

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590144

研究課題名（和文）新規ヒト血液脳関門細胞株を用いた中枢治療薬の脳移行性予測

研究課題名（英文）Prediction of the human brain distribution for the central nervous system drugs using a novel human immortalized brain capillary endothelial cells.

## 研究代表者

出口 芳春 (DEGUCHI YOSHIHARU)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40254255

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト血液脳関門(BBB)の輸送機能に基いて薬物の脳移行性を予測することは、新規中枢治療薬の開発および薬物治療にとって重要な課題である。本研究の目的はヒトBBBの不死化細胞株(D3細胞)を用いて、ヒトBBBの特性および薬物輸送機能を解明し、中枢治療薬のヒト脳移行性を予測することである。本研究の成果として、D3細胞におけるカチオントランスポーター分子(OCTN2, OCTN1, PMAT)およびプロトン/有機カチオン交換輸送系の高発現が明らかになった。さらに、D3細胞で得られるin vitroの結果からヒト脳移行性を予測する1つの方法論が確立できた。

## 研究成果の概要（英文）：

Prediction of the brain distribution of drugs, based on the transport function of the human blood-brain barrier (BBB), is important for not only development of new central nervous system (CNS)-acting drugs, but also pharmacotherapy for CNS diseases. The purpose of this study is to clarify the functional expression of cation transporters using human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3 (D3), an in vitro model. The study was also investigated whether or not the results of in vitro uptake study using D3 cells can be extrapolated to human BBB. In this study, it was found that cationic transporters (OCTN2, OCTN1, PMAT and H<sup>+</sup>/organic cation antiporter) are functionally expressed in D3 cells. Further, a method can be established for extrapolating brain distribution of the CNS-acting drugs in human from the in vitro data using D3 cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：血液脳関門、ヒト細胞株、トランスポーター、カチオン性薬物、脳移行性、遺伝子解析、スケールアップ

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来と社会構造の複雑化に伴い、アルツハイマー病を代表とする中枢疾患患者が増加している。中枢治療薬が脳内で薬効を發揮するための第一関門は血液脳関門(BBB)透過過程である。薬物の脳-血液間の移行はこのBBB透過過程によって制御されている。マウスやラットなどの動物のBBB研究は進展しつつあるが、ヒトBBBについてはほとんど明らかでない。多くの実験的エビデンスに基づいて、ヒトにおける薬物脳移行性を予測することは優れた中枢治療薬の開発と治療法の確立にとって重要である。

ヒトBBBの研究が遅れた最大の原因はヒト脳組織の入手が困難なためである。最近、フランス・コシヤン研究所のCouraud博士(研究協力者)らによって、ヒトの脳毛細血管内皮細胞の性質を再現する優れた不死化細胞株(D3細胞)が樹立された(FASEB J., 19, 1872(2005))。動物由来の脳毛細血管不死化内皮細胞に比べ、この細胞はタイトジャンクションの形成能に優れている(J. Cereb. Blood Flow Metab. 28, 312-328(2008))。また、内皮細胞特有のタンパク質の発現に加え、栄養物質を脳に供給するトランスポータータンパク質(GLUT1, MCT1, LAT1)、タイトジャンクションタンパク質(Claudine 5, Occludin, ZO1)、トランスポーター(MDR1/ABCB1, BCRP/ABCG2, MRP4/ABCC4)の遺伝子発現が確認されている。従って、D3細胞をヒト血液脳関門のin vitroモデルとして用いることにより、ヒトにおける中枢治療薬の脳移行性が予測できる可能性が高い。

