (barrier activity) を求めた。その結果、非接触共存培養系では、内皮細胞のバリアー活性はわずかに増強されたにとどまったが、接触共存培養系では  $[^3\text{H}]$  イヌリンに対するバリアー能は著しく増強され、内皮細胞の単独培養時の約 3 倍にまで透過性が抑制された (図 9-B)。アストロサイトの代わりに COS-7 細胞を用いた場合には、いずれのモデルでも有意なバリアー活性の増強は認められなかった。接触共存培養系において、内皮細胞層とアストロサイト層とを逆転させると、図 9-B に示すように、逆方向の透過性に対する抑制は弱く、したがって、アストロサイト-内皮細胞接触培養で構築された障壁能は生理的極性も保持しているものと評価された。

### 考 察

脳毛細血管の内皮細胞は BBB で知られる特異形質を示し、他の臓器の内皮細胞とは際立った特徴を持つ。BBB の概念は 1885年に Ehrlich が脳実質の色素染色性の観察から初めて提唱し<sup>50</sup>、その後、Lewandowsky<sup>59</sup>、Goldmann ら<sup>57</sup>により脳組織と血液の間に特殊な障壁が存在することが立証された。1969年には Brightman らが髄腔内に西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) を注入し、このトレーサー酵素が脳血管内皮細胞の閉鎖帯 (tight junction) までしか到達しえないことから脳毛細血管内皮細胞そのものが BBB を形成していることを示唆した<sup>50</sup>。その後、現在に至る多くの BBB の研究から、BBB という脳血管内皮細胞の特異形質は脳のホメオスタシス維持に不可欠とされている。脳血管内皮の特異形質に関して主なものを以下の 1) ~ 6) に挙げる。1) 脳血管内皮細胞を画する基底膜は有窓を形成せずに連続し、また、その細胞間隙に閉鎖帯を有している。2) 飲み込み小胞が正常状態では非常に少なく、蛋白などの物質の通過性が制限されている。3)  $\gamma$ -GTP, ALP, モノアミンオキシダーゼ (monoamin oxidase)<sup>59</sup>, Na-K-ATP 分解酵素<sup>50,60</sup> などの多種の酵素を多く含んでいる。4) 脳毛細血管細胞を通過する物質の輸送は受動輸送よりも能動輸送によるものが主であり、いわゆる脳の重要な栄養素であるグルコースや中性アミノ酸、イオン類などの物質についてはすべてに特異的な担送体が存在しているといわれている。5) 脳毛細血管内皮細胞は他の臓器の内皮細胞に比べて約 3 ~ 5 倍ミトコンドリアに富み、その代謝活性の高さを示している。6) 脳血管内皮細胞に特異的に発現する蛋白も報告されており、例えば薬剤排泄ポンプとして作用している P-gp や機能に関しては未だ不明な所が多いが HT7<sup>61</sup> などがある。

しかし、一体何が脳血管内皮細胞の特異形質を誘導しているのかという問題に関しては答えは未だ出されていない。脳毛細

血管は内皮細胞の他アストロサイト、周皮細胞、ニューロンと基底膜から構成される。このうち、アストロサイトは脳のみが存在していること、脳毛細血管周囲はアストロサイトの足突起で完全に取り囲まれてしまっていること、アストロサイトは一方でその足突起をニューロンに伸ばし、神経から血管へのシグナル伝達を仲介するような位置関係にあることなどから、アストロサイトが脳血管内皮特異形質の誘導に関わっているのではないかと推測されてきた。しかし、現在に至るまでこの誘導能をアストロサイトが有するかどうかを解析するための適切な試験管内モデルがなく、未だ証明を得ていない。

