

機関番号：32643

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790162

研究課題名 (和文) 血液脳関門における麻薬性鎮痛薬の脳移行制御機構の解明

研究課題名 (英文) Transport mechanisms of opioid analgesics across the blood-brain barrier

研究代表者

黄倉 崇 (OKURA TAKASHI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：80326123

研究成果の概要 (和文)：ヒト血液脳関門 (BBB) モデル細胞において、有機カチオン ( $OC^+$ ) / プロトン ( $H^+$ ) アンチポーターが塩基性薬物を輸送することが示され、げっ歯類同様、ヒト BBB においても  $OC^+/H^+$  アンチポーターがオキシコドンの脳移行を担うことが示唆された。さらにヒト BBB 細胞において siRNA 法を用いた有機カチオン輸送分子の機能解析に成功し、オキシコドン輸送分子のスクリーニングのための有用な実験系を構築することができた。

研究成果の概要 (英文)： An organic cation/proton antiporter is involved in the CNS acting cationic drug transport in the human blood-brain barrier model cells, suggesting that the proton antiporter mediates oxycodone transport into the brain across the blood-brain barrier in humans as well as rodents. Further, we showed that functions of organic cation-related transporters are able to be suppressed by small interfering RNA (siRNA). The siRNA screening method should be useful for the identification of the proton antiporter molecule which mediates blood-to-brain transport of oxycodone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：薬物動態学

## 1. 研究開始当初の背景

麻薬性鎮痛薬の脳内濃度を規定するのが血液-脳関門 (BBB) である。BBB は、物質移行の障壁となるばかりでなく、トランスポーター介在輸送による積極的な物質交換を行うことにより、脳内環境を維持する。これまでにげっ歯類を用いた研究から、麻薬性鎮痛薬のオキシコドンの脳への移行には、有機カチオン感受性でエネルギー依存的なプロトンアンチポーターが関与することを見出し、オ

キシコドントランスポーターとして  $OC^+/H^+$  アンチポーターが存在することを示した。しかし、この  $OC^+/H^+$  アンチポーター分子は未同定であることに加え、ヒトにおける麻薬性鎮痛薬の BBB 輸送機構に関しては、殆ど研究がなされていない。その最大の理由は、機能解析に必要な量の単離脳毛細血管内皮細胞をヒト脳から得るのが事実上不可能であるからである。近年樹立されたヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3) をヒト BBB モデルとして

用いることにより、ヒトにおける麻薬性鎮痛薬のBBB輸送機構を解明できる可能性が高く、中枢作用薬の脳への新規送達方法の確立および適正使用に向けた有用な知見が得られると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、オキシコドン等の麻薬性鎮痛薬の脳移行を制御することがげっ歯類において示されている  $OC^+/H^+$  アンチポーターについて、ヒトBBBにおける機能解析に加え、その分子実体の同定を目指してRNA干渉法による有機カチオン輸送体の機能解析法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトBBBにおける  $OC^+/H^+$  アンチポーターの機能解析 ヒトBBBモデル細胞として hCMEC/D3細胞を、 $OC^+/H^+$  アンチポーターのプロブリンダとして  $[^3H]$ ピリラミンおよびジフェンヒドラミンを用いて、その輸送機能特性を評価し、オキシコドン輸送との比較をした。

(2) RNA干渉法による有機カチオン輸送体の機能解析法の確立 hCMEC/D3細胞における有機カチオン輸送体のmRNA量をqPCR法により測定し、発現のみられた遺伝子に対するsiRNAを作製した。リポフェクション法によりsiRNAをhCMEC/D3細胞に導入し、遺伝子発現効率ならびに輸送機能を測定した。

