

令和元年6月7日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08365

研究課題名(和文) てんかん時脳内PGE2濃度正常化に向けた血液脳関門排出機能減弱分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of transport function at the BBB in epilepsy for normalizing cerebral PGE2 level

研究代表者

赤沼 伸乙 (Akanuma, Shin-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30467089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳内過剰L-グルタミン酸関連疾患のてんかん時における、血液脳関門(BBB)プロスタグランジン(PG)E2輸送機能減弱の分子要因を解明することを目的とする。本課題から、脳に存在するPG種としてPGD2及びPGE2が共にBBBに発現するOAT3及びMRP4を介し排出輸送されることが見出された。BBBにおけるこれら輸送担体機能変動を解析するために、ex vivo脳毛細血管輸送解析系を確立した。本解析系にて、てんかん時に脳内レベルが上昇するL-グルタミン酸は、BBBに発現するNMDA受容体を介しOAT3・MRP4機能を減弱させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果について、興奮性神経伝達が病態の発現・進行に関与するてんかんなどの中枢神経系疾患に対し、脳内環境正常化を目的とした治療法開発に繋がると期待される。本研究を通じ、NMDA受容体とプロテインキナーゼCがBBBを介したPG排出輸送を調節していることを見出された。そのため、これら疾患時に共に脳内濃度が上昇するPGについて、濃度を正常化する上で、BBBに発現するこれら標的を用いてPGE2排出を促進・正常化することが方策の一つとして提案される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanism about the attenuation of prostaglandin (PG) E2 efflux transport across the blood-brain barrier (BBB) by L-glutamate, which level is increased in epilepsy. In this study, it is suggested that both PGE2 and PGD2 are eliminated from the brain via organic anion transporter 3 (OAT3) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) at the BBB. To examine the detail of the functional alteration of OAT3 and MRP4 at the BBB, an ex vivo transport analysis using isolated rat brain capillaries has been established. Using this analytical method, we demonstrated the attenuation of transport function via OAT3 and MRP4 at the BBB via the activation of NMDA-type L-glutamate receptors. This study could help us to consider the therapeutic strategy to treat the neuroexcitatory diseases, such as epilepsy.

研究分野：医療系薬学、中枢神経系関門薬物動態学、トランスポーター学

キーワード：血液脳関門 プロスタグランジン PGE2 有機アニオン輸送担体 てんかん L-グルタミン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは興奮性神経伝達物質の過剰産生・放出が関与する疾患であり、脳細胞からの L-グルタミン酸過剰放出およびその除去機構の破綻が本疾患の発症・進行に繋がる。てんかんは発症要因が不明確なもの(特発性・先天性)、頭部外傷などの原因が明確なもの(症候性)も含めると、1000人に5-8人が有するありふれた疾患である。平成23年厚生労働省調べ患者調査によると、総患者数は昭和62年から平成23年まで20万-30万人を推移しており、各種抗てんかん薬が開発されている現状にも関わらず、明確な根治療法確立に至っていない。この原因として、(i) 抗てんかん薬投与においても発作を抑えられない(難治性てんかん)罹患者が存在し、その割合として全患者の30%程度にも及ぶこと、(ii) 治療薬の感受性が各々の患者で異なること、(iii) 抗てんかん薬はてんかん発作症状を抑えることは可能であるものの、基本的に根治は不可能であること、の3つが挙げられる(*N. Engl. J. Med.*, 365, 919-26 (2011); *F1000 Prime Rep.*, 7:61 (2015))。てんかん発作による一時的意識消失に加え、本発作が繰り返す恐怖、そして継続的投薬治療、さらに薬物療法不適合による脳外科的療法適用による患者への心理的・社会的負担は計り知れず、general standardな投薬療法確立、そしててんかんの根治を目指した治療法・薬物療法の確立は急務であると言える。これまではてんかん時における神経細胞の機能・形態の変動やグリア細胞の異常時における神経伝達物質クリアランス機能変動に研究フォーカスが当てられており(*Nat. Med.*, 18, 1271-8 (2012); *Glia*, 60, 1227-33 (2012))。これらの研究成果が元となり、現在使用・処方されている抗てんかん薬も神経細胞受容体やその細胞内酵素を標的とした薬が中心である。前述のてんかん根治を目指した general standard な薬物療法を確立する上で、上記とは異なる視点でのてんかん発症・進行メカニズムの理解が必要と考えられる。