アストロサイトが BBB の形成に関係しうるという諸家の報告としては以下のものが挙げられる。Stewart らはウズラの胎児脳片をニワトリ体内へ、体節片を脳室内に移植して侵入血管の形成を観察するというキメラモデル (chimera model) を作製した。脳片に侵入してきたウズラの腸間膜動脈由来の毛細血管は組織学的にも機能的にも BBB の性質を認めたが、脳室内で体節片に侵入してきた毛細血管には、BBB の性質は認めなかった。このことより、中枢神経系という環境が毛細血管の障壁形成を誘導することが証明された<sup>62</sup>。このキメラモデルは脳環境が種を超えてその誘導能を及ぼしうることを示唆した。さらには胎児期より脳環境は脳血管内皮細胞特異形質誘導能を有していることを初めて示唆したものとしても非常に意義深い。しかし、ここではその誘導を有する細胞に関しては特に同定まではされていなかった。その後、Janzer らはラット脳皮質より単離したアストロサイトを前眼房内に注入するモデルを作製して、アストロサイトがその候補であることの証明を試みた。そこでアストロサイトは凝集塊をつくるが、侵入してきた毛細血管に障壁の形成を認め、アストロサイトが障壁能の誘導に関わっていることを示唆した<sup>63</sup>。

また、臨床的にも中枢神経作用薬剤が脳内に移行するためには BBB を通過することが必須であるが、未だ有効といえる BBB の試験管内アッセイ系が確立されておらず、この事がアルツハイマー病、脳エイズなどに対する治療薬開発の妨げとなっている。したがって、アストロサイトの役割の検証が可能な試験管内 BBB モデルを確立することは意義があることと思われる。これまで様々な研究者たちにより多くの試験管内 BBB モデルが試作されてきた。Arthur らは継代することにより閉鎖帯を失ったラットの脳毛細血管内皮細胞にアストロサイト調節培地を作用させることにより閉鎖帯の再合成を認め、これを試験管内モデルとした<sup>9</sup>。Tao-Cheng らはアストロサイトのフィブリン層上に培養したラット脳微小血管内皮細胞に閉鎖帯の誘導と細胞結合 (gap-junction) の減少を観察し、これらの誘導作用にはアストロサイトの調節培地は無効であり、細胞間接触 (cell-to-cell contact) が必要と報告した<sup>7</sup>。Dehouck らはウソ脳微小血管内皮細胞をフィルター上層に、アストロサイトをフィルター下層に生着させた共存培養系 (co-culture model) で内皮細胞の  $\gamma$ -GTP の誘導と膜抵抗の上昇を報告した<sup>53</sup>。Tio らはヒト臍静脈内皮細胞とアストロサイトを Dehouck らと同様のモデルで培養すると ALP と閉鎖帯の誘導を認めたと報告した<sup>64</sup>。Abbott らはラットの脳毛細血管を単離培養化に成功し、BBB を再構成させようとした<sup>65</sup>。Hurwitz らは  $3.0\mu\text{m}$  の孔径を有する膜上の片面にヒト胎児脳アストロサイトをもう片面にヒト臍静脈内皮細胞を培養して、両者の細胞に近接した位置関係 (closed apposition) を再現する最初のモデルを確立した<sup>66</sup>。

Ceballos らはナイロンメッシュの上に内皮細胞を培養し、アストロサイトを膜上に培養したセルカルチャーインサート内にそのナイロンメッシュを被せることで試験管内 BBB モデルとして、ヒポキサンチン (hypoxanthine) の経内皮細胞的輸送 (transendothelial transport) が増強されることを報告した<sup>67)</sup>。

本研究で筆者は、Grobstein らの近接相互作用モード ("proximate interaction" mode) に基づいて、2つのタイプの BBB の試験管内共存培養系を作製し、アストロサイトの内皮細胞に対する影響を検討した。このうち非接触共存培養系では、前述した様に内皮細胞とアストロサイトの接触を阻止した条件で共存培養したものである。この系では、内皮細胞に対するアストロサイト由来の液性因子の影響を見ることになる。また、接触共存培養系では、アストロサイトの足突起がセルカルチャーインサートの膜の孔を通過して内皮細胞と直接の接触を持つことができる。これは、脳毛細血管の内皮細胞とアストロサイトとの解剖学的位置関係を再現したものである。この系では、アストロサイトと接触するかまたは非常に近接した内皮細胞がどのような影響を受けるかを見ることになる。これら2つの共存培養系で、内皮細胞としては非脳型の内皮細胞を用いた。これは、アストロサイトが脳型内皮細胞特異形質を誘導しうるかどうかをより明確に観察できるようにしたものである。

