

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590161
 研究課題名 (和文) 有機カチオン輸送系ピリラミントランスポーターの分子実体の解明と薬物認識性評価
 研究課題名 (英文) Identification and Functional Characterization of Pyrilamine Transporter, an Organic Cation Transporter
 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：本研究課題は、血液脳関門 (BBB) における有機カチオン輸送系ピリラミントランスポーターの分子実体の解明と輸送特性を明らかにすることを目的とした。本研究において、研究代表者は分子実体と輸送機能が異なる 2 つの有機カチオン性トランスポーターが BBB で機能していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	3,500,000	4,550,000

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：薬物動態学、血液脳関門、有機カチオントランスポーター、不死化細胞株、ピリラミン、PAMT

1. 研究開始当初の背景

現在臨床で使用されている中枢作用薬の多くがカチオン性低分子有機化合物である。しかし、この輸送に関わる BBB のトランスポーターは不明である。BBB のカチオントランスポーター研究が遅れた最大の理由は、高い脂溶性を示す中枢作用薬は、BBB を単純拡散で透過すると信じられてきたことにある。ところが、1994 年、辻彰のグループはカチオン性抗ヒスタミン薬ピリラミンの BBB 輸送が単純拡散で説明できないことを報告した (Pharm. Res., 11, 1516 (1994))。以来、数種の脂溶性カチオン薬物が同様の輸送現象を示すことが報告されている。しかし、この輸送を介在するトランスポーター (ピリラミ

ントランスポーター) 分子の実体と輸送特性は十分に解明されていない。BBB の有機カチオントランスポーター研究の発展は創薬と中枢疾患の治療に大きく貢献する。

2. 研究の目的

本研究課題は BBB におけるピリラミントランスポーターの分子実体の解明と輸送特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB 細胞) を BBB の in vitro モデルとして用い、カチオントランスポーターの遺伝子発現を定量的 PCR 法で測定した。

(2) ピリラミントランスポーターの輸送特性を明らかにするため、 ^3H ピリラミンを基質とした輸送実験を行った。

(3) ピリラミントランスポーターの基質と阻害剤を探索するため、カチオン性薬物であるオキシコドンを中心とした数種の薬物について、TR-BBB 細胞への取り込み実験、および ^3H ピリラミンをトランスポータープローブとした阻害実験を行った。

(4) (1) で発現量の高かったカチオントランスポーター (OCTN2, PMAT) について発現系細胞を作製した。今回特にラット PMAT 発現細胞を世界で初めて作製した。これらの発現系細胞における ^3H ピリラミンおよびカチオン性薬物の基質認識性を評価した。

(5) TR-BBB 細胞において(1)で発現量の高かった (PMAT) が輸送機能を保持しているかを明らかにするため、siRNA 法を用いてノックダウン細胞株を作製し、その輸送活性を測定し、発現系細胞と比較した。

(6) (1) ~ (5) で明らかにしたトランスポーターが *in vivo* 脳関門で機能していることを検証するため、*in situ* brain perfusion 法、brain efflux index 法を用いてカチオン性薬物の輸送活性を測定した。

4. 研究成果

(1) TR-BBB13、ラット脳および腎臓における有機カチオントランスポーター (rOCT1, rOCT2, rOCT3, rOCTN1, rOCTN2, rPMAT, rMATE1, rMATE2) の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により定量した。TR-BBB13 におけるこれらトランスポーターの mRNA 量は、rPMAT で最も高く、以下 rOCTN2 の順で、rOCTN1, rMATE1-2, rOCT1-3 の発現は極めて低かった。ラット脳では rPMAT で最も高い発現が認められ、以下 rOCTN1, rOCTN2 > rOCT3 >> rOCT2 > rMATE1 > rMATE2 の順で、rOCT1 の発現は検出されなかった。ラットの腎臓では、rOCT1, rOCT2, rOCTN2, rMATE1 の極めて高い発現が確認された。今回測定したカチオントランスポーターのうち、PMAT および OCTN2 が薬物トランスポーターとして機能している可能性が高いと予測され、研究の方法(4)で発現系の作製を試みた。BBB に発現するカチオントランスポーターについて、網羅的に調べた研究は少なく、PMAT の BBB における発現を世界で初めて明らかにすることができた。