研究代表者は血液脳関門の脳内物質クリアランス機構の重要性解明に着目し研究を実施してきており、その中でも、脳内興奮性神経伝達の持続、それに伴う神経細胞死に関与することが知られているプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の脳関門排出輸送機構について、次ページ(i)-(iii)に示す知見を得ている。

- (i) 循環血液と脳を隔てる関門である BBB および血液脳脊髄液関門 (BCSFB) が脳内 PGE₂ クリアランスに寄与し、その過程には有機アニオン輸送担体 Oat3 および Mrp4 が関与する。
- (ii) *In vivo* BBB を介した PGE₂ 排出輸送について、リポ多糖 (LPS) 投与によって炎症を惹起させたモデル動物においてその排出輸送機能は低下する。さらにその低下には少なくとも一部 BBB アニオントランスポーターの発現量低下が一部関係する。
- (iii) 興奮性伝達物質であり、てんかん時に脳細胞間隙中濃度が上昇する L-グルタミン酸の脳内投与によって *in vivo* BBB を介した PGE₂ 排出輸送は減弱する。その排出の減弱は N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体阻害剤の投与によって正常化する。

近年、脳内過剰 PGE₂ 介在シグナルのてんかん症状増悪への関与が明らかにされてきており(*Neurobiol. Dis.*, 70, 74-89 (2014))、その脳内濃度の適切化は新たなてんかん治療戦略と期待される。これまで得た知見(iii)にあるように、血液脳関門 PGE₂ クリアランス機能は減弱することから、てんかん発作の発症・進展に血液脳関門は関与するものの、その排出機能を正常状態に戻すことは可能と考えられる。問題点は、NMDA 受容体下流シグナル系の中でどの伝達系が血液脳関門において存在し、PGE₂ 排出トランスポーター機能減弱に寄与するかを解明することで、最適な標的を見つけ出すことである。本課題にて我々はてんかんの新たな薬物療法の開発に向けて、独自の仮説「血液脳関門 PGE₂ 排出機能減弱の正常化による脳内 PGE₂ 環境適切化によって、てんかんの新たな治療法が確立可能」を立案し、それに向けての血液脳関門分子基盤解明を本課題では提案する。

2. 研究の目的

本研究は、1. 記載の研究背景を基にとし、脳内過剰 L-グルタミン酸関連疾患のてんかん時における、血液脳関門 PGE₂ 輸送機能減弱の分子要因を解明することを目的とする。研究代表者が有する *in vivo* 血液脳関門機能評価法 (brain efflux index 法)、及び *in vitro* 解析法として単離脳毛細血管を用いた発現・機能評価法を駆使し、血液脳関門 PGE₂ 輸送減弱カスケードを明らかにする。本課題達成にて、血液脳関門輸送正常化を標的とした、新規創薬ターゲット候補分子の発見、さらにはてんかんなど、脳内過剰興奮性神経伝達が関連する疾患の新規治療戦略構築に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) ラット大脳皮質から BBB を介した化合物排出輸送機能評価 (brain efflux index 法)

麻酔下 Wistar 系統雄性ラット大脳皮質 Par2 領域に放射標識化合物及び BBB 非透過性物質 ([¹⁴C]D-mannitol) を微量投与し、指定時間後に安楽死させ、投与側大脳皮質を単離した。2 N 水酸化ナトリウム溶液にて可溶化し (55°C, 3 時間)、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor, PerkinElmer) を加え、十分に攪拌後、液体シンチレーションカウンターにて ³H 及び ¹⁴C 放射活性を測定した。なお、各種化合物による阻害効果は、微量投与液中に化合物を共存させることによる脳内残存率の変動を指標に評価した。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送解析