この実験系で筆者は代表的な脳血管内皮細胞特異形質である  $\gamma$ -GTP をマーカーとしてアストロサイトの内皮細胞への作用を調べた。その結果、アストロサイトは物理的、時間的に足突起を介する接触に依存して、内皮細胞に  $\gamma$ -GTP を誘導することが確認された。アストロサイト層を除くと  $\gamma$ -GTP は次第に減少することから、この誘導にはいわゆる持続性シグナル ("continuous signal (s)") が必要であることが判った。また、アストロサイトから調製した細胞外基質を用いた検討で、この細胞外基質が部分的に  $\gamma$ -GTP を誘導しうることが見いだされた。しかし、他細胞由来の細胞外基質や既知の細胞外基質成分では有意な内皮細胞  $\gamma$ -GTP の上昇は得られず、この誘導はアスト

ロサイトに特異的な未知の細胞外基質成分が関わっている可能性も考えられた。アストロサイトのフィーダー層が COS 細胞では代替されなかったことから、アストロサイトは能動的 (istructive) で細胞種特異的なシグナルを産生しているものと考えられる。

本研究では脳型内皮形質の誘導に関してより多角的に検討するため、微量のサンプルでも遺伝子発現を分析できる定量的 RT-PCR 法を採用し、 $\gamma$ -GTP に加えてトランスフェリンレセプター、P-gp、GLUT-1 をコードする mRNA 量の変化についても検討した。この実験で筆者は内皮細胞におけるトランスフェリンレセプター、および P-gp がアストロサイトによる誘導を受けることを初めて明らかにした。トランスフェリンレセプターは細胞内から細胞膜上へと移動して血中のフェロトランスフェリン (ferrotransferrin) と結合し、フェロトランスフェリン/トランスフェリンレセプターコンプレックスを形成して、エンドサイトーシス (endocytosis) により鉄の脳内への取り込みに関与したり、また同様の機序にてある種の薬剤の取り込みにも関与している。P-gp は ATP 依存性にピンクリスチン、アドリマイシンなどの抗癌剤を細胞外に排泄する薬剤排泄ポンプとして機能しているのに加えて、低浸透圧に曝された際にクロライドチャンネルとして機能し、細胞容量の調節にも関与すると言われている<sup>68)</sup>。GLUT-1 (55kDa) は、現在まで7種類クローニングされているグルコーストランスポーターの中で最も最初にクローニングされたもので、主に脳毛細血管内皮細胞、肝細胞癌、赤血球に発現を認めるものである<sup>69)</sup>が、最初は脳にのみ発現を認めたため脳型のグルコーストランスポーターとされている。また、脳内ではグルコーストランスポーターアイソフォームがニューロン (GLUT-1 (45kDa), 3) やグリア細胞 (GLUT-1 (45kDa), 5) にも認められている<sup>68)</sup>。前述したように非接触共存培養系では GLUT-1 以外は特に明らかな脳型形質の誘導は認められなかったが、接触共存培養系ではいずれのマーカーもアストロサイトによる誘導が認められた。この結果よ

