

令和元年6月7日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05110

研究課題名(和文)ドラッグリポジショニングによる網膜関門輸送を利用した網膜疾患治療薬開発の基盤構築

研究課題名(英文)The foundation of developing drugs for retinal diseases by pharmaceutical drug-repositioning screening based on the distribution manner via the blood-retinal barrier

研究代表者

細谷 健一 (Hosoya, Ken-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70301033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が見出してきた知見に基づき、動態学的評価を起点として創薬の実現のための基盤構築」を目的とする。薬物の輸送を精査するための蛍光団導入について、モデル化合物であるシアノコバラミンを用いた検討にて、導入の最適化が完了した。申請者が見出している血液網膜関門新規ペラパミル輸送機構に対し認識性を示し、網膜疾患治療に対し有望性を示す薬物として、2-3種のヒット化合物が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒット薬物について、本報告書提出時点にて追加での薬理学的・薬物動態学的な評価を継続している。本評価が完了することで、革新的な網膜疾患治療薬が世に出るものと期待される。また、その薬物について治療標的を発見するための実験系構築に向けた各種検討結果も成果として挙げており、今後の創薬に向けた基礎の一部を本課題は築いたと言える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish the foundation of retinal drug discovery based on the cationic drug transport systems at the blood-retinal barrier. To evaluate the transport of drugs as candidates for the use of retinal diseases, the labeling reaction of cyanocobalamin, a model compound, with a fluorescent substrate was tested. Since receptor-mediated transcytosis manner of fluorescent cyanocobalamin was observed, it is indicated that the optimization of this labeling reaction with a fluorescent substrate is completed. Through the pharmaceutical drug-repositioning screening, several kinds of candidates for the treatment of retinal diseases were discovered. We continue to perform the pharmacological and pharmaceutical studies to judge whether these drugs could be applied for the retinal diseases.

研究分野：医療系薬学、薬物動態学、網膜疾患創薬学

キーワード：血液網膜関門 カチオン性薬物輸送 薬物輸送担体 内側血液網膜関門 ドラッグリポジショニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜は「視覚(見る)」を司る神経組織であり、個体各々の活動に枢要な役割を担っている。重篤な網膜疾患は視覚障害や失明に繋がり、患者のQOL (quality of life) を著しく低下させることとなる。特に、視覚障害者の半数以上は40代以上の中途視覚障害者であることが明らかとなっており、その主要な原因疾患である糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症、緑内障、網膜色素変性症に関しては、加齢や生活習慣が重大な発症リスクとなることが広く知られている。高齢化が急速に進行している我が国では今後、視覚障害者の増加が予測され、この対応に介護医療やインフラの増強に多額の国費を要する危険が考えられることから、安全性と有効性を兼ね備えた網膜疾患治療薬の開発は重要な社会的課題の1つと位置付けられる。現在の網膜疾患治療には外科治療と薬物治療が知られるが、いずれの治療満足度は高くはない。特に薬物療法に関しては、網膜疾患治療に有効な創薬標的が報告されているものの、網膜が眼球最後部に位置する組織であるため、既存の薬物投与方法(眼球内部への直接投与や点眼など)では安全性と効率性を両立できない。このアンメットメディカルニーズに応えるためには、動態学的観点からのアプローチ、即ち薬理効果として有望な薬物を効率的に網膜へと到達させるという、従来と異なる投与方法や送達法を組込んだ新規規格の網膜疾患治療薬の創成が期待され、その実現に向けた基盤構築は必須の課題である。

血液網膜関門は網膜と循環血液を隔離するバリア組織であり、網膜毛細血管内皮細胞から形成される内側血液網膜関門と、網膜色素上皮細胞から形成される外側血液網膜関門から構成される。申請者は、血液網膜関門の物質輸送機構とその分子実体である機能性タンパク質・トランスポーターに着目し、網膜への物質輸送に関する生理的知見を開拓するとともに、『飲む目薬；血液網膜関門の物質輸送機構を応用した網膜への薬物送達』という進取のコンセプトの確立と普及に努めてきた。研究代表者は、網膜疾患治療薬の開発における血液網膜関門機能の利用に向けた研究を継続的に展開した結果、血液網膜関門に存在する新規カチオン性薬物輸送機構を見出し、以下の知見を明らかとした。