## 4. 研究成果

(1) ヒトBBBにおけるオキシコドントランスポーターの機能解析  $[^3H]$ ピリラミンまたはジフェンヒドラミンのhCMEC/D3細胞への取り込みは、濃度依存性およびエネルギー依存性を示し、細胞内酸性化および細胞外アルカリ化により顕著に増加した(図1)。このことから、げっ歯類と同様、ヒトのBBBにおいても、逆向きの  $H^+$  濃度勾配を駆動力とする有機カチオン輸送体が機能していることが明らかとなった。さらに、ジフェンヒドラミンは、ピリラミンまたはオキシコドンと競合的な阻害を示した。以上の結果から、ヒトBBBでも、オキシコドン輸送体である  $OC^+/H^+$  アンチポーターが機能していることが示唆された。さらに、hCMEC/D3細胞で測定された  $[^3H]$ ピリラミンの輸送クリアランスは、PETにより測定された  $[^{11}C]$ ピリラミンの脳移行クリアランスの報告値と近似した。このことは、hCMEC/D3細胞が中枢作用型塩基性薬物の脳移行機構解析のための適した *in vitro* モデルとなることを示唆している。

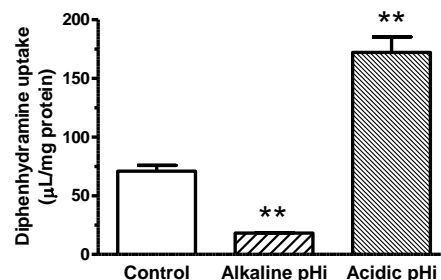


図1 ヒトBBBモデル細胞における細胞内pH(pHi)変化に伴う  $OC^+/H^+$  アンチポーターの機能変化

(2) RNA干渉法による有機カチオン輸送体の機能解析法の確立 hCMEC/D3細胞における有機カチオン輸送体の遺伝子発現をqPCRにより測定したところ、OCTN1 (SLC22A4), OCTN2 (SLC22A5), PMAT (SLC29A4), CTL1 (SLC44A1), CTL2 (SLC44A2)が高発現する一方、OCT1-3 (SLC22A1-3)およびMATE1-2 (SLC47A1-2)の発現はわずかであった。これらhCMEC/D3細胞に高発現する有機カチオン輸送体に対するsiRNAを作製し、遺伝子発現抑制効率を最適化したところ、いずれも90%以上の抑制効率を示した。さらに、OCTN siRNAの導入により  $[^3H]$ カルニチンの細胞内取り込みが有意に阻害されたことから、OCTNがヒトBBBで機能するとともに、RNA干渉法により有機カチオン輸送体の機能を解析できることが示唆された。これらの結果から、ヒトBBB細胞におけるRNA干渉法を用いた有機カチオン輸送体の機能解析法は、ヒトBBBにおけるトランスポーター機能解析に有用な方法であることが示唆された。さらに多くの有機カチオン輸送分子に対するsiRNAライブラリーを構築することにより  $OC^+/H^+$  アンチポーターの同定のみならず、ヒトBBBにおけるトランスポーターの機能解析に有用な知見が得られることが示唆された。

## 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 6件)

- ① Takashi Okura, Sayaka Kato, Yusuke Takano, Takenori Sato, Atsushi Yamashita, Riyo Morimoto, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: Functional characterization of rat plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. J. Pharm. Sci. in press (2011), 査読有
- ② Muhammad Waqas Sadiq, Annika Borgs,