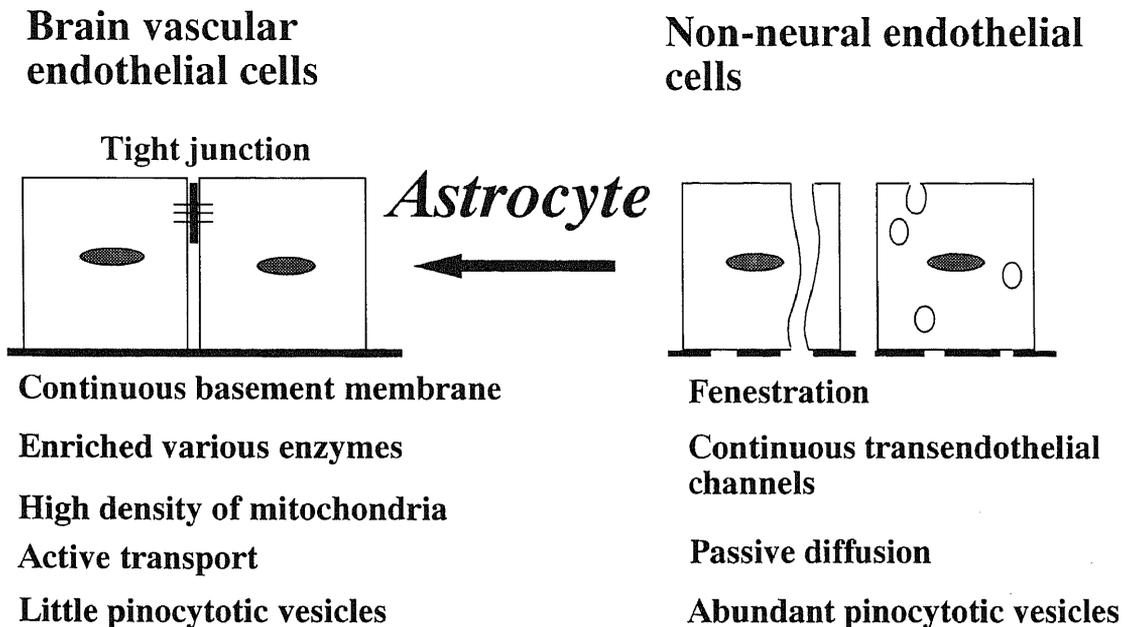


Fig. 10. A schematic representation of astrocyte induction of blood-brain barrier properties.

り、誘導の程度はトランスフェリンレセプター、GLUT-1 は著しい。この両者は胎生期より脳血管内皮細胞において発現が多いことが知られている<sup>19,69</sup>。また、最近の知見ではマウスにおいて P-gp も胎生期よりの発現が知られている<sup>70</sup>。胎児脳アストロサイトをを用いた本研究で種々の BBB 関連遺伝子の誘導が観察されたことは、これらの報告と概ね一致する。BBB が出生時には機能していることも報告されており、アストロサイトは胎生期より脳血管内皮特異形質の誘導、維持に関わっているものと推定される。なお、GLUT-1 の誘導には液性因子の関与も示唆される。腫瘍壊死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が、GLUT-1 を誘導することが報告されており<sup>71</sup>、アストロサイトがこれらのサイトカインを分泌することから、これらの分泌性因子が BBB の場でアストロサイト由来のメディエーターとして作用している可能性も否定できない。しかし、筆者の実験系では主要な誘導のモードとして細胞間接触であり、少なくとも両者の近接した位置関係は必須と思われる。

本研究ではさらに、BBB といわれる由縁であるバリアー活性もアストロサイトとの接触によって、著しく増強されることが見出された。これも両者の接触による形質の誘導を支持するものと思われる。筆者はさらにこのアストロサイトとの接触を介したバリアー活性の誘導は同時に生理的極性を有する事も初めて明らかにした。加藤らは最近、ウシ大動脈内皮細胞とアストロサイトをを用いた同様の物質透過実験から非脳型血管内皮細胞では脳型形質の初期誘導にはやはり近接した位置関係が重要であるが、脳血管内皮細胞が継代培養によって失われた形質を取り戻す際にはアストロサイトと離れた位置にあっても差し支えないとし、これは非脳型血管内皮細胞ではアストロサイトからのシグナルの感受性が低いと説明している<sup>72</sup>。

本研究では、異なる生物種に由来する内皮細胞-アストロサイトの組み合わせで BBB 能の誘導が観察された。このことは、アストロサイトが産生する誘導物質と内皮細胞側の受容装置が進化上種を超えて保存されてきた可能性を示唆している。

