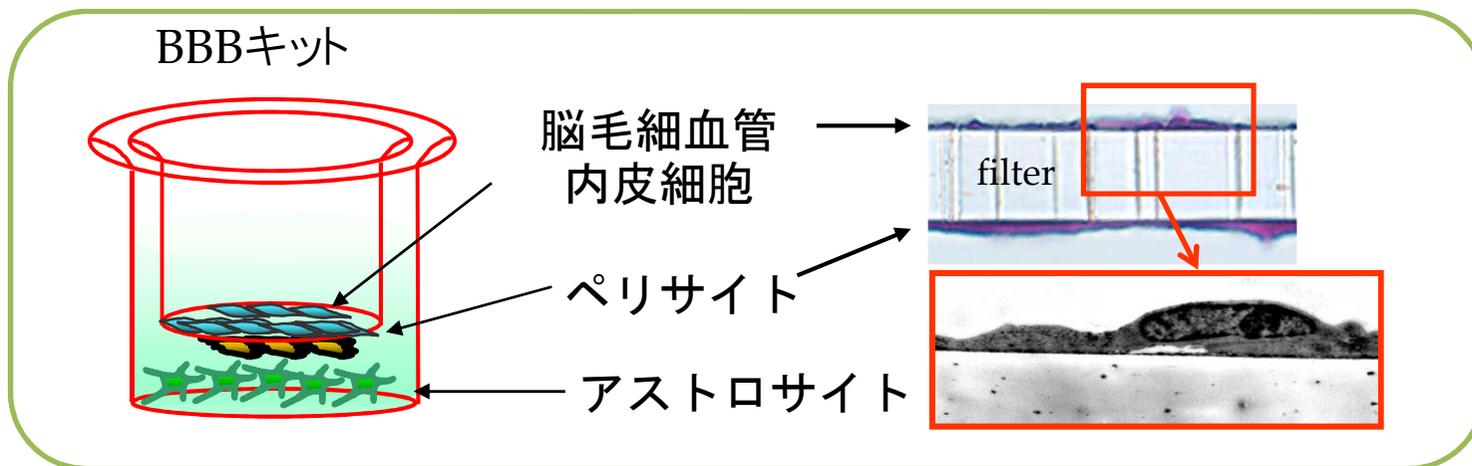
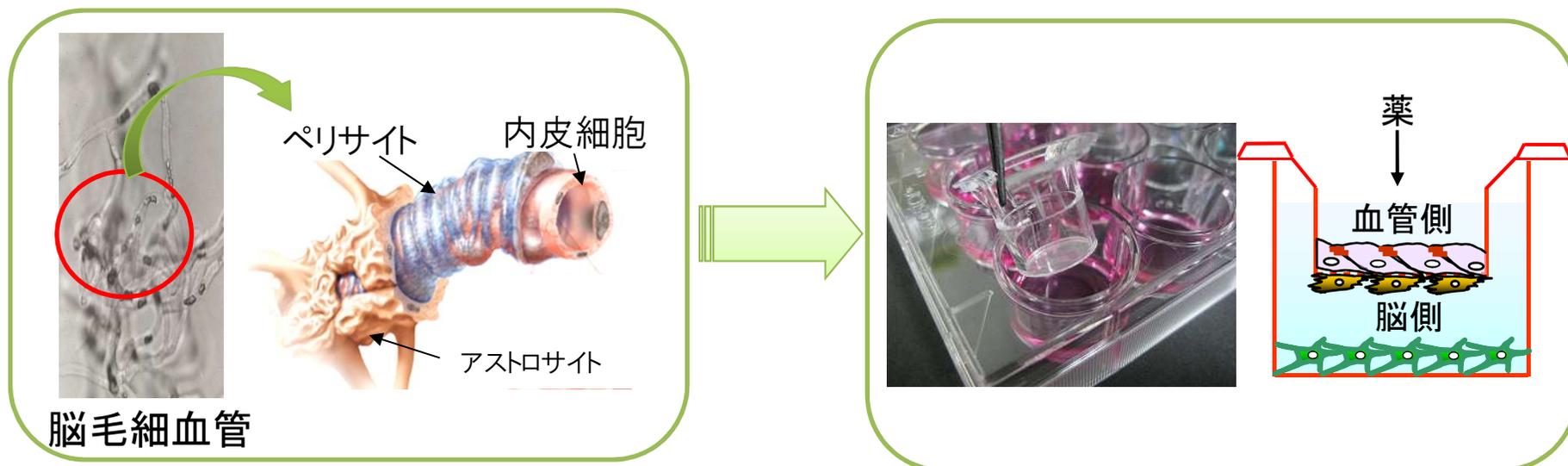




BBBキットとは？

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier) の試験管内再構成モデル

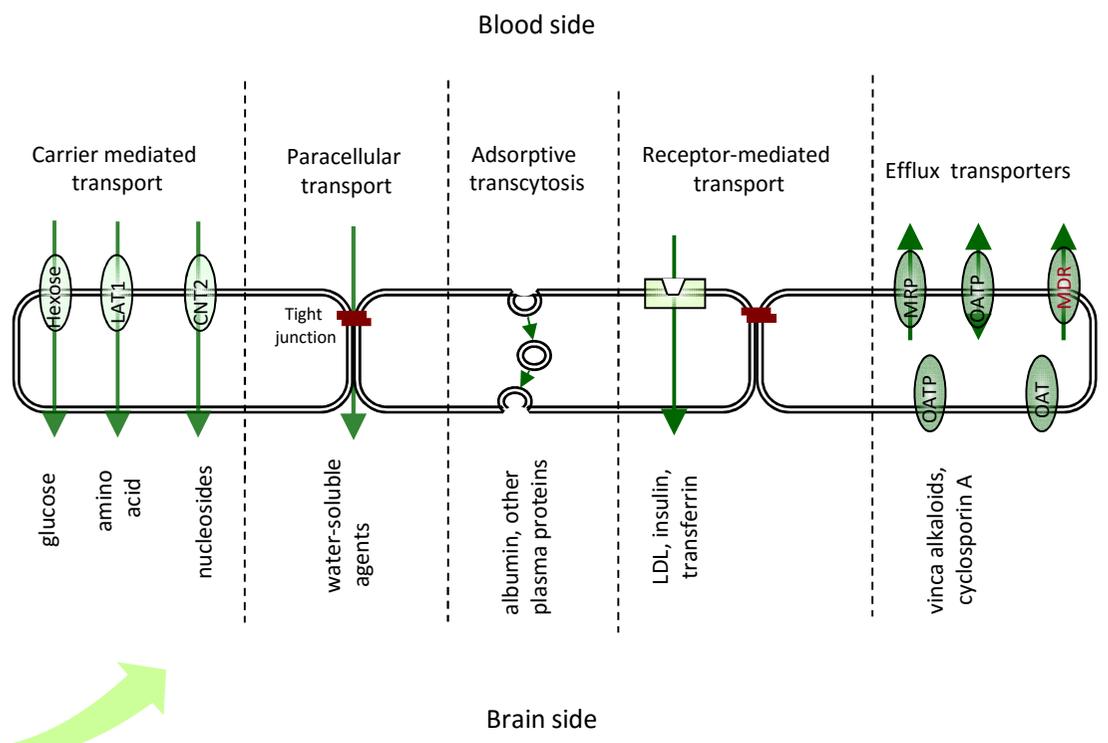




血液脳関門 (BBB)