氷冷麻酔下の雌性アフリカツメガエル (カトー-S カガク, Chiba, Japan) を開腹し、卵母細胞を摘出し、濾胞細胞を精密ピンセットで丁寧に取り除いた。単一にした卵母細胞を 24 時間培養後、輸送担体分子 complementary RNA 溶液を培養したアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入した。非発現 control として、滅菌超純水を 23 nL 注入した。注入後の卵母細胞は、medium 中にて 18°C 環境下 4 日間追加培養した。輸送解析対象化合物を含む buffer を加えることで輸送実験を開始し、18°C 環境下インキュベートした。指定時間経過後に卵母細胞を氷冷 buffer にて 4 回洗浄し、可溶化後、卵母細胞に取り込まれた化合物由来である可溶化液中の化合物量を定量した。

(3) ラット脳毛細血管単離および輸送解析

ラット脳を回収後、中脳・小脳・延髄を除去後、大脳皮質について氷冷環境下にて白質と軟膜を実体顕微鏡観察下にて取り除いた。デキストランを用いた密度勾配遠心後、目の径が異なる複数のナイロンメッシュにて脳毛細血管以外の細胞を除去すると共に、細かい径のナイロンメッシュ上にて脳毛細血管をトラップさせた。このナイロンメッシュを生理 buffer にて洗浄することで、脳毛細血管画分を回収した。回収した脳毛細血管画分をカスタム合成したイメージングチャンパーに播種し、室温にて 20 分静置し、脳毛細血管をチャンパーに定着させた。なお、L-グルタミン酸を始めとした薬物処理を行う際には、イメージングチャンパーへ脳毛細血管を播種する前に、30 分間室温にてインキュベーションした。播種した脳毛細血管周囲の生理 buffer を丁寧に取り除き、8-Fluo-cAMP 含有の生理 buffer を加え、内腔への蓄積反応を開始させた。指定時間後に共焦点レーザー顕微鏡にて 8-Fluo-cAMP 由来の蛍光を含む脳毛細血管の画像を、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5; Leica, Wetzlar, Germany) にて取得した。取得した画像は、Image J ver. 1.52 g (Wayne Rasband, National Institutes of Health, MD, USA) にて定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) ラット血液脳関門を介したプロスタグランジン D₂ (PGD₂) 排出輸送特性

PGE₂ と比して脳に豊富に存在するプロスタグランジン種である PGD₂ は、PGE₂ とは異なる脳内生理作用を有している。そのため、BBB を介した PGE₂ と PGD₂ の排出輸送特性について同一性を明らかにすることは、BBB の PG 排出機能を調節することによる脳内生理作用の変化を探る上で重要である。大脳皮質に投与した [³H]PGD₂ は消失半減期 16 分にて速やかに消失し、その消失は非標識 PGD₂ 共存によって有意に阻害された。従って、BBB を介した PGD₂ 排出輸送は担体介在型であることが示唆された。本 PGD₂ 排出輸送について、PGE₂ 輸送に関与することが示唆されている OAT3 及び MRP4 の関与を検証することを目的とし、各種阻害剤を用い *in vivo* 解析を行った。その結果、これら阻害剤によって、大脳皮質に投与された [³H]PGD₂ の消失は強力に阻害された。一方、BBB に発現する他の有機アニオン輸送担体として、Oatp1a4 の阻害剤によっても弱いながら阻害効果が観察された。ただし、Oatp1a4 発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析から、[³H]PGD₂ および [³H]PGE₂ 輸送活性は観察されなかった。以上の結果を総合すると、BBB に発現する OAT3 および MRP4 は脳からの PGE₂ 排出輸送だけではなく、PGD₂ 排出輸送にもまた関与することが示唆された。

(2) ラット脳毛細血管 PG 輸送指標プローブ探索

Ex vivo ラット脳毛細血管輸送解析を行うにあたり、BBB において PGE₂ 輸送に関与する OAT3 及び MRP4 共に認識されるプローブ化合物を探索した。これまでに、8-Fluo-cAMP は一部組織において MRP4 介在輸送を反映する蛍光化合物であることが報告されている。そこで、OAT3 を機能的発現するアフリカツメガエル卵母細胞を構築し、8-Fluo-cAMP 輸送活性を評価した。その結果、OAT3 発現 oocyte において、非発現細胞と比して有意な取り込み活性を示した。本結果から、8-Fluo-cAMP は MRP4 に加え、OAT3 にも認識される蛍光基質であること、即ちラット脳毛細血管輸送解析において PGE₂ の輸送を模倣するプローブとなることが示唆された。