中枢治療薬の多くはカチオン性薬物である。これまでに本研究代表者らのグループは、いくつかのカチオン性薬物のBBB透過が単純拡散機構のみでは説明できず、トランスポーターを想定しなければ説明できないことを報告してきた。この輸送は、プロトンとの交換輸送によって血液から脳への取り込みを積極的に促進し、かつ広範なカチオン性薬物を認識する。分子の実体を特定するに至っていないが、同様の輸送特性を持つトランスポーターがヒトのBBBでも機能し、カチオン性中枢治療薬の脳移行に重要な役割を担っていると考えられる。本研究によって、その存在が明らかとなれば、中枢治療薬の開発と治療法確立のボトルネックを解消する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「新規ヒトBBBの不死化細胞株(D3細胞)を用いて、カチオン性中枢治療薬のBBB透過機構を解明し、ヒトにおける脳移行性を予測する方法論を確立すること」であった。そのために、1) D3細胞におけるカチオン性薬物の輸送を特徴づけることに加え、2) 有機カチオントランスポー

ターの発現を定量的PCRおよびRNAiライブラリー法を用いて明らかにする。3) D3細胞における有機カチオントランスポーターの発現プロファイル、輸送特性、およびin vitroとin vivoの相関関係、動物からヒトへのスケールアップ因子、薬物の物性を含めたin silico数理モデルを構築し、広範なカチオン性薬物に適用可能な脳移行性予測法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) BBB細胞における遺伝子発現解析

ラット脳毛細血管内皮細胞不死化細胞株(TR-BBB13細胞)並びにヒト脳毛細血管内皮細胞不死化細胞株(D3細胞)を用い、既に分子が特定されている有機カチオントランスポーター(OCTs, OCTNs, MATEs, ENTs, PMAT, CTLs, CHT, NET, DAT, SERT, VThTrs, VMATs, VACht, NHEs)の遺伝子発現をSYBR greenを用いた定量的PCR法で行った。

### 2) In vitro BBB輸送機能解析

TR-BBB13およびD3細胞を用い、上記トランスポーターのうち遺伝子発現量の高いものについて、その選択的基質を用いて輸送機能を解析した。輸送実験は、ディッシュ法による取り込み実験を行った。輸送機能は濃度依存性、時間依存性、相互阻害、駆動力、エネルギー依存性について検討し、輸送特性を明らかにする。選択的基質および薬物の定量は、アイソトープ化合物を用いた。

### 3) RNAiライブラリー法を用いた輸送機能の評価

319種類のSLCトランスポーターのうち、有機カチオン輸送に関与すると考えられる35種類のトランスポーターのRNAiライブラリーを構築した(Endocrinology, 150, 1991-1999(2009))。このうち、D3細胞に高発現するトランスポーターについて、siRNA導入による遺伝子発現抑制条件下で輸送機能解析を行った。

### 4) D3細胞における薬物輸送機能評価

カチオン性中枢治療薬のモデル薬物としてオキシコドン、 $^3\text{H}$ ピリラミン、ジフェンヒドラミンを用い、D3細胞における輸送特性を明らかにした。

### 5) In vitro - in vivo相関

BBB透過性についてのin vivo - in vitro相関を明らかにするため、まず、モデルカチオン性薬物のBBB透過性をラットにおいて評価した。実験はin situ脳還流法、脳マイクロダイアリシス法を用いた。一方で、TR-BBB13細胞を用いてモデルカチオン性薬物のin vitro BBB取り込みクリアランスを求めた。以上の結果に基づいてin vitro-in vivo相関を定量的に解析した。

### 6) ヒトにおける薬物の脳移行性の予測

5)で明らかにしたin vitro-in vivo相関

をヒトにスケールアップし、D3細胞の結果からヒト脳移行性を予測する方法論について検討し、実測報告値と照合した。

#### 4. 研究成果

##### 1) BBB細胞におけるトランスポーター発現解析

D3細胞および比較対象としてTR-BBB13細胞における有機カチオントランスポーターの遺伝子発現を定量的PCRにて解析した。その結果、D3細胞においてはOCTN1およびOCTN2、PMATの発現が他の有機カチオントランスポーターに比べ高い値を示した。D3細胞での発現量はTR-BBB13細胞に比べて低いものの、発現パターンは両細胞で同様であった。

##### 2) *In vitro* BBB輸送解析

1)で発現量の高かったOCTN2およびPMATについて、それぞれの特異的基質であるL-カルニチンおよび1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)を用いて輸送活性を検討した。結果、D3細胞における特異的基質の輸送特性はラットの細胞と同様であり、高い輸送活性を持つことがわかった。