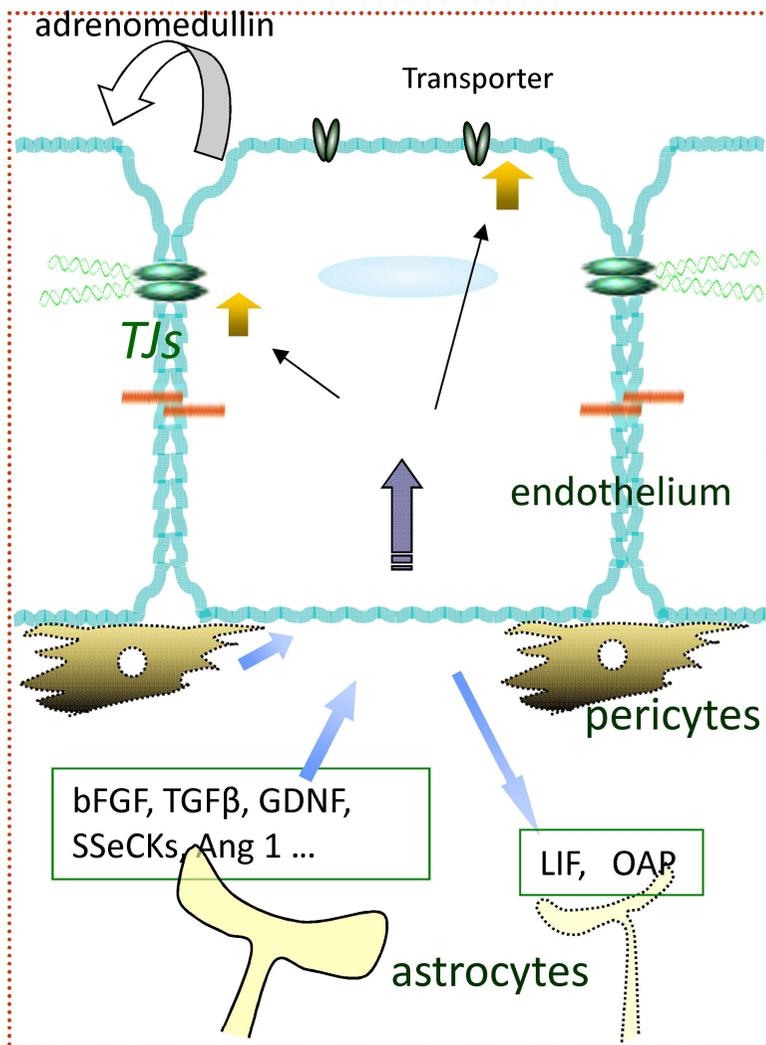


BBBにおける様々な輸送経路



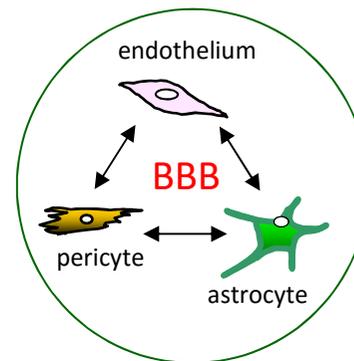
BBB における細胞間クロストーク

BBB の構築及び機能維持には、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト間のクロストークが密接に関係している。



共培養による効果

1. Barrier 機能 \uparrow
TJs タンパク質 \uparrow 、TEER \uparrow 、Pe \downarrow ...
2. トランスポーター \uparrow
P-gp \uparrow 、GLUT1 \uparrow ...
3. 酵素 \uparrow
 γ -GTP \uparrow 、ALP \uparrow ...

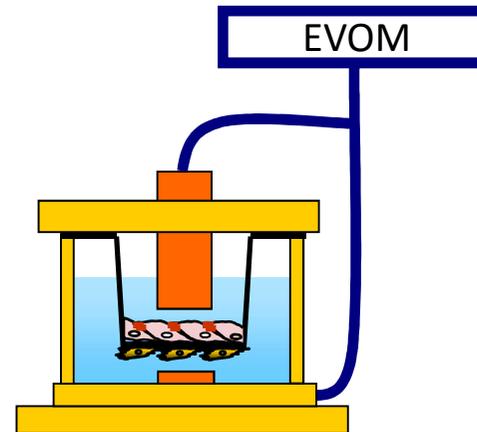


BBB はこれら
3 種類の細胞に
よるクロストーク
で維持されている



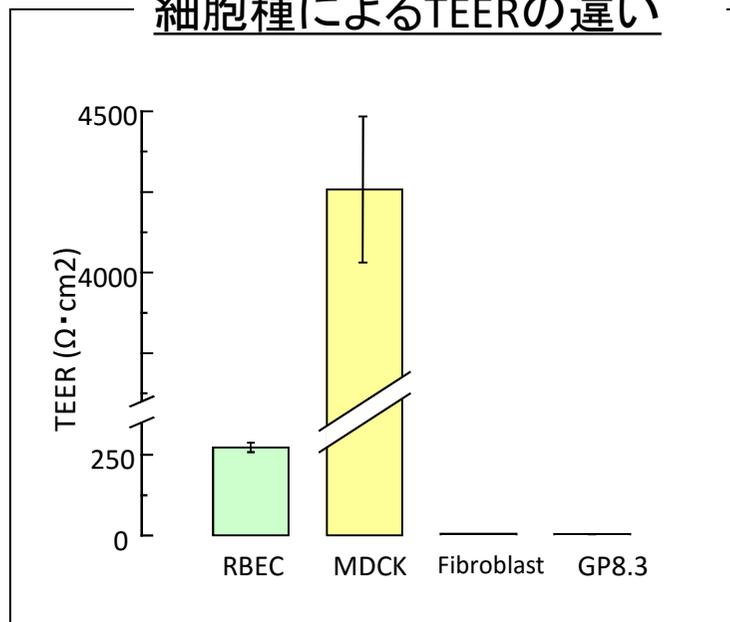
経内皮電気抵抗によるバリア機能評価 (Trans-endothelial electrical resistance; TEER)

TEER はイオンの移動の指標であり、タイトジャンクション機能とよく相関する

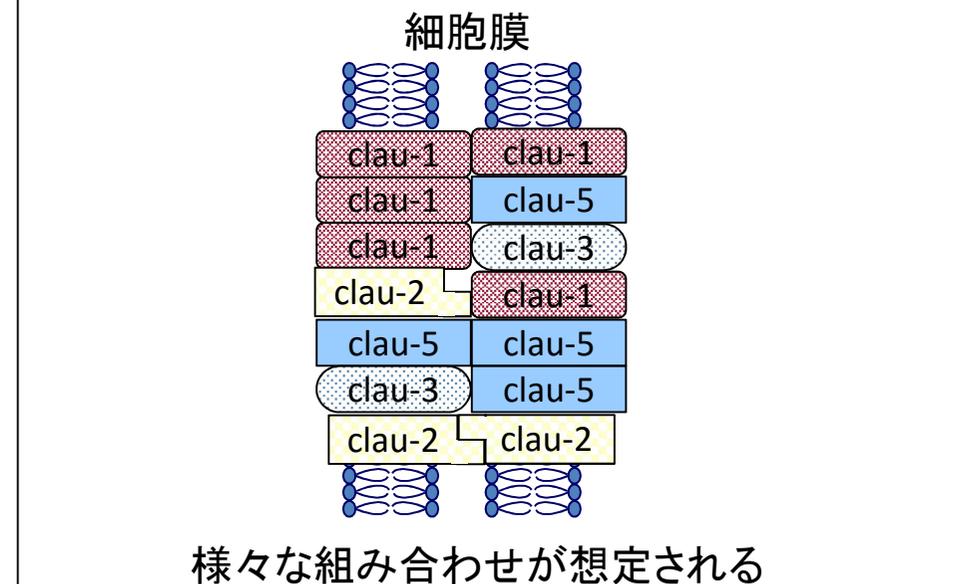


Endohm

細胞種によるTEERの違い



claudins (1~24) の組み合わせによる TEER の違い





経内皮電気抵抗 (TEER) 測定装置

◎電気抵抗計

- Millicell-ERS2 (Millipore社) 又は
- EVOM2 (WPI社)