(2) TR-BBB 細胞において、 ^3H ピリラミンおよび麻薬性鎮痛薬オキシコドンの輸送機能を測定したところ、輸送の親和性および輸

送阻害様式に共通性がみられた。さらに、輸送の駆動力について検討した結果、 ^3H ピリラミンおよびオキシコドンの細胞内への取り込みは、共にロテノンやアジ化ナトリウムで阻害されるエネルギー依存性を示し、かつ細胞内外のプロトン分子と逆輸送されることがわかった。オキシコドンは細胞間液中濃度が血漿中の遊離形濃度より高く、BBB を介した血液側から脳側への能動的な取り込み輸送の存在が示唆されている。今回の結果からオキシコドンがピリラミントランスポーターに認識される薬物の1つであることが明らかとなった。このことはピリラミントランスポーターがカチオン性薬物を積極的に脳内に取り込む役割を果たしていることを世界に先駆けて示した結果であり、欧文科学雑誌 Drug Metabolism & Disposition に投稿し、受理された。

(3) TR-BBB13 への ^3H ピリラミンの取り込みは、抗うつ薬のアミトリプチリン、イミプラミン、クロミプラミン、アミキサピン、フルボキサミン、抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウム、抗不整脈薬のリドカイン、メキシレチン、フレカイニド、NMDA 受容体拮抗薬のケタミンで有意に阻害された。その阻害率は抗うつ薬で 87~98%、バルプロ酸ナトリウムで 61%、抗不整脈薬で 79~98%、ケタミンで 89%であった。また ^3H ピリラミンの取り込みは麻薬性鎮痛薬のモルヒネおよびオキシコドン、非麻薬性鎮痛薬のペンタゾシンにより有意に阻害されたが、ブプレノルフィンによる阻害はみられなかった。このように多くのカチオン性薬物がピリラミントランスポーターの基質あるいは阻害剤の候補になることが、今回の研究から明らかになった。

(4) rOCTN1 および PMAT 強制発現細胞において、これらのトランスポーターに対するオキシコドンおよびピリラミンの認識性について検討した。rOCTN2 発現系において、rOCTN2 の遺伝子導入により、特異的基質である L- ^3H カルニチン (OCTN2 選択的基質) の取り込みは 4.5 倍増加した。また、rPMAT 発現系においては、rPMAT-Flag-Tag 抗体を用いて発現系細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて PMAT タンパク質の細胞内局在を明らかにしたところ、rPMAT は細胞膜に発現していることを確認した。また、rPMAT の発現量の変化をウェスタンブロット法にて定量化したところ、時間依存的に rPMAT の発現量が増加した。従って、今回作製した発現系は OCTN2 および PMAT の輸送機構を明らかにするのに適した細胞であることがわかった。これらの発現系において、 ^3H ピリラミンおよびオキシコドンの取り

込み実験を行ったところ、いずれの取り込みも mock 細胞に比べ有意な上昇はみられなかった。従って、BBB に発現するピリラミントランスポーターの分子実体は少なくとも OCTN2 および PMAT とは異なる新規カチオントランスポーターであることが示唆された。

(5) 有機カチオンのモデル基質である MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) のトリチウムラベル体を用いて PMAT の輸送機構を解析した。その結果、³H MPP⁺ の取り込みは濃度依存的、温度依存的、pH 依存的であり、カリウム刺激によって取り込みが減少した。これらの結果から、PMAT は膜電位依存的な促進拡散系のトランスポーターであることがわかった。また、siRNA 法にて TR-BBB13 細胞の rPMAT をノックダウンしたところ、³H MPP⁺ の取り込みは、コントロールの細胞に比べ有意に低下した。この結果は、PMAT はピリラミントランスポーターとは異なるものの、血液脳関門において薬物輸送トランスポーターとしての機能を有していることを示すものであり、興味深い。

(6) オキシコドン、ピリラミンおよび MPP⁺ の in vivo における BBB 透過性を in situ ラット脳灌流法により評価した。オキシコドンおよびピリラミンの BBB 透過性は血管容積マーカーである BBB を透過しないスクロースのそれに比べ数百倍高かった。一方、MPP⁺ の BBB 透過性は BBB 不透過物質であるイヌリンとほぼ同定度であった。これらとは別に、brain efflux index 法による検討から MPP⁺ は脳から血液へ排出されることがわかった。以上の結果から、ピリラミントランスポーターは血液側から脳への取り込み輸送に働く能動輸送系のトランスポーターであり、PMAT は脳側からの排出に働くトランスポーターであることがわかった。

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 3 件)

① Okura T, Hattori A, Takano Y, Sato T, Hammarlund-Udenaes M, Terasaki T, Deguchi Y. Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. Drug Metab. Dispos. 36, 2005 (2008) (査読有)

② Okura T, Ito R, Ishiguro N, Tamai I, Deguchi Y. Blood-brain barrier transport of pramipexole, a dopamine D2 agonist.