以上の結果から、ヒトBBBのモデル細胞であるD3細胞には有機カチオントランスポーターが発現しており、輸送機能を併せ持つことを明らかにすることができた。これは世界で初めての結果である。

##### 3) RNAiライブラリー法を用いた輸送機能の評価

蛍光標識siRNAを用いた検討からlipofectamine RNAiMAXを用いることによりRNAiをD3細胞へ十分に導入できることがわかった。D3細胞において発現量が高かったOCTN1, OCTN2, PMAT, CTL1, CTL2についてsiRNA導入による遺伝子発現抑制効率を検討した。その結果、これらトランスポーター遺伝子の発現は約85-90%まで抑制されることがわかった、以上の結果から、D3にはOCTN1, OCTN2, PMAT, CTL1, CTL2が多く発現しており、カチオン性薬物の輸送に関連している可能性が示唆された。

##### 4) D3細胞における薬物輸送機能評価

カチオン性薬物のうち生理的pHでカチオン化しているオキシコドン、ピリラミン、ジフェンヒドラミンおよびオランザピンについて*in vivo*における血液脳関門透過クリアランス並びに脳への移行機構を検討した結果、これらの薬物は脳細胞間液中遊離形濃度は血漿中遊離形濃度より高く、比較的速やかに脳内に移行していることがわかった。さらに、D3細胞における詳細な輸送解析の結果、これらの薬物はD3細胞においても細胞内外のプロトン勾配を駆動力とする交換輸送によって

エネルギー依存的に細胞内に取り込まれていることがわかった。すなわち、D3細胞には分子実体不明であるものの、カチオン性薬物の脳移行にとって鍵となるH<sup>+</sup>/organic cation antiporterが発現していることがわかった。

##### 5) *In vitro* - *in vivo* 相関

*In vitro* - *in vivo* 相関を明らかにするために、脳毛細血管表面積、血流（還流）速度、タンパク結合率、輸送体に対する親和性などのパラメータを組み込んだ生理学的モデルを構築した。この生理学的モデルで*in vitro*から*in vivo*へのスケールアップを行った結果、少なくともオキシコドン、ピリラミン、ジフェンヒドラミンの3つのカチオン性薬物について予測値と実測値が良く一致した。

##### 6) 薬物のヒト脳移行性の予測

5)の結果を踏まえ、D3細胞で求めたピリラミンの取り込みクリアランスを生理学的モデルを用いてヒトに予測した。その結果はPETで求めた報告値とほぼ一致した。

以上、研究成果として、新規ヒトBBBの不死化細胞株（D3細胞）にカチオントランスポーター分子（OCTN2, OCTN1, PMAT）およびプロトン/有機カチオン交換輸送系が機能的に発現していることがわかった。さらに、ヒトにおける脳移行性を予測する1つの方法論を確立することができた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Fujii S, Deguchi Y, et al., Characterization of the carrier-mediated transport of ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in rabbit cornea epithelium cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **65**, 171 - 180 (2013).
- 2) Shimomura K, Okura T, Deguchi Y, et al., Functional expression of a proton-coupled organic cation (H<sup>+</sup>/OC) antiporter in human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3, a human blood-brain barrier model. *Fluids. Barrier. CNS*, **10:8**, 1 - 10 (2013).
- 3) Maeda Y and Deguchi Y et al, Measurement of glomerular filtration rate by rapid intravenous injection of a newly developed insulin fraction. *J. Rural Med.*, **6**, 9 - 15 (2011).
- 4) Deguchi Y, The blood-brain barrier as a focus of drug metabolism and Pharmacokinetics. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **26**, 1, (2011).
- 5) Okura T and Deguchi Y et al, Functional characterization of rat plasma membrane monoamine transporter in the blood-

brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Pharm. Sci.* **100**, 3923 - 3938 (2011).