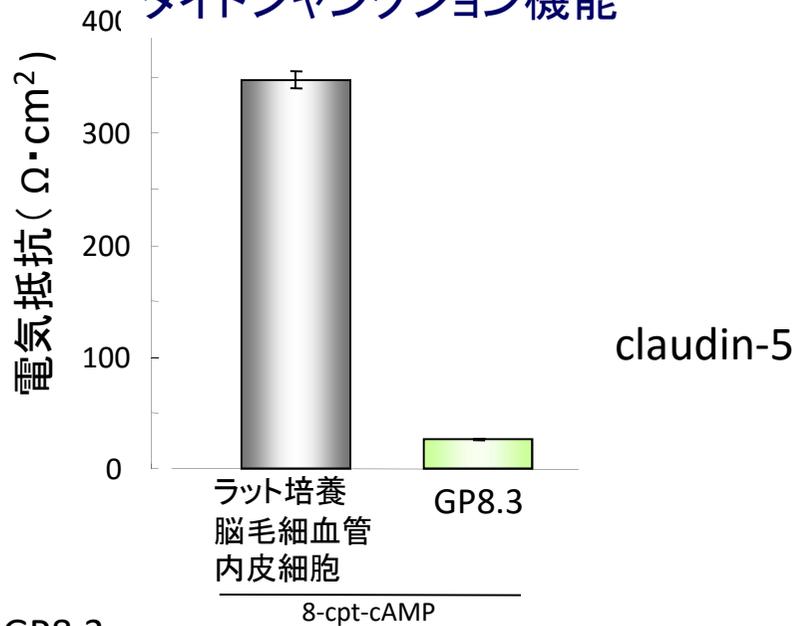
◎カップ型電極

- ENDOHM-6 (WPI社)
→RBT-24H、MBT-24H 測定用



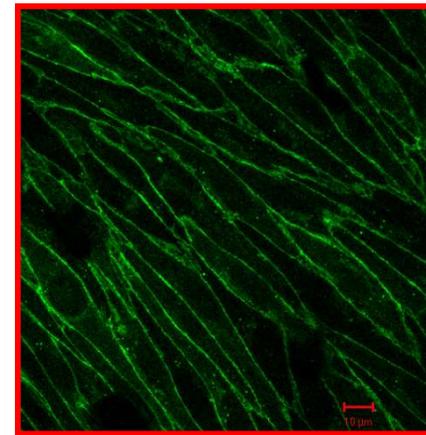
初代培養細胞と不死化細胞のTJ発現比較

タイトジャンクション機能

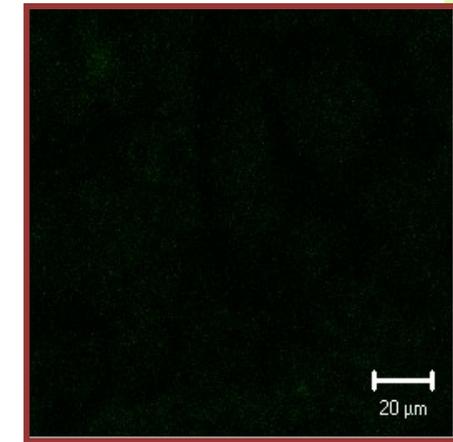


タイトジャンクションタンパクの発現

ラット培養脳毛細血管
内皮細胞

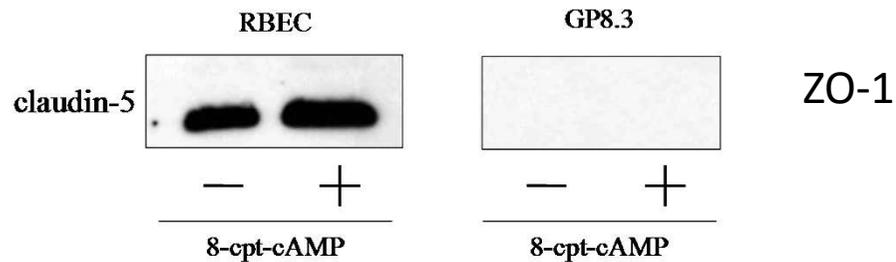


GP8.3



GP8.3

不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株

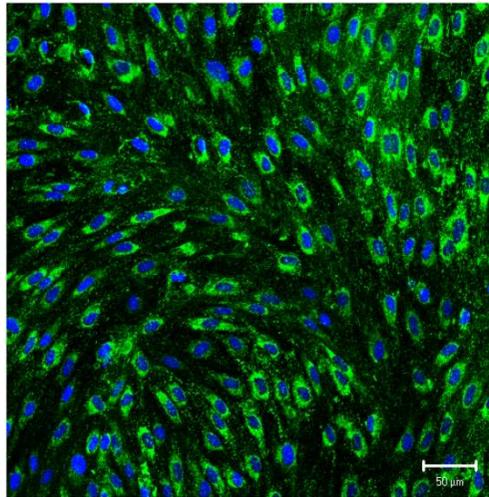


不死化脳毛細血管内皮細胞株 (GP8.3など) は BBB機能を保持していない



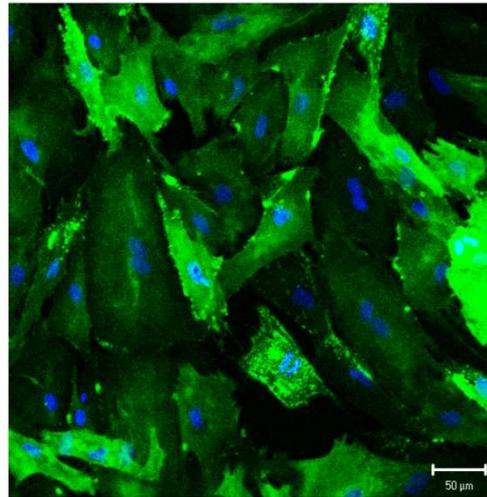
BBB 構成細胞のマーカー染色

Brain endothelial cells

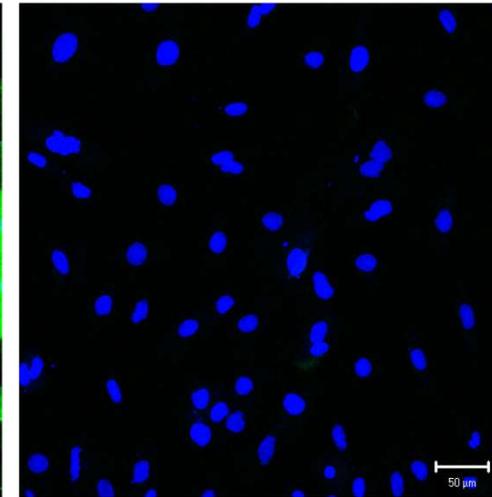


vWF

Pericytes

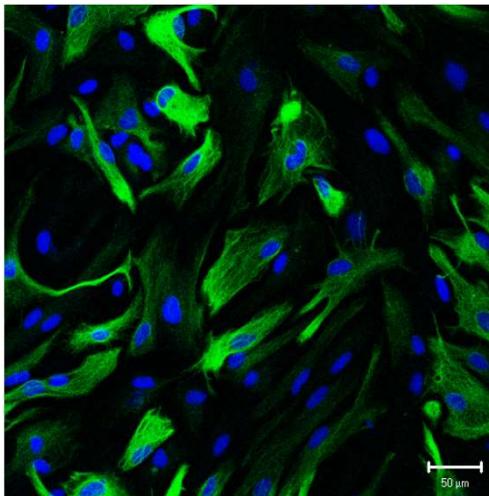


NG2

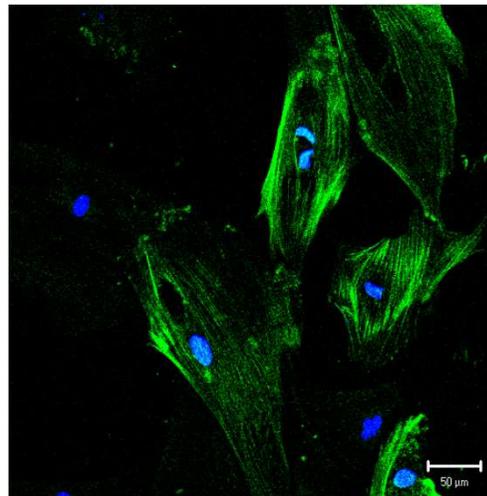


vWF

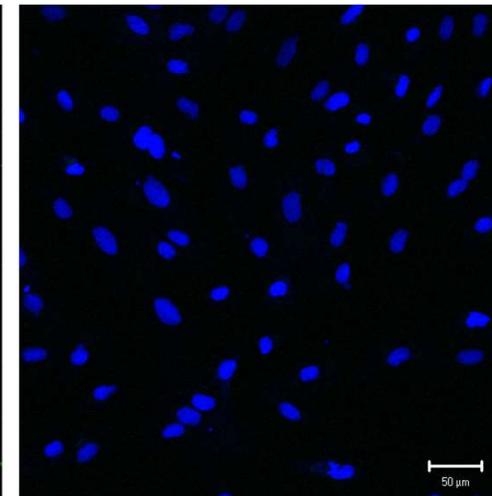
Astrocytes



GFAP



α -SM actin



GFAP

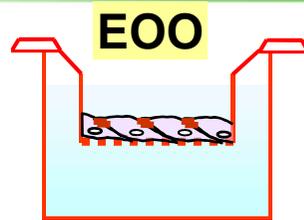
50μm



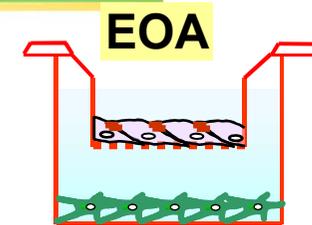
細胞の組み合わせの検討

7種類のBBBモデル

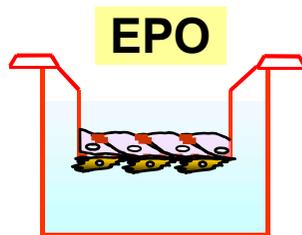
1) 内皮細胞単層培養



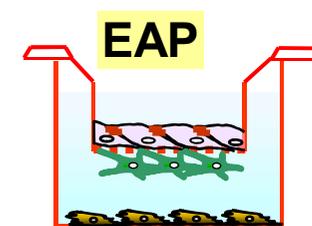
5) アストロサイト非接着共培養



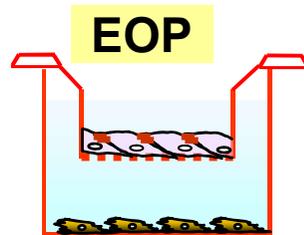
2) ペリサイト接着共培養



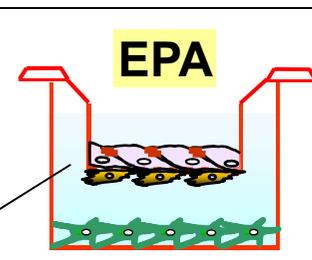
6) アストロサイト接着 + ペリサイト非接着共培養



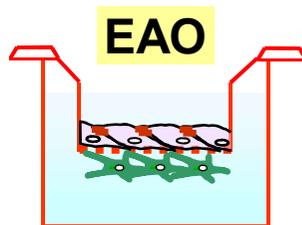
3) ペリサイト非接着共培養



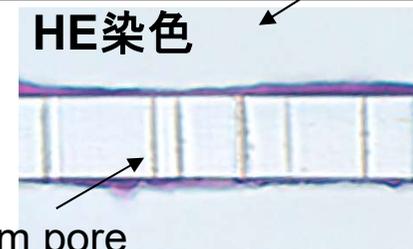
7) ペリサイト接着 + アストロサイト非接着共培養



4) アストロサイト接着共培養



HE染色



0.4 μm pore



内皮細胞 (E)



