

平成22年 4月27日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390038
 研究課題名（和文） 単分子輸送活性に基づくトランスポーターモデルによる薬物の脳移行予測基盤の構築
 研究課題名（英文） Prediction of drug distribution into the brain by the model with intrinsic transporter activity
 研究代表者
 大槻 純男（OHTSUKI SUMIO）
 東北大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：60323036

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳関門で機能するトランスポーターの単分子輸送活性と発現絶対量との情報の統合により脳への薬物移行を予測する基盤を構築することを目的とした。LC-MS/MSを用いて *mdr1a* の絶対発現量を定量する系を構築し、マウス脳毛細血管及び発現培養細胞における絶対発現量を明らかにした。数理式を用いて *in vitro* 輸送活性と絶対発現量を用いた再構築によって、*in vivo* から求めた $K_{p,brain}$ 及び $K_{p,brain}$ を予測できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to predict drug distribution into the brain based on the model with intrinsic transport activity and absolute expression amount of transporters. At first, we established the quantification method of mouse *mdr1a* by means of LC-MS/MS with *in silico* target tryptic peptide selection. Using the established method, the absolute expression amounts of *mdr1a* were determined in mouse brain capillaries and *mdr1a*-expressing cultured cells. The transport activity of *mdr1a* was examined by transcellular transport study. The $K_{p,brain}$ ratio and $K_{p,brain}$ of each drug were calculated based on the model integrating absolute expression amounts and transport activity, and these predicted values were well-matched with the values determined *in vivo*. The present results indicate that the established prediction model should be a rational strategy to predict drug distribution into human brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：脳関門、P-糖タンパク質、LC-MS/MS、単分子活性、トランスポーター、脳分布、血管内皮細胞、培養細胞

1. 研究開始当初の背景

従来の脳関門輸送研究はトランスポーターの輸送への関与を定性的に示すことにとどまっている。しかし、薬物の脳移行性の制限に関わる脳関門排出輸送に真に重要な役割を果たすトランスポーターは、輸送への寄与を定量的に解明することで初めて同定することができる。この定性的解析から定量的解析の変革が、真に重要なトランスポーターを対象とした薬物動態的、生理的に意味のある次の脳関門研究に必要である。

申請者らの基盤研究も含む最近の脳関門研究の進歩によって脳関門で機能するトランスポーターが多く同定された。しかし、ノックアウトマウスを用いた研究も含め、現状は、定性的に関与を示すにとどまっている。脳関門排出輸送に関して選択的な阻害剤によって評価することも可能であるが、選択的な阻害剤の探索が困難である技術的問題に加え、阻害の度合いの評価、未知のトランスポーターの阻害や細胞機能への影響など多くの問題を含んでおり、適応の拡大は困難である。

トランスポーターの脳関門におけるタンパク質絶対発現量と分子あたりの輸送活性(=単分子輸送活性)から、トランスポーターの寄与と薬物の脳移行速度を予測することによって上記の問題点を克服することは理論的に可能である。しかし、トランスポーターのタンパク質絶対発現量(モル数)を計測する技術がなかったため、これまではこのアプローチを実施することはできなかった。我々は、世界に先駆け、独自にトランスポーターのタンパク質絶対発現量を HPLC 接続型質量分析装置(LC-MS/MS)によって超高感度で測定する技術の開発に成功し、上記の再構築手法を実施することが初めて可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳関門で機能するトランスポーターの単分子輸送活性を *in vitro* で求め、発現絶対量との情報の統合によりトランスポーターモデルを構築することによって *in vivo* 脳関門の排出輸送におけるトランスポーターの寄与を定量的に解明し、脳への薬物移行速度を予測する基盤を構築することである。

3. 研究の方法

LC-MS/MS を用いたタンパク質の定量は、標的タンパク質に特異的なトリプシン消化断片を LC/MS/MS の MRM モードを用いて定

量することによって実施した(Multiplexed-MRM 法、発表論文 3)。細胞内もしくは膜小胞に取り込まれた化合物の定量は、LC-MS/MS をもちいておこなった(発表論文 6)。培養細胞における薬物透過性は、*mdr1a* 発現細胞もしくは、親細胞を filter 上に培養し、apical-to-basal (A-to-B) 及び basal-to-apical (B-to-A) の薬物移行速度を計測し、B-to-A/A-to-B の比によって評価した。脳への薬物の分布は、定速静脈内投与によって行い、定常状態に達したと考えられる 100 分後の各臓器および血漿中の薬物濃度を LC-MS/MS によって計測することによって評価した。

4. 研究成果

まず、単分子活性に基づく血液脳関門の MDR1/*mdr1a* (p-糖タンパク質) の機能を予測、評価するための基礎技術の開発を行った。ヒト MDR1 及びマウス *mdr1a* の絶対発現量を LC-MS/MS によって定量する系の構築を行い、10fmol-5000fmol の定量範囲を持つ定量系を確立した(発表論文 3)。