内側血液網膜関門にはカチオン性薬物輸送機構が複数存在し、その代表的機構としてペラパミル輸送機構が挙げられる。

カチオン性薬物の細胞内蓄積に関与する因子としてリソソーム内への集積が知られているが、可視化解析の結果、ペラパミル輸送への本集積機構の関与は示されず、形質膜に存在するペラパミル輸送機構がBRBを介した網膜への薬物移行に関与する可能性は非常に高い。ペラパミルは排出輸送担体P-gpの基質としても知られているが、BRBにおけるP-gp活性は循環血液と脳とを隔てる血液脳関門(BBB)のP-gp活性と比して低い。さらに、ペラパミル流入機構はBRBに存在し、BBBに存在しないことが示され、ペラパミル輸送機構は中枢神経組織の中で網膜へと選択的に薬物を送達する上で有用であることが見出された。

血液網膜関門のカチオン性薬物輸送機構は、カチオン性薬物であるメマンチンやクロニジンなどと相互作用することが示されている。これら薬物は、網膜疾患治療に有用な神経保護作用を有する。

以上の4点から、血液網膜関門カチオン性薬物輸送機構が、神経保護作用薬などの網膜疾患治療薬を網膜選択的に送達できる輸送機構であることが示されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、1.項記載の研究代表者が見出してきた知見に基づき、「創薬の確実な実現と弛まない持続のための基盤構築」を目的とする。具体的には、血液網膜関門に存在するカチオン性薬物輸送機構は網膜疾患治療薬認識性であることから、ドラッグリポジショニングスクリーニングを含めた既存薬の適応拡大が期待される網膜疾患治療薬候補化合物を見出す。そして、生体内挙動などの検証による、既存医薬品の適応拡大に加え、新たに網膜疾患治療薬を創生する際の創薬基盤を構築に向けた指針を提案する。

### 3. 研究の方法

#### (1) TR-iBRB2 細胞培養および輸送解析

ラット BRB 実体細胞である網膜毛細血管内皮細胞の条件的不死化細胞株 (TR-iBRB2 細胞) を用いた輸送解析を実施した (*Exp. Eye Res.*, 72, 163-72 (2001))。コラーゲン I でコーティングした 24-well 細胞培養プレートに TR-iBRB2 細胞を播種し、指定時間培養後、細胞表面を生理 buffer (ECF buffer) で 3 回洗浄後、対象化合物をアプライした。指定時間経過後、細胞表面を ECF buffer で洗浄後、細胞を可溶化し、細胞への化合物蓄積量を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) シアノコバラミン蛍光標識化および血液網膜関門透過性評価

リポジヨニング有望化合物と判断される化合物の蛍光標識化とそれを用いた輸送解析に向け、モデル化合物としてシアノコバラミンを、蛍光団としての導入を検討している Cy5 と有機的に結合させ、輸送解析を行った。Cy5-シアノコバラミンは、内在時に co-factor となる transcobalamin 共存下、TR-iBRB2 細胞に取り込まれ、各種阻害解析から受容体介在エンドサイトーシスの様式を示した。シアノコバラミンはエンドサイトーシス様式にて取り込まれることが他の組織細胞においても示唆されていることから、Cy5-シアノコバラミン-transcobalamin 複合体は、内側血液網膜関門においてエンドサイトーシスされることが示唆された。

また、取り込み実験後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、細胞内にて dot 状の様式にて観察された。この分布パターンについて、蛍光団標識 verapamil との比較も並べて実施したところ、パターンの差異が観察された。本結果から、観察された蛍光は導入に用いた蛍光団や TR-iBRB2 細胞における自家蛍光に依存しないこと、即ち用いた蛍光団ラベリング反応について適切であることが示唆された。