ペリサイト (P)



アストロサイト (A)

細胞なし (O)

上記配置の特注品製造が可能



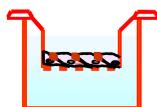
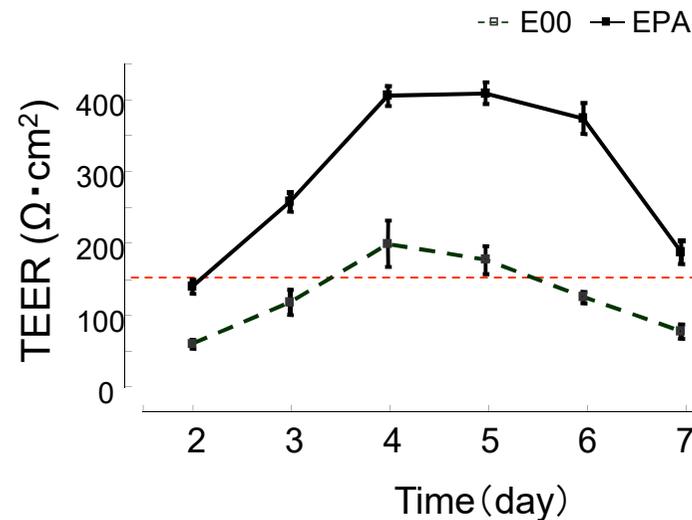
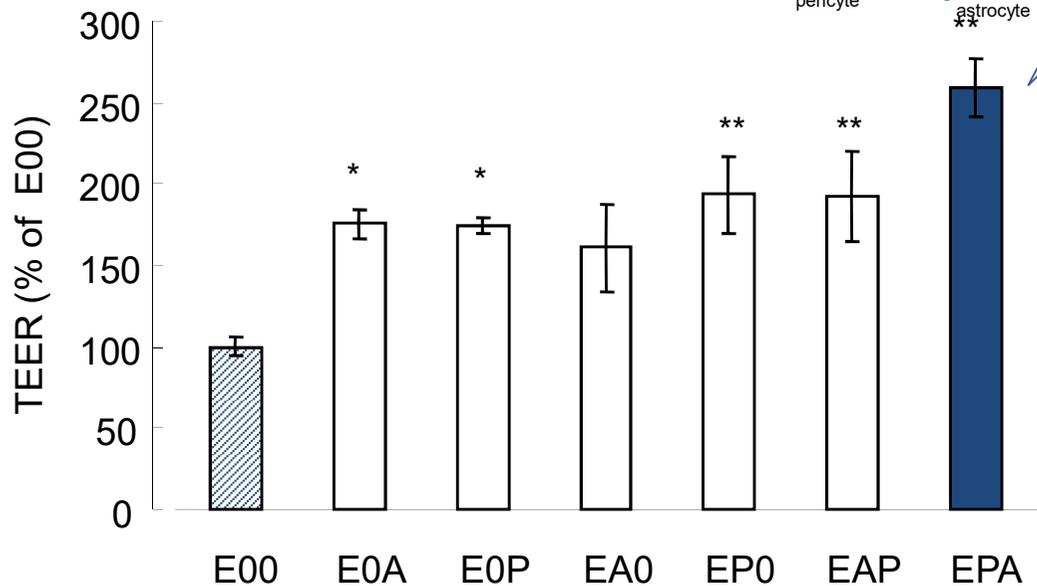
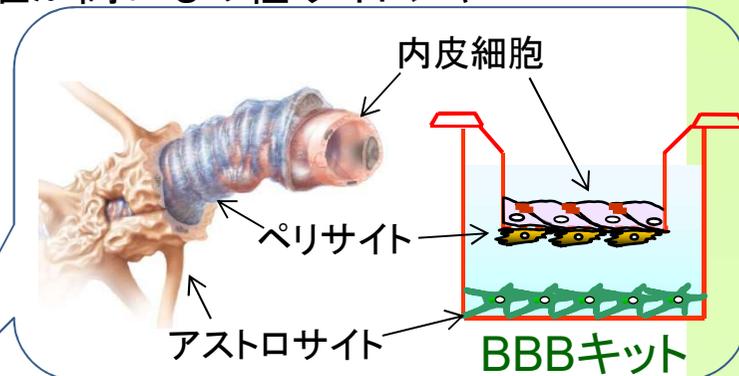
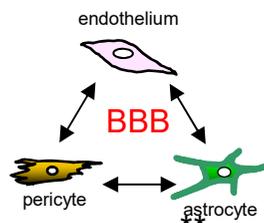
BBBキットの機能検定

経内皮電気抵抗 (TEER)