筆者は、試験管内共存培養系でアストロサイトが非脳型内皮細胞に脳型形質を誘導するいわゆるトランス分化能を有することを立証した (図10)。これは一方で内皮細胞の分化形質には可塑性が存在することを物語っている。また本研究で確立されたアストロサイト-内皮細胞共存培養モデルは、今後の脳疾患診断・治療薬の開発や脳内への物質輸送の研究<sup>73</sup>に有用な試験管内 BBB モデルとなる可能性も考えられた。

## 結 論

血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞が示す特異形質の総称であるが、これが後天的にアストロサイトによっていかに誘導されているかを独自の試験管内モデルを作製して検討し、以下の新知見を得た。

1. アストロサイトは非脳型血管内皮細胞に脳型特異形質の一つである  $\gamma$ -GTP を誘導し、この誘導はアストロサイトの足突起を介する両細胞種間の接触に依存していた。アストロサイト由来の細胞外基質は部分的に  $\gamma$ -GTP 活性を誘導した。

2. アストロサイトとの接触により他の血液脳関門マーカーであるトランスフェリンレセプター、P-糖蛋白、I型グルコーストランスポーターをコードする遺伝子の発現も誘導された。

3. アストロサイトは内皮細胞における結合装置形成とミトコンドリア数の増加を誘導した。

4. アストロサイトは内皮細胞との接触によりイヌリンの透過性を低下させた。また、この障壁能は生理的極性を保持していた。

以上より、アストロサイトは脳血管内皮細胞特異形質の誘導、維持に関係し、特殊環境である脳の恒常性維持に寄与していると思われる。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導とご校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました金沢大学医学部生化学第二講座山本博教授に心から感謝致します。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部脳神経外科学講座ならびに生化学第二講座の皆様にも感謝致します。最後に、電子顕微鏡標本の作製と写真撮影に、御協力頂いた第一病理学の中西功夫教授、徳田良子技術主任にも感謝致します。

なお、本論文の要旨は一部第13回日本生化学会北陸支部例会 (1995, 富山)、第68回日本生化学会大会 (1995, 仙台)、第3回日本血管細胞生物学研究会大会 (1995, 東京) において発表した。

## 文 献

- 1) Pollay, M. & Robert, P. A.: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. *Neurosurg.*, 6, 675-685 (1980).
- 2) Risau, W. & Wolburg, H.: Development of blood-brain barrier. *TINS*, 13, 174-178 (1990).
- 3) Tontsch, U. & Bauer, H. C.: Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.*, 539, 247-253 (1991).
- 4) Mayer, J., Rauh, J. & Galla, H. J.: The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *J. Neurochem.*, 557, 1971-1977 (1991).
- 5) Beck, D. W., Roberts, R. L. & Olson, J. J.: Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 381, 131-137 (1986).
- 6) Arthur, F. E., Shivers, R. R. & Bowman, P. D.: Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev. Brain Res.*, 36, 309-314 (1987).
- 7) Tao-Cheng, J. H., Nagy, Z. & Brightman, M. W.: Tight junction of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.*, 7, 3293-3299 (1987).
- 8) Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Kraub, B., Schmid, E. -M., Dcalan, M., Farrell, C. & Risau, W.: Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 107, 1347-1357 (1994).
- 9) Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, L., Tanner, L. I., Tomaselli, K. J. & Bard, F.: A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Bio.*, 115, 1725-1735 (1991).
- 10) Maxwell, K., Berliner, J. A. & Cancilla, P. A.: Induction of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain*