この定量系を用い、ヒト MDR1 及びマウス *mdr1a* を発現する安定発現株の細胞膜におけるそれぞれの分子の絶対発現量を明らかにした。一方で、マウス血液脳関門に発現する *mdr1a* の発現量を明らかにするために、まず、磁気ビーズによってマウス脳毛細血管内皮細胞を高純度に単離する手法を構築した(発表論文 4)。非常に高純度の内皮細胞を単離することができたが、*mdr1a* の絶対発現量を得るには十分な内皮細胞を得ることができなかった。そこで、ガラスビーズをもちいて単離した脳毛細血管を用いて血液脳関門における *mdr1a* の絶対発現量を明らかにした。

次に、輸送活性に関しては、まず、反転膜小胞による輸送活性の測定を試みたが、既知の MDR1 及び *mdr1a* の基質の取り込みは認められなかった。そこで、トランスウェルによる経細胞輸送を輸送速度から各化合物の *mdr1a* の見かけの輸送の寄与を B-to-A/A-to-B の比によって求めることとして、分子あたりの寄与から脳への分布を予測する計算理論を構築した。この計算理論を元にして、*in vitro* から求められる分子あたりの活性と *in vitro* と *in vivo* の P-gp の絶対発現量から、*in vivo* の P-gp の活性指標である $K_p, \text{brain ratio}$ の再構築を行った。LLC-PK1 及び mouse P-gp 発現 LLC-PK1 (L-*mdr1a*) 細胞における 12 化合物の経細胞輸送速度を測定し、corrected flux ratio を求めた。一方、

in vivo の Kp,brain ratio を *mdr1a/1b* (p-gp) knockout と wild-type mice を用いて、定速静脈内投与によって求めた。上記の結果と発現細胞とマウス脳毛細血管における *Mdr1a* の絶対発現量を構築した計算理論で解析した結果、再構築した Kp,brain ratio は、in vivo から求めた実測値と良好に一致した。

さらに、再構築をおこなった Kp,brain ratio をさらに発展させ、Kp,brain の再構築をおこなった。Kp,brain の再構築は、Kp,brain ratio と脳及び血中の非結合型分率を求めることによって再構築できる理論構築をおこなった。非結合型分率を平衡濾過法および脳スライス法によって求め、12 化合物における Kp,brain の再構築をおこなった。その結果、9 化合物について実測した Kp,brain の 3 倍以内の値となり、再構築することに成功した。3 倍以上の値となった 3 化合物については、P-糖タンパク質以外のトランスポーターによって輸送される可能性が考えられる。今後は、寄与するトランスポーターを増やすモデルを構築し、再構築の精度を上げることによってヒト脳関門における各トランスポーターの寄与を明らかにすることが可能となり、さらにヒト脳への薬物の分布を予測することが可能になることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 大槻純男: 中枢への薬物分布におけるトランスポーターの機能と役割、日本薬理学雑誌、134:83-86, 2009. (査読無し)
2. 大槻純男, 崔吉道: 生体膜分子を基盤とする薬剤開発・治療に向けた新展開、薬学雑誌、128:495-496, 2008. (査読無し)
3. J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki: Quantitative atlas of membrane transporter proteins: Development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm. Res.*, 25:1469-1483, 2008. (査読有り)
4. S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, T. Terasaki: mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.*, 104:147-154, 2008. (査読有り)

5. S. Ohtsuki, S. Ito, A. Matsuda, S. Hori, T. Abe, T. Terasaki: Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 103:1430-1438, 2007. (査読有り)
6. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm. Res.*, 24:2281-2296, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1. 大槻純男: フェーマコプロテオミクスを基盤とする新しい薬物動態研究、第 13 回薬物動態談話会セミナー、2009 年 8 月 26 日-28 日、つくば
2. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki: In vitro-to-in vivo re-construction of blood-brain barrier penetration integrating P-glycoprotein absolute expression, its in vitro activity, and free fractions in plasma and brain. 8th Cerebral Vascular International Conference (CVB2009), Sendai, Japan, June 28-July 2 (2009)
3. 内田康雄、大槻純男、上家潤一、寺崎哲也: 膜タンパク質絶対発現量解析法を応用した薬物脳移行性予測への挑戦: P-glycoprotein 基質に焦点を当てて、日本薬剤学会第 24 年会、2009 年 5 月 21-23 日、静岡
4. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki: Reconstruction of P-glycoprotein function at blood-brain barrier based on its absolute expression amount and in vitro transport activity. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, Nov 16-20 (2008)
5. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki: Reconstruction of in vivo BBB P-glycoprotein function based on its absolute expression amount and in vitro transport activity. Gordon Research conference "Barriers of the CNS", Tilton, NH. USA, Jun 22-27 (2008)
6. S. Ohtsuki, Y. Uchida, T. Terasaki: Reconstruction of in vivo P-glycoprotein activity from in vitro

information by targeted absolute proteomics. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II), Nurnberg, Germany, Oct 3-5, 2008

7. S. Ohtsuki: Award Lecture for New Investigator Award. 2nd ISSX Asian Pacific Regional Meeting, Shanghai, China, May 11-13, 2008
8. 大槻純男、伊藤慎悟、松田明大、堀里子、阿部高明、寺崎哲也：有機アニオントランスポーター oatp2 を介した 24(S)hydroxycholesterol の生体膜輸送、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 純男 (OHTSUKI SUMIO)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60323036

(2)連携研究者

上家 潤一 (KAMIIE JUNICHI)
麻布大学・獣医学部・講師
研究者番号：10400269
(H19 年度：研究分担者)