(3) ラット脳毛細血管 8-Fluo-cAMP 輸送特性

単離脳毛細血管に 8-Fluo-cAMP を加え、インキュベートした結果、血管内腔への 8-Fluo-cAMP 蓄積が観察された。そこで、ラット脳毛細血管における 8-Fluo-cAMP 蓄積への OAT3 および MRP4 の関与を検証した。この内腔への蓄積について、各種 OAT3 及び MRP4 阻害剤を共存させることによる蓄積度の変化について定量的評価を行った。その結果、これら阻害剤共存によって血管内腔への 8-Fluo-cAMP 蓄積は 50% 以上有意に阻害された。以上の結果から、本 8-Fluo-cAMP を用いた解析を通じて、BBB における OAT3 及び MRP4 の機能的変化を明らかにすることが可能であることが示唆された。

(4) ラット脳毛細血管 8-Fluo-cAMP 輸送変動メカニズム

てんかん時における血液脳関門 PGE₂ 輸送系の変動を明らかにするため、てんかん時に脳細胞間隙中濃度が上昇する L-グルタミン酸処理後の脳毛細血管における 8-Fluo-cAMP 輸送を評価した。L-グルタミン酸処理 (100 μM) によって、脳毛細血管内腔への 8-Fluo-cAMP 蓄積は低下したことから、*in vivo* において観察された大脳皮質 L-グルタミン酸投与による PGE₂ 排出減弱は、BBB に対し L-グルタミン酸が作用したことによるものと考えられた。また、この 8-Fluo-cAMP

蓄積は NMDA 受容体アゴニスト処理によっても減弱したことから、NMDA 受容体活性化が BBB における PG 輸送担体群機能減弱に関与することが示唆された。NMDA 受容体の活性化は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を誘発することが知られている。L-グルタミン酸処理時に細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM を共存させた際に、ラット単離脳血管内腔への 8-Fluo-cAMP 蓄積の減弱は観察されなかった。以上の結果から、PG 輸送担体である OAT3 及び MRP4 の機能は、NMDA 受容体介在シグナル伝達によって調節されており、この調節機構がてんかん時における PGE₂ 排出輸送低下の要因となり得ることが示唆された。

上記研究を通じ NMDA 受容体を介した BBB における PGE₂ 輸送担体機能減弱が示唆されたことから、NMDA 受容体によって活性が変化するプロテインキナーゼの単離脳毛細血管における 8-Fluo-cAMP 輸送に与える影響を精査した。このプロテインキナーゼの中で、プロテインキナーゼ C (PKC) が知られている。L-グルタミン酸処理時における単離脳毛細血管 8-Fluo-cAMP 輸送の減弱に与える PKC 阻害剤影響を解析した結果、予想に反し、PKC 阻害剤共存下においてその輸送は回復せず、むしろさらに減弱した。そのため、PKC は L-グルタミン酸シグナルとは独立して BBB における PGE₂ 排出輸送系を制御する可能性が考えられた。そこで、L-グルタミン酸処理を行っていない脳毛細血管に対し、PKC の作動薬及び阻害剤の共存による 8-Fluo-cAMP 輸送を評価した。その結果、PKC 作動薬共存によって、BBB における PGE₂ 輸送担体機能の増強が、PKC 阻害剤共存によって、BBB における PGE₂ 輸送担体機能の低下が観察された。従って、BBB に発現する PKC は、PGE₂ 輸送担体の機能制御に関与すること、そしてこの機能制御に関与する経路は L-グルタミン酸介在のパスウェイとは異なる事が示唆された。本研究成果を考慮すると、てんかん時の脳内 PGE₂ 濃度上昇を回避する方策として、PKC 活性化による、PGE₂ 排出輸送能の活性が提案される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

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

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

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

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

Akanuma S., Shimada H., Kubo Y., **Hosoya K.**; Involvement of carrier-mediated transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier in spermine clearance from rat brain.; *Biol. Pharm. Bull.*, 70, 1599-603 (2017) <査読有り>

DOI: 10.1248/bpb.b17-00394

[学会発表] (計 1 7 件)