- Res., 410, 309-314 (1987).
- 11) DeBault, L. E. & Cancilla, P. A.:  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science*, 207, 653-655 (1980).
  - 12) Mayer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K. & Galla, H. J.: Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.*, 514, 305-309 (1990).
  - 13) Shine, H. D. & Haber, B.: Immunocytochemical localization of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in the rat CNS. *Brain Res.*, 217, 339-349 (1981).
  - 14) Mischeck, U., Meyer, J. & Galla, H. J.: Characterization of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell Tissue Res.*, 256, 221-226 (1989).
  - 15) Audus, K. L. & Borchardt, R. T.: Characteristics of the large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayer. *J. Neurochem.*, 47, 484-488 (1986).
  - 16) Beck, D. W., Vinters, H. V., Hart, M. N. & Cancilla, P. A.: Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 43, 219-224 (1984).
  - 17) Oldendorf, W. H., Cornford, M. E. & Brown, W. J.: The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.*, 1, 409-417 (1977).
  - 18) Stewart, P. A. & Hayakawa, K.: Early ultrastructural changes in blood-brain barrier vessels of the rat embryo. *Dev. Brain Res.*, 78, 25-34 (1994).
  - 19) Cornford, E. M., Hyman, S. & Landaw, E. M.: Developmental modulation of blood-brain barrier glucose transporter in the rabbit. *Brain Res.*, 663, 7-18 (1994).
  - 20) Delorme, P., Gayet, J. & Grignon, G.: Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken. *Brain Res.*, 22, 267-283 (1970).
  - 21) Pardridge, W. M.: Overview of Blood-Brain Barrier Transport Biology and Experimental Methodologies. In W. M. Pardridge (ed.), *Peptide Drug Delivery to the Brain*, 1st ed., p52-98, Raven Press, New York, 1991.
  - 22) Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Willam, A. F., Gatter, K. C. & Mason, D. Y.: Transferrin receptor on endothelium of brain capillary. *Nature*, 312, 162-163 (1984).
  - 23) Cardo, C. C., O'Brien, J. P., Casals, D., Grauer, L. R., Biedler, J. L., Melamed, M. R. & Bertino, J. R.: Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 695-698 (1989).
  - 24) Boado, R. J. & Pardridge, W. M.: The brain-type glucose transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 174-179 (1990).
  - 25) Pardridge, W. M., Boado, R. J. & Farrell, C. R.: Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 265, 18035-18040 (1990).
  - 26) Yamagishi, S., Kobayashi, K. & Yamamoto, H.: Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, 418-425 (1993).
  - 27) Kato, T., Fukui, Y., Turriff, D. E., Nakagawa, S., Lim, R., Arnason, B. G. & Tanaka, R.: Glia maturation factor in bovine brain: partial purification and physicochemical characterization. *Brain Res.*, 212, 393-402 (1981).
  - 28) Tsuchiya, M., Hara, N., Yamada, K., Osago, H. & Simoyama, M.: Cloning and expression of cDNA for arginine-specific ADP-ribosyltransferase from chicken bone marrow cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 27451-27457 (1994).
  - 29) Casper, M. L. & Diglio, C. A.: Expression of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in a transformed rat cerebral endothelial cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 803, 1-6 (1984).
  - 30) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-252 (1976).
  - 31) Schor, A. M., Schor, S. L. & Allen, T. D.: The synthesis of subendothelial matrix by bovine aortic endothelial cells in culture. *Tiss. Cell.*, 16, 677-691 (1984).
  - 32) Mizuguchi, H., Hashioka, Y., Fujii, A., Utoguchi, N., Kubo, K., Nakagawa, S., Baba, A. & Mayumi, T.: Glial extracellular matrix modulates  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in cultured bovine brain capillary and bovine aortic endothelial cells. *Brain Res.*, 651, 155-159 (1994).
  - 33) Aviv, H. & Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69, 1408-1412 (1972).
  - 34) Figlewicz, D. A., Delattre, O., Guellaen, G., Krizus, A., Thomas, G., Zucman, J. & Rouleau, G. A.: Mapping of human  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase genes on Chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics*, 17, 299-305 (1993).
  - 35) Pawlak, A., Wu, S. -J., Bulle, F., Suzuki, A., Chikhi, N., Ferry, N., Baik, J. -H., Siegrist, S. & Guellaen, G.: Different gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs are expressed in human liver and kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164, 912-918 (1989).
  - 36) Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D. & Williams, J. G.: Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature*, 311, 675-678 (1984).
  - 37) Ueda, K., Clark, D. P., Chen, C. -J., Roninson, I. B., Gottseman, M. M. & Pastan, I.: The human multidrug resistance (mdr1) gene: cDNA cloning and transcription initiation. *J. Biol. Chem.*, 262, 505-508 (1987).