##### (2) 内側血液網膜関門 verapamil 認識型薬物スクリーニング

内側血液網膜関門ベラパミル輸送機構認識型薬物特定に向け、TR-iBRB2 細胞<sup>[3H]</sup>ベラパミル輸送に対する阻害効果を指標にスクリーニング解析を行った。まず、既存薬として各種中枢神経系疾患治療薬を対象として解析では、抗うつ薬やパーキンソン病治療薬、アルツハイマー病治療薬の一部がヒットした。また、東京大学創薬機構保有の化合物ライブラリーを用いたスクリーニング解析の結果、知られている薬理効果も想定すると 2-3 化合物がヒットした。令和元年現在、inner BRB 輸送解析と並べて、in vitro 神経細胞培養系を活用し、ヒット化合物の細胞死抑制効果についての解析を計画しており、本ヒット化合物が網膜疾患への適応拡大が有望であるかを明らかにする計画である。

##### (3) 内側血液網膜関門 quinacrine 取り込み解析による、酸性小胞蓄積の関与検証

正味の BRB におけるカチオン性薬物移行を理解する上で、リソソームなどの酸性小胞への濃縮についての理解は必要である。Lysosome を含めた細胞内酸性小胞へ取り込まれる薬物として quinacrine が挙げられる。本化合物の TR-iBRB2 細胞への取り込み NH<sub>4</sub>Cl 処理にて低下すること、カチオン性薬物共存によって阻害されること、などの特性が示された。本特性は、TR-iBRB2 細胞へのベラパミルを含めたカチオン性薬物輸送の特性と類似していた。本結果から、正味の BRB を介したカチオン性薬物の網膜移行を理解する上で、細胞膜トランスポーターに加え、細胞内酸性小胞への濃縮は無視出来ないことが明らかとなった。

##### (4) 薬効発現メカニズム標的の同定に指向した DARTS 解析

薬物-タンパク質相互作用解析法として、drug affinity responsive target stability (DARTS) 法が知られている。本法を用いた、リポジヨニング薬物の薬効発現メカニズム標的の発見を目的とし、試行として、inner BRB と同様に、カチオン性薬物輸送機構の存在が知られている血液脳関門 (BBB) のモデル細胞を標品として、本輸送機構の基質であるニコチンを用いての DARTS を行った。その結果、ニコチンの共存によって「相互作用すること」が示されたタンパク質が SDS-PAGE にてバンドとして検出された。観察されたバンドを回収し、プロテオーム解析を実施したところ、いくつかの候補分子がヒットした。本手法をベースとして、ヒット薬物の inner BRB および網膜神経細胞に存在する薬理・薬剤学的ターゲットを同定する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- (1) Akanuma S., Kida R., Tsuchiyama A., Kubo Y., Hosoya K.; Organic anion-transporting polypeptide 1a4-mediated heterogeneous distribution of sulforhodamine-101 in rat hepatic lobules. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press <査読有り>  
DOI: 10.1016/j.dmpk.2019.04.001
- (2) Tachikawa M., Akanuma S., Imai T., Okayasu S., Tomohiro T., Hatanaka Y., Hosoya K.; Multiple cellular transport and binding processes of unesterified docosahexaenoic acid in outer blood-retinal barrier retinal pigment epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1384-92 (2018) <査読有り>  
DOI: 10.1248/bpb.b18-00185
- (3) Kinoshita Y., Nogami K., Jomura R., Akanuma S., Abe H., Inouye M., Kubo Y., Hosoya K.; Investigation of receptor-mediated cyanocobalamin (Vitamin B12) transport across the inner blood-retinal barrier using fluorescence-labeled cyanocobalamin. *Mol. Pharm.*, 15, 3583-94 (2018) <査読有り> DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00617