タイトジャンクション (密着結合) の評価

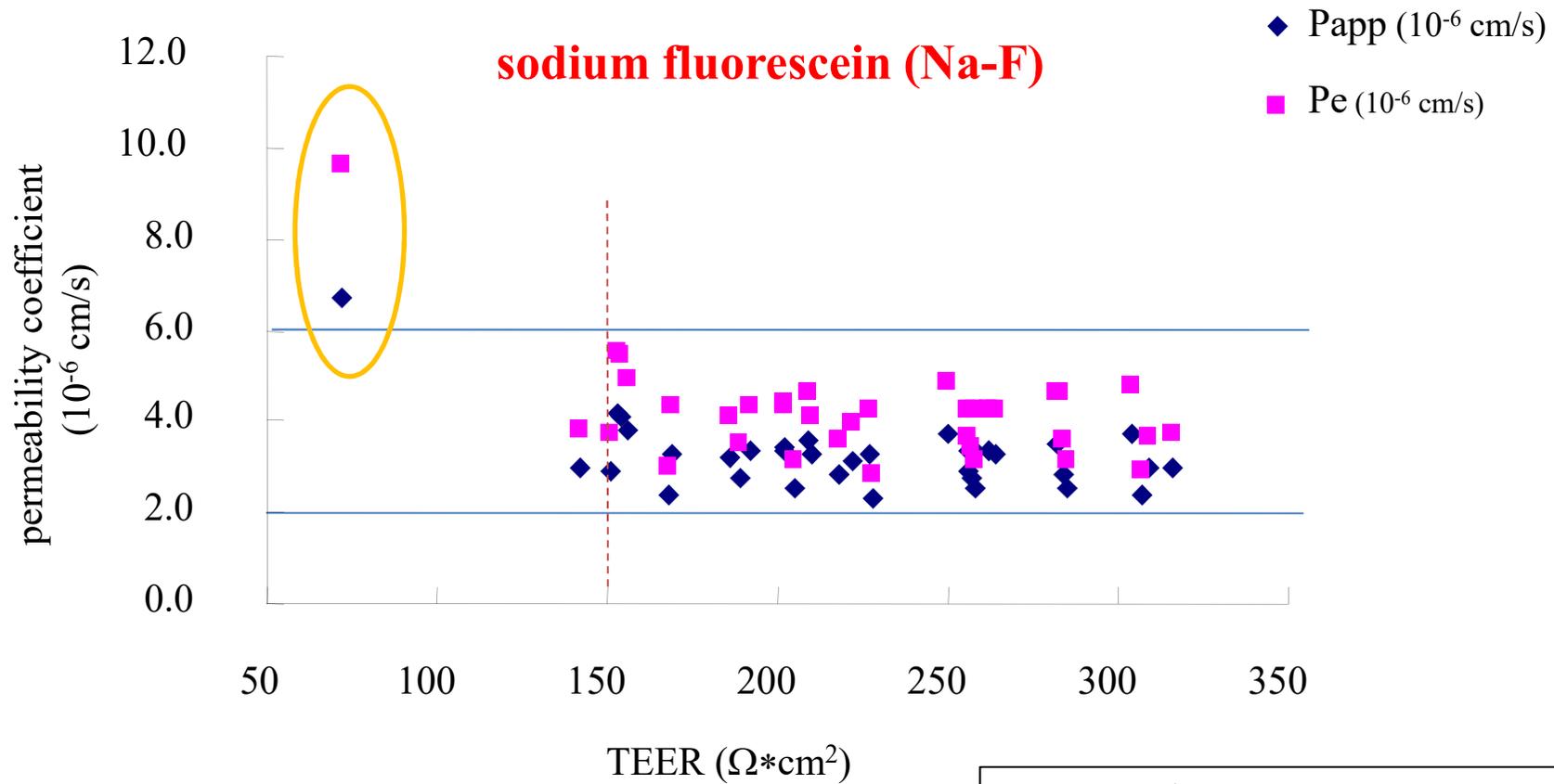


TEER はイオンの移動の指標であり、その値が高いもの程タイトジャンクション機能が高いことを示している。





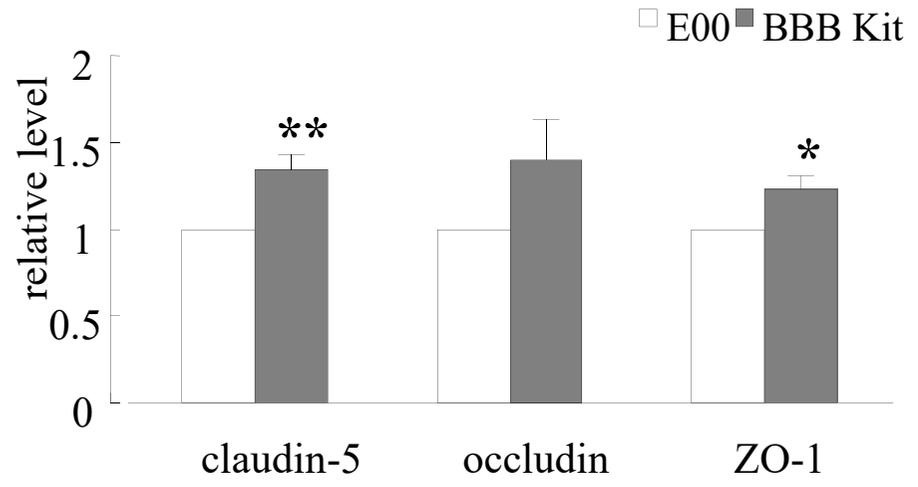
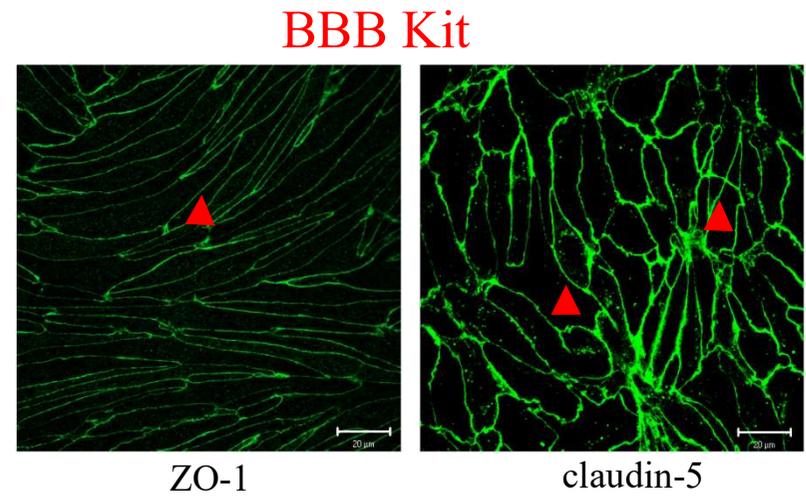
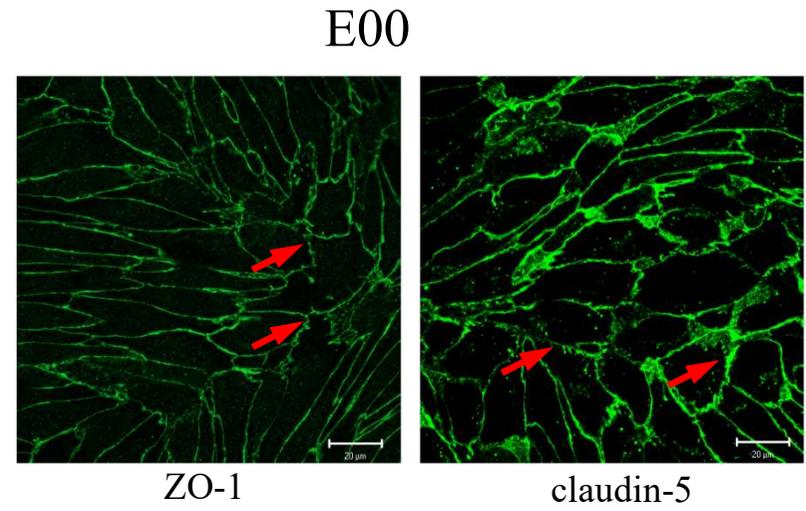
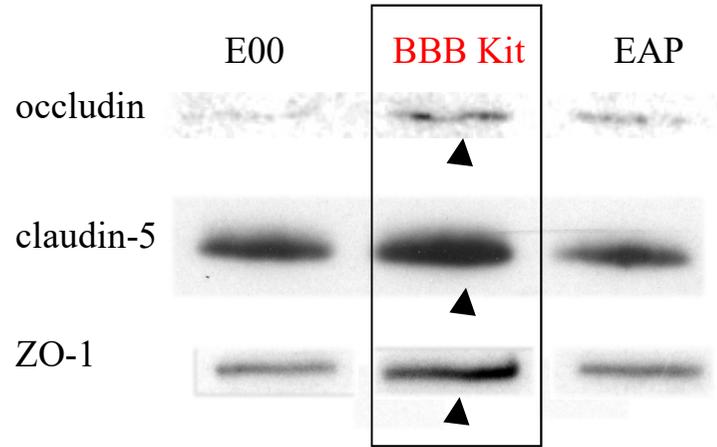
TEERとNaF透過係数の関係