- 38) Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E. & Lodish, H. F.: Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, **229**, 941-945 (1985).
- 39) NG, S. Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. & Kedes, L.: Evolution of the functional human  $\beta$ -actin gene and its multi-pseudogene family: Conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogene. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2720-2732 (1985).
- 40) Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F.: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 9717-9721 (1989).
- 41) Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashita, T., Yamashita, J. & Yamamoto, H.: Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28316-28324 (1995).
- 42) Grass, G. M. & Sweetana, S. A.: In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharmacol. Res.*, **5**, 372-376 (1988).
- 43) Grobstein, C.: Induction interaction in the development of the mouse metanephros. *J. Exp. Zool.*, **130**, 319-340 (1955).
- 44) Saxen, L., Lehtonen, E., Karkinen-Jaaskelainen, M., Nordling, S. & Wartiovaara, J.: Are morphogenetic tissue interactions mediated by transmissible signal substances or through cell contacts? *Nature*, **259**, 662-663 (1976).
- 45) Gilbert, S. F.: *Developmental Biology*, 2nd ed., p554-587, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1988.
- 46) Meister, A.: Glutathione; metabolism and function via the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *Life Science*, **15**, 177-190 (1974).
- 47) Black, K. L., Baba, T. & Pardridge, W. M.: Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene-C<sub>4</sub>. *J. Neurosurg.*, **81**, 745-751 (1994).
- 48) Lathera, J., Guerin, C. & Goldstein, G.: Astrocyte induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structure in vitro. *J. Cell Physiol.*, **144**, 294-215 (1990).
- 49) Goodspeed, D. C., Dunn, T. J., Miller, C. D. & Pitot, H. C.: Human  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase cDNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene*, **76**, 1-9 (1989).
- 50) Morris, C. M., Keith, A. B., Edwardson, J. A. & Pullen, R. G. L.: Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain. *J. Neurochem.*, **59**, 300-306 (1992).
- 51) Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M. & Pastan, I.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 265-269 (1987).
- 52) Gill, D. R., Hyde, S. C. & Higgins, C. F.: Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*, **71**, 23-32 (1992).
- 53) Dehouck, M. P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C. & Cecchelli, R.: An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.*, **54**, 1798-1801 (1990).
- 54) Robert, L., Utert, V., Sage, J. L., Levy, D. E. & Duffy, T. E.: Comparison of radio-labelled butanol and iodoantipyrine as cerebral blood flow markers. *Brain Res.*, **222**, 365-372 (1981).
- 55) Ehrlich, P.: *Das Sauerstoff Bedurfnis des Organismus*. In P. Ehrlich (ed.), *Eine Far Benalytische Studie*, 1st ed., p69-72, Hirschwald, Berlin, 1885.
- 56) Lewandowsky, M.: Zur Lehre der Cerebrospinalflussigkeit. *Z. Klin. Med.*, **40**, 480-494 (1909).
- 57) Goldmann, E. E.: Die aussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitalen Farbung". *Beitr. Klin. Chir.*, **64**, 192-265 (1909).
- 58) Brightman, M. W. & Reese, T. S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.*, **40**, 648-677 (1969).
- 59) Meresse, S., Dehouck, M. -P., Delorme, P., Bensaid, M., Tauber, J. P., Delbart, C., Fruchart, J. -C. & Cecchelli, R.: Bovine brain endothelial cells express tight-junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.*, **53**, 1363-1371 (1989).
- 60) Bauer, H. C., Tontsch, U., Amberger, A. & Bauer, H.: Gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities in different subpopulation of cloned cerebral endothelial cells; response to glial stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 358-363 (1990).
- 61) Seuberger, H., Lottspeich, F. & Risau, W.: The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein. *EMBO J.*, **9**, 2151-2158 (1990).
- 62) Stewart, P. A. & Wiley, M. J.: Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.*, **84**, 183-192 (1981).
- 63) Janzer, R. C. & Raff, M. C.: Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, **325**, 253-257 (1987).
- 64) Tio, S., Deenen, M. & Marani, E.: Astrocyte-mediated induction of alkaline phosphatase activity in human umbilical cord vein endothelium: An in vitro model. *Eur. J. Morphol.*, **28**, 289-300 (1990).
- 65) Abbott, N. J., Hughes, C. C. W., Revest, P. A. & Greenwood, J.: Development and characterisation of a rat capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J. Cell Science*, **103**, 23-37 (1992).
- 66) Hurwitz, A. A., Berman, J. W., Rashbaum, W. K. & Lyman, W. D.: Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by