Life Sci. 80, 1564 (2007). (査読有)

③ Okura T, Komiyama N, Morita Y, Deguchi Y, Yamada S. Comparative evaluation of antinociceptive potency of morphine and morphine-6 β -glucuronide by simultaneous measurements of spinal concentration. Life Sci. 80, 1319 (2007). (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① Asami Hattori, Takashi Okura, Yusuke Nakazawa, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: Blood-brain barrier transport of oxycodone, an opioid receptor agonist. The 5th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, Shizuoka, May 10 - 11, abstract form., p. 95 (2007)

② 出口芳春, 黄倉 崇, 服部麻美, 鈴木俊英, 寺崎哲也: 血液脳関門におけるカチオン性薬物トランスポーターの機能および輸送分子の解析, 日本薬剤学会 (大宮), 2007 年 5 月 16 - 18 日, 講演要旨集, p. 405 (2007)

③ 黄倉 崇, 中澤佑介, 服部麻美, 寺崎哲也, 出口芳春: 麻薬性鎮痛薬オキシコドンと鎮痛補助薬の相互作用解析, 日本薬剤学会 (大宮), 2007 年 5 月 16 - 18 日, 講演要旨集, p. 343 (2007)

④ Yoshiharu Deguchi, Takashi Okura, et al.: H⁺/organic cation antiporter is involved in the blood-brain barrier transport of cationic drugs., 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, June 20 - 22, Kanazawa, (2007).

⑤ Yoshiharu Deguchi: Involvement of H⁺/organic cation antiporter in the blood-brain barrier transport of cationic drugs., 10th International Symposium, Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, Postdam/Germany, September 13-16, 2007

⑥ Takashi Okura, Yusuke Nakazawa, Asami Hattori, Tetsuya Terasaki and Yoshiharu Deguchi: Drug-drug interactions between oxycodone and adjuvant analgesics at the blood-brain barrier, 8th ISSX/ 22th JSSX Joint Meeting, abstract October 9-12 (2007)

⑦ 黄倉 崇、出口芳春ら： Expression and transport function of rat plasma membrane transporter (rPMAT) in the brain barrier system. 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(仙台), 2007年11月26-27日

⑧ 高野祐輔、黄倉 崇、出口芳春ら：脳関門における rat plasma membrane transporter (rPMAT) の発現と輸送機能. トランスポーター研究会第1回関東部会(横浜), 2007年12月10日

⑨ 高野祐輔、黄倉 崇、出口芳春ら：血液脳関門に高発現する新規有機カチオントランスポーター (PMAT) のクローニングと輸送機能解析. 日本薬学会第128年会(横浜), 2008年3月26日

⑩ Takashi Okura, Yoshiharu Deguchi et al., BBB transport and pharmacological effect of opioids., 11th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, 2008年9月20日, オランダ・アムステルダム

⑪ Yoshiharu Deguchi, et al., Expression and functional characterization of plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in the rat BBB, 11th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, 2008年9月20日, オランダ・アムステルダム

⑫ Keita Shimomura, Yoshiharu Deguchi et al., The pyrilamine transporter functions as the multispecific organic cation transporter at the blood-brain barrier., 第23回日本薬物動態学会年会, 2008年10月31日, 熊本

⑬ Takenori Sato, Yoshiharu Deguchi et al., Plasma membrane monoamine transporter (PMAT) mediates the efflux transport of organic cations in the brain barrier system., 第23回日本薬物動態学会年会, 2008年10月31日, 熊本

〔図書〕(計 2 件)

① 出口芳春：血液脳関門トランスポーターと創薬、辻彰編、トランスポーター科学の最前線、pp. 119 (2008). (査読無)

② 出口芳春：分布、辻彰編、南江堂、pp. 98 (2007). (査読無)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

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

(3) 連携研究者

黄倉 崇 (OKURA TAKASHI)
帝京大学・薬学部・講師
研究者番号：80326123