- (4) Akanuma S., Yamakoshi A., Sugouchi T., Kubo Y., Hartz A.M.S., Bauer B., Hosoya K.; Role of L-type amino acid transporter 1 at the inner blood-retinal barrier in the blood-to-retina transport of gabapentin. *Mol. Pharm.*, 15, 2327-37 (2018) <査読有り>  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00179
- (5) Kubo Y., Akanuma S., Hosoya K.; Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 14, 513-31 (2018) <査読有り>  
DOI: 10.1080/17425255.2018.1472764
- (6) Kubo Y., Nakazawa A., Akanuma S., Hosoya K.; Blood-to-retina transport of fluorescence-labeled verapamil at the blood-retinal barrier. *Pharm. Res.*, 35:93 (2018) <査読有り>  
DOI: 10.1007/s11095-018-2384-7
- (7) Akanuma S., Higashi H., Maruyama S., Murakami K., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Expression and function of connexin 43 protein in mouse and human retinal pigment epithelial cells as hemichannels and gap junction proteins.; *Exp. Eye Res.*, 168, 128-37 (2018) <査読有り>  
DOI: 10.1016/j.exer.2018.01.016
- (8) Akanuma S., Yamazaki Y., Kubo Y., Hosoya K.; Role of cationic drug-sensitive transport systems at the blood-cerebrospinal fluid barrier in para-tyramine elimination from rat brain.; *Fluids Barriers CNS*, 15:1 (2018) <査読有り> DOI: 10.1186/s12987-017-0087-9
- (9) Kubo Y., Akanuma S., Hosoya K.; Influx transport of cationic drug at the blood-retinal barrier: impact on the retinal delivery of neuroprotectants. *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 1139-45 (2017) <査読有り> DOI: 10.1248/bpb.b17-00090
- (10) Kubo Y., Yamamoto M., Matsunaga K., Usui T., Akanuma S., Hosoya K.; Retina-to-blood transport of 1-methyl-4-phenylpyridinium involves carrier-mediated process at the blood-retinal barrier. *J. Pharm. Sci.*, 106, 2583-91 (2017) <査読有り> DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.028
- (11) Kubo Y., Akanuma S., Hosoya K.; Impact of SLC6A transporters in physiological taurine transport at the blood-retinal barrier and in the liver. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 1903-11 (2016) <査読有り>  
DOI: 10.1248/bpb.b16-00597

〔学会発表〕(計 28 件)

- (1) 韓 明来、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；ラット血液脳関門を介した imipramine 輸送機構解明；日本薬学会第 139 年会；2019 年
- (2) 韓 明来、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；ラット血液脳関門を介した imipramine 輸送機構解明；日本薬学会北陸支部第 130 回例会；2018 年
- (3) Jomura R., Tanno Y., Akanuma S., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Localization of monocarboxylate transporter 12 as a facilitative creatine transporter in rat choroid plexus and retinal pigment epithelium.; 2018 International Meeting on 22<sup>nd</sup> MDO and 33<sup>rd</sup> JSSX; 2018 年
- (4) Kubo Y., Kinoshita Y., Nogami K., Jomura R., Akanuma S., Abe H., Inouye M., Hosoya K.; Study of receptor-mediated cyanocobalamin (vitamin B12) transport at the blood-retinal barrier with Cy5-labeled cyanocobalamin.; 2018 International Meeting on 22<sup>nd</sup> MDO and 33<sup>rd</sup> JSSX; 2018 年
- (5) Han M., Akanuma S., Kubo Y., Hosoya K.; Characteristics of imipramine transport at the blood-brain barrier.; The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2018 年
- (6) Jomura R., Tanno Y., Akanuma S., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Expression and localization of creatine synthesizing enzyme and monocarboxylate transporter 12 in rat brain and retina.; The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2018 年
- (7) 細谷 健一、山崎 雄平、手賀 悠真、赤沼 伸乙、久保 義行；血液脳関門 nicotine インフラックス輸送系への中樞神経系疾患治療薬認識性；日本薬剤学会 第 33 年会；2018 年
- (8) 粉川 紗季、久保 義行、赤沼 伸乙、細谷 健一；内側血液網膜関門カチオン性薬物輸送に対する酸性小胞内蓄積機構の寄与；日本薬学会第 138 年会；2018 年
- (9) 牧野 令奈、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；ラット網膜色素上皮細胞におえる chloroquine 過剰蓄積による lysosome 空胞化；日本薬学会第 138 年会；2018 年
- (10) 細谷 健一、山崎 雄平、赤沼 伸乙、久保 義行；血液脳関門モデル細胞における nicotine 輸送に対する中樞神経系疾患治療薬の影響；日本薬学会第 138 年会；2018 年
- (11) 赤沼 伸乙、山崎 雄平、久保 義行、細谷 健一；中樞神経系疾患治療薬と in vitro 血液脳関門ニコチン輸送との相互作用；日本薬物動態学会第 32 回例会；2017 年
- (12) 牧野 令奈、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；網膜色素上皮細胞における chloroquine の lysosomal trapping と細胞障害作用；日本薬学会北陸支部 第 129 回例会；2017 年
- (13) 粉川 紗季、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；網膜毛細血管内皮細胞における酸性小胞内蓄積機構とカチオン性薬物輸送への影響；日本薬学会北陸支部 第 129 回例会；2017 年
- (14) 細谷 健一、手賀 悠真、赤沼 伸乙、久保 義行；血液脳関門 nicotine 輸送と神経作用薬の相互作用；第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム；2017 年