須河内 剛志、**赤沼 伸乙**、久保 義行、Anika M.S. Hartz、Bjoern Bauer、**細谷 健一**；血液脳関門を介した脳への gabapentin 輸送における L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) の関与；日本薬学会第 139 年会；2019 年

赤沼 伸乙、山腰 敦子、須河内 剛志、久保 義行、Anika M.S. Hartz、Bjoern Bauer、**細谷 健一**；血液脳関門を介した gabapentin 輸送における L 型アミノ酸トランスポーター 1 の役割；日本薬学会第 139 年会；2019 年

吉田 有紀子、**赤沼 伸乙**、久保 義行、**細谷 健一**；単離脳毛細血管を用いた血液脳関門におけるアニオン輸送機構変動解析；日本薬学会第 139 年会；2019 年

吉田 有紀子、**赤沼 伸乙**、久保 義行、**細谷 健一**；NMDA 受容体による血液脳関門を介したアニオン輸送機構変動解析；日本薬学会北陸支部第 130 回例会；2018 年

山腰 敦子、**赤沼 伸乙**、須河内 剛志、久保 義行、Anika M.S. Hartz、Bjoern Bauer、**細谷 健一**；Gabapentin の網膜移行に対する血液脳関門 L 型アミノ酸トランスポーターの関与；日本薬学会北陸支部第 130 回例会；2018 年

Sugouchi T., **Akanuma S.**, Kubo Y., Hartz A.M.S., Bauer B., **Hosoya K.**; L-Type amino acid transporter-mediated blood-to-brain gabapentin transport across the blood-brain barrier.; 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX; 2018 年

Yamakoshi A., Akanuma S., Sugouchi T., Kubo Y., Hartz A.M.S., Bauer B., Hosoya K.; L-Type amino acid transporter 1 at the inner and outer blood-retinal barriers mediates the blood-to-retina transport of gabapentin.; 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX; 2018 年
Akanuma S., Kida R., Tsuchiyama A., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Functional heterogeneity of Oatp1a4-mediated transport in hepatocytes of rat hepatic lobules.; 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX; 2018 年
赤沼 伸乙、山腰 敦子、須河内 剛志、久保 義行、Anika M.S. Hartz、Bjoern Bauer、細谷 健一; 血液網膜関門における gabapentin 輸送への L 型アミノ酸トランスポーター1 の関与; 富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム; 2018 年
赤沼 伸乙、山腰 敦子、須河内 剛志、久保 義行、Anika M.S. Hartz、Bjoern Bauer、細谷 健一; 網膜へのガバペンチン移行における内側血液網膜関門中性アミノ酸輸送担体 LAT1 の役割; 公益社団法人日本薬剤学会 第 33 年会; 2018 年
赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一; 薬剤耐性てんかんの克服に向けた血液脳関門薬物・内因性化合物輸送機構解明; 日本薬学会第 138 年会; 2018 年
須河内 剛志、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一; 血液脳関門を介した脳への gabapentin 輸送機構の解明; 日本薬学会北陸支部 第 129 回例会; 2017 年
Akanuma S., Kubo Y., Hosoya K.; Efflux transport of epilepsy-related compounds at the blood-brain barrier.; APSTJ Global Educational Seminar-2nd; 2017 年 (招待講演)
山崎 雄平、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一; 脳内 tyramine クリアランスへの血液脳脊髄液関門排出輸送機構の関与; 日本薬学会第 137 年会; 2017 年
山崎 雄平、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一; 脳関門を介した脳内 tyramine 消失機構の解明; 日本薬学会北陸支部 第 128 回例会; 2016 年
赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一; ラット血液脳関門プロスタグランジン類排出輸送と変動メカニズム; 第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム; 2016 年
赤沼 伸乙、島田 浩和、久保 義行、細谷 健一; 脳からのスペルミン除去への血液脳脊髄液関門担体介在型輸送の関与; 日本薬物動態学会第 31 回年会; 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

該当ありません

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 細谷 健一

ローマ字氏名: (HOSOYA, Ken-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(薬学)

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70301033

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 久保 義行

ローマ字氏名: (KUBO, Yoshiyuki)

研究協力者氏名: 立川 正憲

ローマ字氏名: (TACHIKAWA, Masanori)

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。