- autologous endothelial cells. *Brain Res.*, **625**, 238-243 (1993).
- 67) **Ceballos, G. & Rubio, R.** : Coculture of astroglial and vascular endothelial cells as apposing layers enhances the transcellular transport of hypoxanthine. *J. Neurochem.*, **64**, 991-995 (1995).
- 68) **Maher, F., Vannucci, S. J. & Simpson, I. A.** : Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J.*, **8**, 1003-1011 (1994).
- 69) **Katzman, R.** : Blood-Brain-CSF barrier. In G. J. Siegel, R. W. Albers, B. W. Agranoff & R. Katzman (eds.), *Basic Neurochemistry*, 3rd. ed., p497-510, Little Brown and Company, Boston, 1981.
- 70) **Qin, Y. & Sato, T. N.** : Mouse multidrug resistance 1a/3 gene is the earliest known endothelial cell differentiation marker during blood-brain barrier development. *Developmental Dynamics*, **202**, 172-180 (1995).
- 71) **Pekala, P., Marlow, M., Heuvelman, D. & Connolly, D.** : Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not by insulin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18051-18054 (1990).
- 72) 加藤泰治, 磯部一郎, 四ツ柳智久: 血液・脳関門とアストロサイト. *Drug delivery system*, **10**, 254 (1995).
- 73) **Pardridge, W. M., Boado, R. J. & Kang, Y. S.** : Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 5592-5596 (1995).

**Astrocyte Induction of Brain Endothelium-Specific Functions** Yasuhiko Hayashi, department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **105**, 257—271 (1996)

**Key words** astrocyte, endothelial cell, co-culture, blood-brain barrier, trans-differentiation

#### Abstract

Vascular endothelial cells (EC) exhibit organ-to-organ heterogeneity in their functions and morphologies. In particular, brain capillary EC have unique characteristics exemplified by the blood-brain barrier (BBB). The formation and the maintenance of BBB have been ascribed to EC responses to inductive signal(s) or factor(s) from astrocytes that encircle microvessels in the central nervous system. However, this hypothesis remains to be tested, because suitable in vitro models to verify the role of astrocytes are not yet available. In this study, I constructed a heterologous co-culture system, in which rat fetal brain astrocytes were cultivated on one surface of a porous membrane and human umbilical vein EC on the opposite surface. Electron microscopic examination revealed that astrocytes passed their endfeet through the pores, making contact with EC. In this system, gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) activity in EC was found to be significantly increased by contacting astrocytes in a density- and time-dependent manner, but not when the astrocyte feeder layer was apart from EC or replaced by COS cells; astrocyte-derived extracellular matrix partially activated  $\gamma$ -GTP. mRNAs for some of the representative BBB markers, including transferrin receptor, P-glycoprotein, brain-type glucose transporter and  $\gamma$ -GTP as well were demonstrated by reverse transcription-polymerase chain reaction to be upregulated in EC co-cultured with astrocytes. Astrocyte-induction of close membrane apposition resembling a zonula occludens and of an increase in the number of mitochondrion in EC were also noted in electron micrographs. Further, increased barrier activity against inulin was conferred on EC when lined with astrocytes; this barrier function exhibited a due polarity. The results obtained with this heterologous co-culture system thus indicate that through contact with their feet, astrocytes are capable of transdifferentiating non-neural EC into the brain type, endowing them with the BBB properties.