TEERが150 Ω x cm²以上
↓
透過係数に変化はない



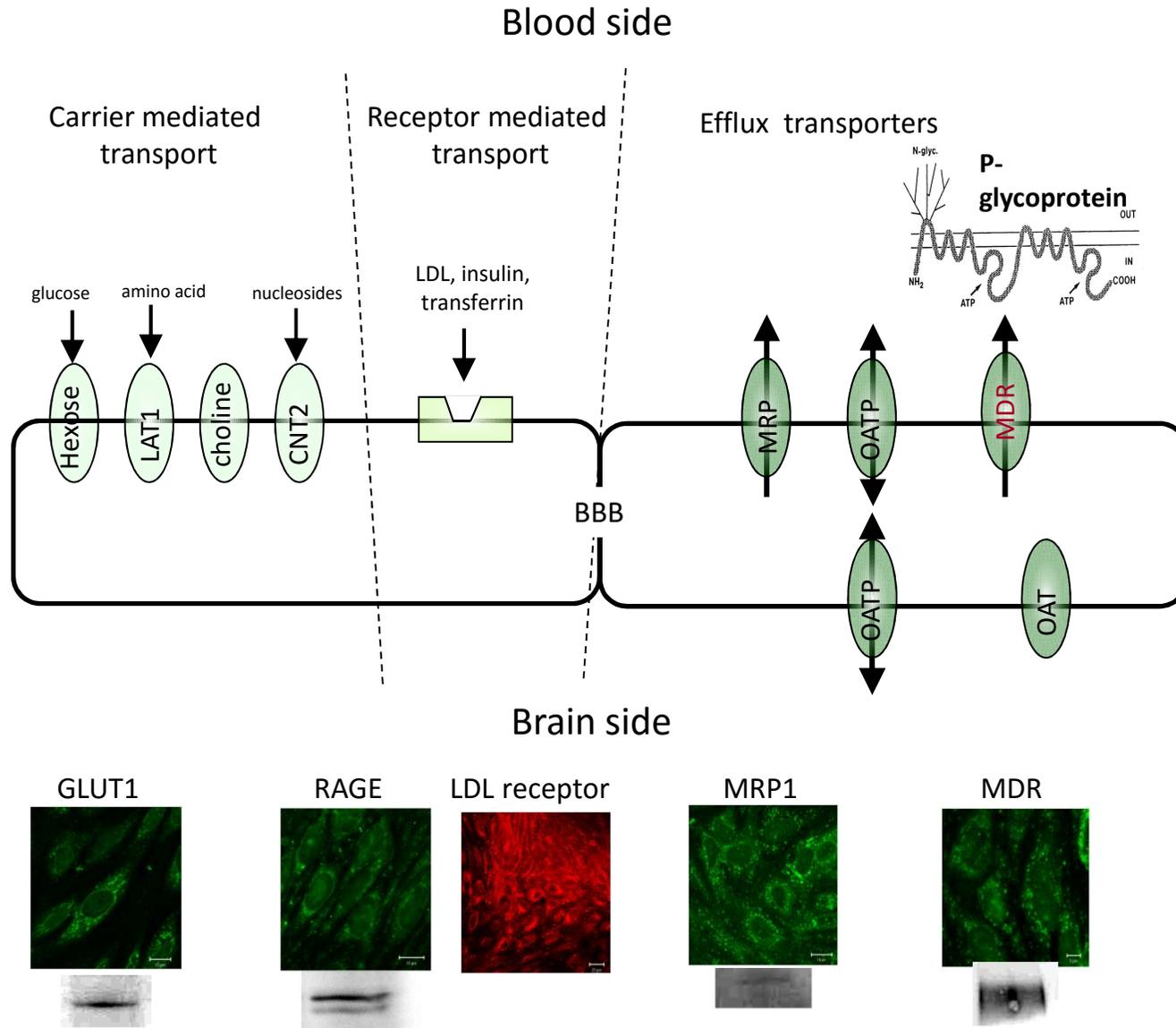
タイトジャンクションタンパク質の発現



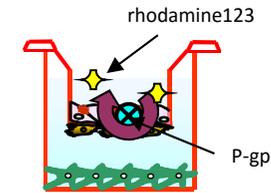


BBB キットの機能検定

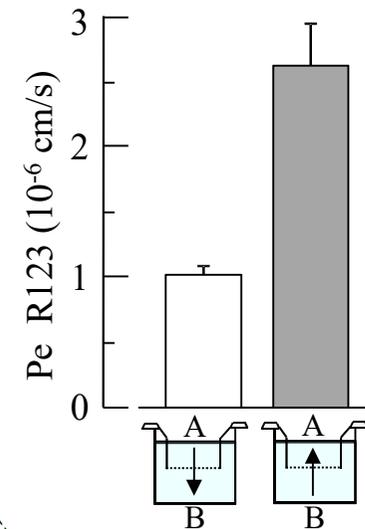
BBB キットにおける輸送担体の発現



くみ出しポンプ (P-糖タンパク)

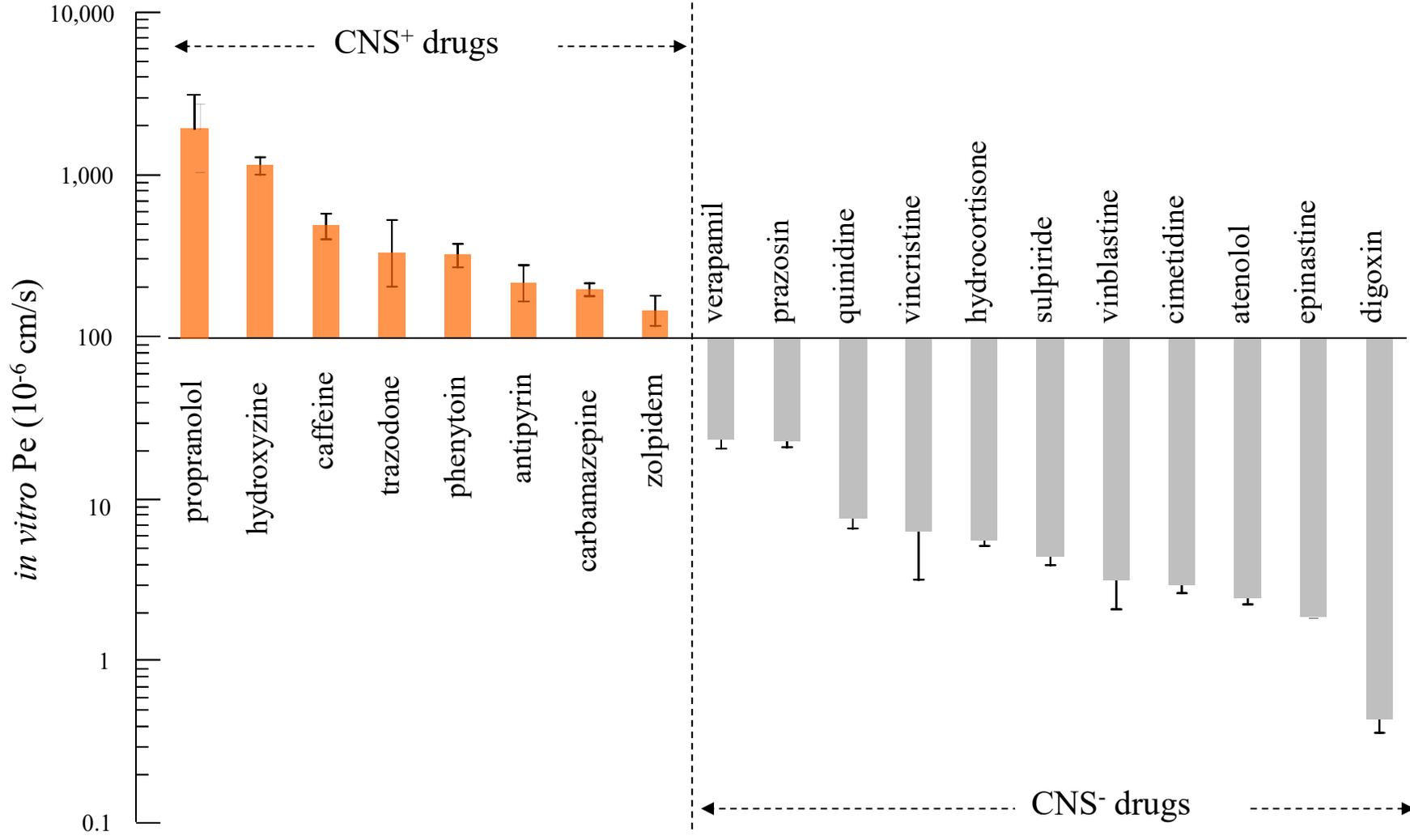


輸送方向性

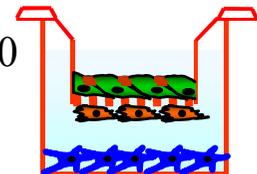
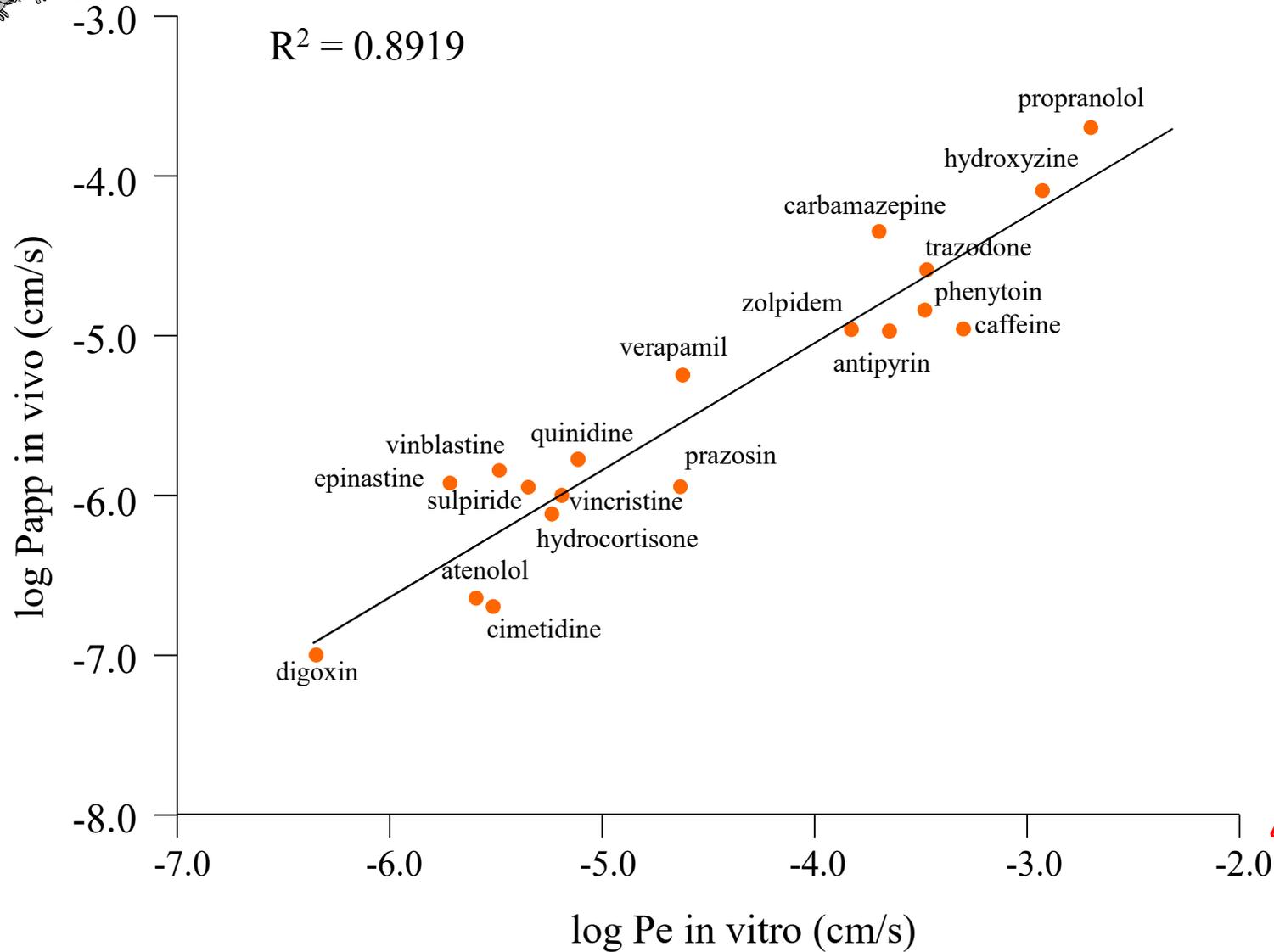