- 6) Sadiq, MW and Deguchi Y et al. Diphenhydramine active uptake at the blood-brain barrier and its interaction with oxycodone in vitro and in vivo, *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3912 - 3923 (2011).
- 7) Okura T, and Deguchi Y, et al. Drug-drug interaction between oxycodone and adjuvant analgesics in blood-brain barrier and antinociceptive effect. *J. Pharm. Sci.*, **99**, 467 - 474 (2010).

[学会発表] (計 13 件)

- 1) 富岡直子、出口芳春ら：尿酸トランスポーターURAT1 の脳内局在解析、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日-30 日 (横浜)
- 2) 黄倉 崇、樋口 慧、出口芳春ら：ヒト脳毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 を用いたカチオン性薬物のヒト血液脳関門透過性予測の試み、日本動物実験代替学会第 25 回大会、2012 年 12 月 8 日-9 日 (東京)
- 3) Okura T and Deguchi Y: Investigation of the organic cation/carnitine transporter in human brain endothelial cells by small interfering RNA. 第 27 回日本薬物動態学会、2012 年 11 月 20 日-22 日 (東京)
- 4) 呉 春勇、楠原洋之、出口芳春、杉山雄一：In vitro 試験に基いたヒト脳 D2 受容体占有率の予測、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24-27 日 (神戸)
- 5) 黄倉 崇、加藤清香、出口芳春：ヒト脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3) を用いた有機カチオン/カルニチントランスポーターの機能解析、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24-27 日 (神戸)
- 6) Deguchi Y, et al. : The existence of H<sup>+</sup>-coupled organic cation antiporter (the pyrilamine transporter) at the *in vitro* human blood-brain barrier cells. 薬物動態国際シンポジウム、2012 年 1 月 16-18 日 (東京)
- 7) Deguchi Y, et al. : Diphenhydramine active uptake at the blood-brain barrier and its interaction with oxycodone in vitro and in vivo. Asian Federation of Pharmaceutical Science 2011, 2011 年 12 月 9-12 日 (Kuala Lumpur)
- 8) Sayaka K, Deguchi Y, et al. : Localization and functional roles of organic cation/carnitine transporter at the blood-brain barrier, 第 26 回日本薬物動態学会年会、2011 年 11 月 16-18 日

(広島)

- 9) 黄倉 崇、出口芳春ら：RNA 干渉法を用いたヒト血液脳関門細胞で機能する有機カチオン輸送体の探索、第 6 回トランスポーター研究会、2011 年 6 月 11-12 日 (仙台)
- 10) 森本理代、出口芳春ら：脳関門システムにおけるカチオントランスポーターの局在解析、日本薬剤学会第 26 年会、2011 年 5 月 29-31 日 (東京)
- 11) 黄倉 崇、出口芳春ら：RNA 干渉法を用いたヒト血液脳関門細胞における有機カチオン輸送体の機能解析、日本薬剤学会第 26 年会、2011 年 5 月 29-31 日 (東京)
- 12) 黄倉崇、出口芳春ら：ヒト血液脳関門細胞における有機カチオン関連トランスポーターの発現と機能、日本薬学会 131 年会、2011 年 3 月 29 日 (静岡)
- 13) 森本理代、出口芳春ら：マウス血液脳関門およびグリア細胞におけるカチオントランスポーターの局在解析、日本薬学会 131 年会、2011 年 3 月 29 日 (静岡)

[図書] (計 2 件)

- 1) 出口芳春、遺伝子医学 MOOK 別冊 -ペプチド・タンパク性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用、メディカル・ドゥ、7 (総 280) (2011)
- 2) 出口芳春、コンパス生物薬剤学 (脳への移行、胎児への移行と胎盤関門)、南江堂、62 - 67 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/dotai/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出口 芳春 (DEGUCHI YOSHIHARU)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：40254255

### (2) 研究分担者

黄倉 崇 (OKURA TAKASHI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：80326123

加藤清香 (KATO SAYAKA) (H22 - H23)

帝京大学・薬学部・助教 (退職)

研究者番号：70505940

樋口 慧 (HIGUCHI KEI) (H24)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10625304

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：