- (15) 久保 義行、木下 由梨、野上 暁生、阿部 肇、井上 将彦、赤沼 伸乙、細谷 健一；内側血液網膜関門を介した cyanocobalamin 取り込み輸送機構；日本薬剂学会 第 32 年会；2017 年
- (16) 木下 由梨、野上 暁生、阿部 肇、井上 将彦、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；内側血液網膜関門における cyanocobalamin 輸送機構の解明；日本薬学会第 137 年会；2017 年
- (17) Hosoya K., Nakazawa A., Akanuma S., Kubo Y.; Involvement of lysosomal trapping in verapamil transport across the blood-retinal barrier.; International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History; 2017 年
- (18) 木下 由梨、野上 暁生、阿部 肇、井上 将彦、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；血液網膜関門を介した cyanocobalamin 輸送機構の解明；日本薬学会北陸支部 第 128 回例会；2016 年
- (19) 木田 凜太郎、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；蛍光基質を用いた肝臓における有機アニオン輸送体 organic anion-transporting polypeptide (Oatp) 1a4 の機能解析；日本薬学会北陸支部 第 128 回例会；2016 年
- (20) Usui T., Akanuma S., Kubo Y., Hosoya K.; Transporter-mediated histamine elimination from cerebrospinal fluid: involvement of PMAT at the blood-cerebrospinal fluid barrier.; 2016 China-Japan-Korea Joint Symposium, 20<sup>th</sup> Anniversary of Oriental Pharmaceutical Science; 2016 年
- (21) 臼井 拓也、中沢 亜弓、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一；血液脳脊髄液関門を介した脳からのヒスタミン排出輸送：形質膜モノアミントランスポーター (PMAT) の役割；第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム；2016 年
- (22) 細谷 健一、中沢 亜弓、赤沼 伸乙、久保 義行；血液網膜関門 verapamil 輸送における lysosomal trapping の関与；日本薬物動態学会 第 31 回年会；2016 年
- (23) Hosoya K., Akanuma S., Kubo Y.; The role of blood-retinal barrier transporters in retinal drug delivery.; XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research; 2016 年
- (24) Hosoya K.; Implications of the carrier-mediated transport of nicotine in lung and other tissues.; Workshop on Drug Transporters in the Lungs, Trinity College Dublin; 2016 年
- (25) Tega Y., Akanuma S., Kubo Y., Hosoya K.; Functional expression of nicotine influx transporter driven by an outward H<sup>+</sup> gradient in rat blood-brain barrier and liver.; The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 年
- (26) Usui T., Akanuma S., Kubo Y., Hosoya K.; Histamine elimination from the cerebrospinal fluid: involvement of plasma membrane monoamine transporter at choroid plexus epithelial cells.; The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 年
- (27) Hosoya K., Microdialysis for evaluating the efflux transport of drugs across the blood-retinal barrier.; 8<sup>th</sup> International Symposium on Microdialysis; 2016 年
- (28) 細谷 健一；眼組織のトランスポーター；第 36 回 比較眼科学会年次大会；2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究代表者主宰研究室 web ページ

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤沼 伸乙

ローマ字氏名：( AKANUMA, Shin-ichi )

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 3 0 4 6 7 0 8 9

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松谷 裕二

ローマ字氏名：( MATSUYA, Yuji )

研究協力者氏名：阿部 肇

ローマ字氏名：( ABE, Hajime )

研究協力者氏名：安東 嗣修

ローマ字氏名：( ANDO, Tsugunobu )

研究協力者氏名：久保 義行

ローマ字氏名：( KUBO, Yoshiyuki )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。