BBBキットによる薬物透過性検定



BBBキットと *in vivo* データの相関





BBBキットによる脳内移行性検定

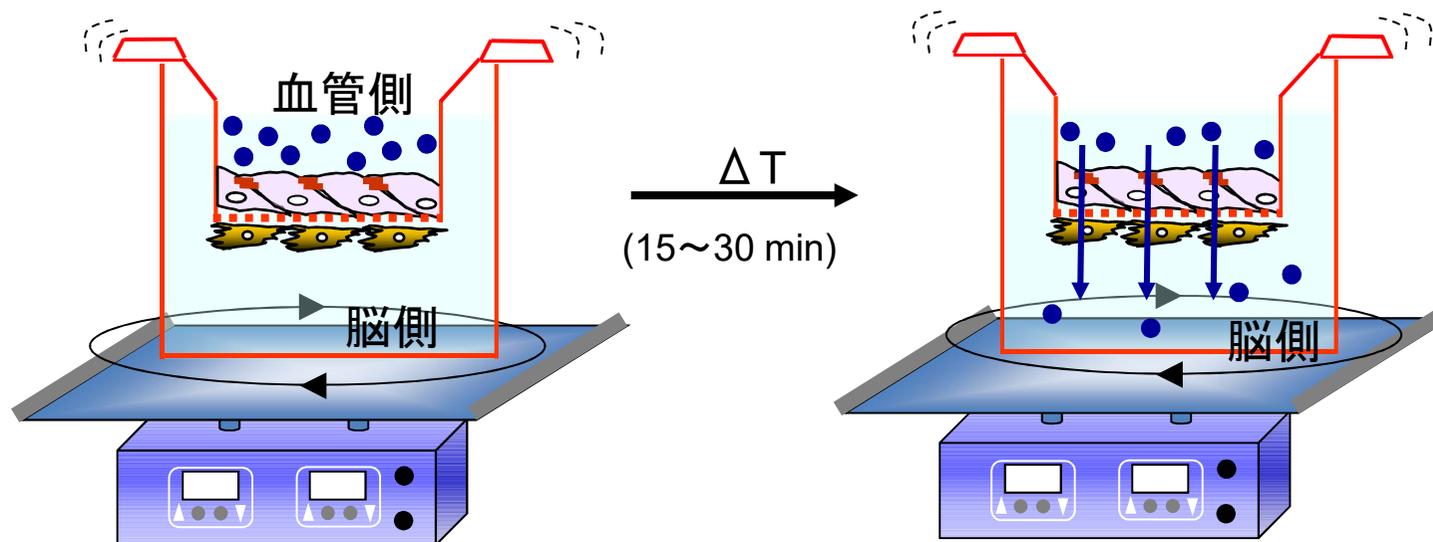
検定に使用するウェルのTEERを測定する。



インサート内側(血管腔側)に化合物を入れる

↓ 一定時間(15~30分)インキュベート

プレートのウェル内(脳実質側)に漏れ出てきた化合物濃度を測定する





薬物脳内移行検定 ~ 条件設定 ~

薬物の透過係数は脳側に漏れ出てきた薬物濃度を測定することで算出いたします。
濃度測定方法の検出下限を考慮し、以下の5点について検討します。

■ 添加する化合物の濃度

- ・細胞障害性がでない濃度で検定する
- ・トランスポーターの基質の場合、飽和に注意する
 - ※当社では1 μ M以下での検定を目安としています
- ・検定後の化合物定量方法の検討(特異性、検出限界)

■ 添加する化合物の培養器材への非特異的吸着

- ・脂溶性の高い物質は非特異的吸着が起こりやすい
- ・事前にブランクでの移行性試験を実施し、回収率を確認する

■ 有機溶媒濃度(化合物が有機溶媒に溶解している場合)

- ・有機溶媒(DMSO, EtOHなど)の最終濃度は0.5%以下

■ 検定時間

- ・15分~30分程度(単純なバッファー(DPBS-H)の場合)
- ・複数のタイムポイントで検定することが理想

■ assay buffer

- ・DPBS-H, Ringer-Hepes, DMEM, DMEM/F12, RBEC培養液...
- ・単純なバッファーほど検定時間を短くする必要がある



回収率の算出

被検物質の培養器材(プレート、インサート膜等)への吸着性を回収率で判定する。

細胞を播種していないblankインサートを用いて、5分間の脳内移行性試験を実施する。

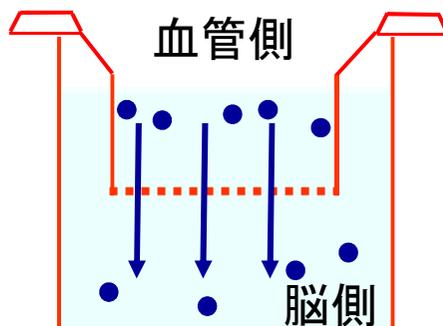


インサート内側(血管腔側)、プレートウェル側(脳側)からサンプルを回収し、被検物質の定量を行う。



回収率を算出する。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{(\text{試験後血管側濃度}) \times (\text{血管側液量}) + (\text{試験後脳側濃度}) \times (\text{脳側液量})}{(\text{血管側投与濃度}) \times (\text{血管側液量})}$$

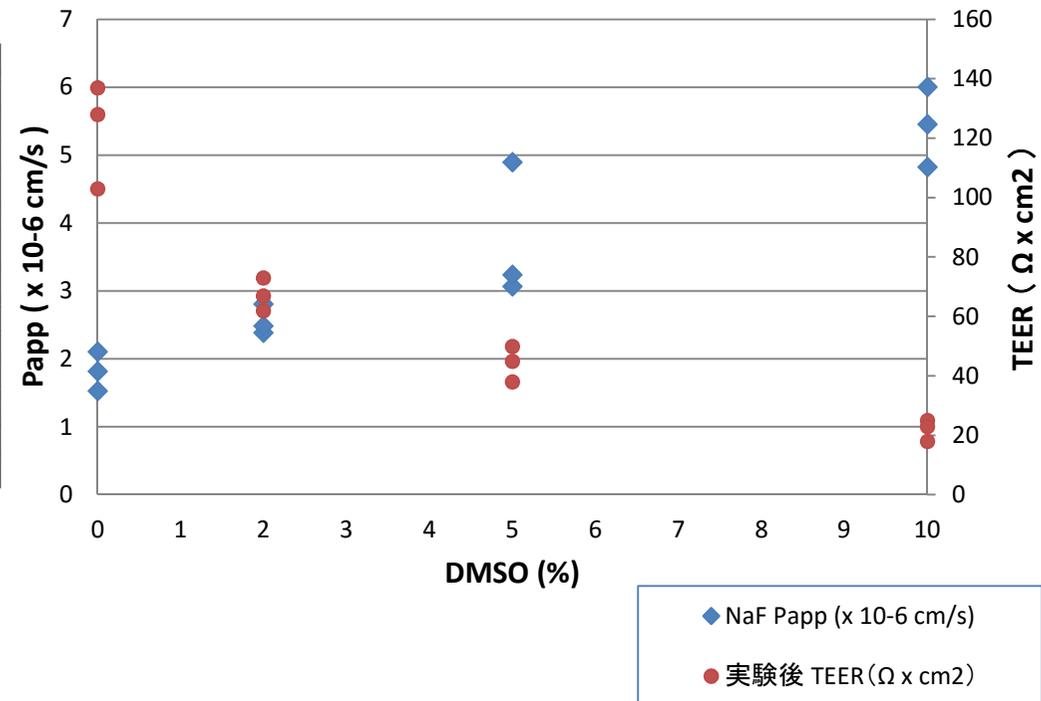


回収率60%以上であれば、
BBBキット™での脳内移行性評価が可能



薬物脳内移行検定 ~ 溶媒の影響 ~

| DMSO(%) | NaF Papp (x10 ⁻⁶ cm/s) | TEER(Ω xcm ²) | |
|---------|--------------------------------------|---------------------------|-------|
| | | before | after |
| 0 | 1.53 | 363 | 137 |
| | 1.82 | 479 | 128 |
| | 2.11 | 482 | 103 |
| 2 | 2.39 | 508 | 62 |
| | 2.49 | 574 | 67 |
| | 2.81 | 554 | 73 |
| 5 | 3.07 | 644 | 45 |
| | 4.90 | 640 | 38 |
| | 3.24 | 647 | 50 |
| 10 | 6.01 | 422 | 18 |
| | 5.46 | 505 | 25 |
| | 4.83 | 525 | 23 |



脳内にほとんど移行しないNaFを、各濃度のDMSOが含まれるアッセイバッファーで希釈して脳内移行性試験を行った。

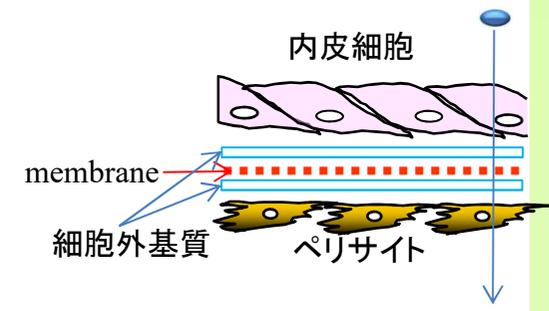
DMSO濃度依存的にNaFのPappが上昇し、実験後のTEERも低下する傾向が確認された。



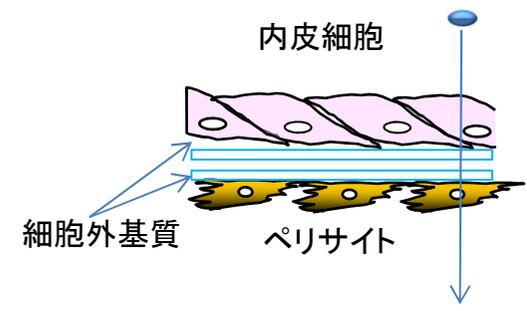
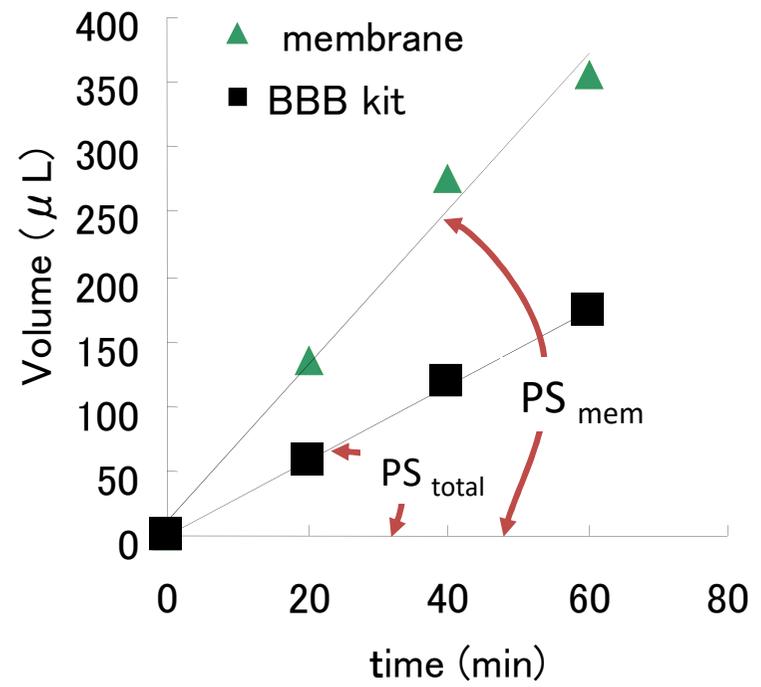
透過係数の算出方法

1. P_{app} ; 細胞(内皮細胞とペリサイト)とインサートmembrane、collagenなどの細胞外基質の合計

$$P_{app} \text{ (cm/min)} = \frac{V_A}{A \times [C]_{Luminal}} \times \frac{\Delta[C]_{Abluminal}}{\Delta t}$$



2. P_e ; 計算式により、インサートmembraneのバリアー機能を差し引き、細胞と細胞外基質の透過係数を算出



$$\frac{1}{PS_e} = \frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{mem}}$$

$$P_e \text{ (cm/min)} = \frac{PS_e \text{ (}\mu\text{L/min)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$



弊社提供ExcelシートでのPapp算出

| | | | |
|------------|-------|-------------------------------|------------|
| | (min) | | (μ M) |
| total time | 30 | initial luminal concentration | 1 |

Enter total time

Must be same unit !
(μ M, nM, mg/mL....)

Enter concentration of test compound added

BBB kit Papp

| 24 well type BBB Kit | abluminal conc. (μ M) | Papp (cm/min) | Papp (10^{-6} cm/s) |
|----------------------|----------------------------|---------------|------------------------|
| 1 | 0.010 | 0.000909 | 15.152 |
| 2 | 0.020 | 0.001818 | 30.303 |
| 3 | 0.020 | 0.001818 | 30.303 |
| mean | 0.0167 | 0.0015 | |
| SD | 0.0019 | 0.0005 | 8.7477 |
| SE | 0.0011 | 0.0003 | 5.0505 |

Enter measured concentrations

$$= 0.9 * C30 / 0.33 / \$C\$19 / \$F\$19$$

abluminal volume

abluminal concentration at total time

area of membrane

luminal concentration of

Total time (min)



透過係数と脳内移行性・実際の濃度

| | Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s) | Permeability | Compounds |
|-------------------|----------------------------------|--|------------------------------------|
| Permeability ↑ | > 20 | Very good. Easy to pass through the BBB by passive diffusion. | Antipyrine Caffeine |
| | 10 ~ 20 | Good. Can pass through the BBB. | |
| | 2 ~ 10 | Low. Can pass through the BBB, but extremely small amount. | NaF |
| | < 2 | Very low. Can not pass though the BBB basically. | Albumin Sucrose Cyclosporine |

[アッセイ時間30分、化合物添加濃度1 μ Mで検定の場合]
 検定後の脳側バッファー(900 μ L)中の化合物濃度は、

Papp 20×10^{-6} cm/s の物質で13 nM

1 nM程度を特異的に検出できる定量方法が必要！



長時間透過性試験用のバッファー

- 1) **DPBS-Hバッファー + 500 nM Hydrocortisone**
通常のアッセイバッファーにTJ強化に働くHydrocortisone (500 nM)を添加する。HEPESを倍量添加し、20 mMとしてもよい。
- 2) **DMEM/F-12 + 500 nM Hydrocortisone**
通常のアッセイバッファーよりも細胞へのダメージが少ない。
アミノ酸等の成分が被検物質の輸送に競合しない場合や、アッセイ後の被検物質定量に支障が無い場合に有効。
- 3) **BBBキット™培養液**
最も細胞への負荷が少ない。血清成分やbFGF等の因子が含まれるため、これらが被検物質の輸送に競合しない場合や、アッセイ後の被検物質定量に支障が無い場合に有効。
- 4) **cAMPアナログとPDE阻害剤添加**
TJタンパク質の発現を促進し、TJ維持に作用する。
細胞内シグナル解析を行う場合は適用できない。
250 μ M 8-CPT-cAMP, 17.5 μ M RO-20-1724 (PDE阻害剤)



移行性試験以外のBBBキット™活用法

1. タイトジャンクション調節因子のスクリーニング

- ・候補物質をBBBキット™に添加し、バリア機能の指標となるTEER（経内皮電気抵抗値）測定によって非侵襲的にタイトジャンクション調節に機能する分子を選別する。
- ・タイトジャンクションを強化する分子の探索
- ・タイトジャンクションを一過性に調節する分子の探索（DDS）

2. 細胞の脳内浸潤能力の評価

- ・癌組織から細胞を分離し、脳へ転移する可能性を予測
- ・癌の脳転移メカニズム解明、転移抑制薬の開発
- ・免疫細胞の脳内浸潤評価

3. BBB保護薬の開発

- ・脳梗塞等で障害を受けたBBBの機能を回復する薬剤の開発

4. BBB関連疾患の基礎解析

- ・治療標的分子の探索