- Takashi Okura, Keita Shimomura, Sayaka Kato, Yoshiharu Deguchi, Britt Jansson, Sven Björkman, Tetsuya Terasaki, Margareta Hammarlund-Udenaes: Diphenhydramine active uptake at the blood-brain barrier and its interaction with oxycodone in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci.* in press (2011), 査読有
- ③ Yusuke Nakazawa, Takashi Okura, Keita Shimomura, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: Drug-drug interaction between oxycodone and adjuvant analgesics in blood-brain barrier transport and antinociceptive effect. *J. Pharm. Sci.* 99, 467-474 (2010), 査読有
- ④ Takashi Okura, Michiko Ibe, Keizo Umegaki, Kazumasa Shinozuka, Shizuo Yamada: Effects of dietary ingredients on function and expression of P-glycoprotein in human intestinal epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 255-259 (2010), 査読有
- ⑤ Takashi Okura, Tadahiro Ozawa, Michiko Ibe, Yuko Taki, Midori Kimura, Yoshiyuki Kagawa, Yoshihisa Kato, Shizuo Yamada: Effects of repeated morphine treatment on the antinociceptive effects, intestinal absorption, and efflux from intestinal epithelial cells of morphine. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1571-1575 (2009), 査読有
- ⑥ Takashi Okura, Yuki Morita, Yoshihiko Ito, Yoshiyuki Kagawa, Shizuo Yamada: Effects of quinidine on antinociception and pharmacokinetics of morphine in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 593-597 (2009), 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 黄倉 崇、加藤清香、Pierre-Oliver Couraud、出口芳春: 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. 日本薬学会第 26 年会 (東京), 2011 年 5 月 29-31 日
- ② 森本理代、加藤清香、黄倉 崇、加藤将夫、森山芳則、出口芳春: 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. 日本薬学会第 26 年会 (東京), 2011 年 5 月 29-31 日
- ③ 黄倉 崇、加藤清香、Pierre-Oliver Couraud、出口芳春: 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. 日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011 年 3 月
- ④ Takashi Okura, Sayaka Kato, Keita Shimomura, Pierre-Oliver Couraud, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: Involvement of an organic cation/proton antiporter in transport of clinically-used cationic drugs in the human brain endothelial cell line (hCMEC/D3). 第 4 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (東京) 2010 年 11 月 28 日
- ⑤ Takashi Okura, Sayaka Kato, Yoshiharu Deguchi: RNA interference of organic cation transporters in hCMEC/D3 human brain endothelial cells. 第 25 回日本薬物動態学会年会 (東京), 2010 年 10 月 7 日
- ⑥ Sayaka Kato, Takashi Okura, Yoshiharu Deguchi: Transport of uric acid across brain barrier system. 第 25 回日本薬物動態学会年会 (東京), 2010 年 10 月 7 日
- ⑦ 黄倉 崇、加藤清香、Pierre-Oliver Couraud、出口芳春: オキシコドンの薬効発現に寄与する血液脳関門のトランスポーター. 第 4 回日本緩和医療薬学会年会 (鹿児島), 2010 年 9 月 25 日
- ⑧ 下村慶太、黄倉 崇、加藤清香、Pierre-Oliver Couraud、寺崎哲也、出口芳春: ヒト血液脳関門細胞を用いた有機カチオン/プロトン交換輸送体の機能解析. 日本薬学会第 25 年会 (徳島), 2010 年 5 月 14 日
- ⑨ Takashi Okura, Keita Shimomura, Sayaka Kato, Pierre-Oliver Couraud, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: The human blood-brain barrier in vitro model (hCMEC/D3) expresses functionally active organic cation/proton antiporter for CNS-acting cationic drugs. 第 24 回日本薬物動態学会年会 (京都), 2009 年 11 月 27-29 日
- ⑩ Takashi Okura, Yoshiharu Deguchi: Organic cation transport across the blood-brain barrier. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference (Sendai) June 28-July 2, 2009
- ⑪ Sayaka Kato, Takashi Okura, Takenori Sato, Tomohiko Wakayama, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi: Transport function and expression of PMAT in brain barrier system. 8th Cerebral Vascular Biology International Conference (Sendai) June 28-July 2, 2009
- ⑫ Keita Shimomura, Takashi Okura, Sayaka

Kato, Margareta Hammarlund-Udenaes,  
Pierre-Oliver Couraud, Tetsuya  
Terasaki, Yoshiharu Deguchi:  
Characterization of the CNS-acting  
cationic drug transport at the human  
blood-brain barrier using human  
immortalized brain capillary  
endothelial cells (hCMEC/D3). 8th  
Cerebral Vascular Biology  
International Conference (Sendai)  
June 28-July 2, 2009

- ⑬ 加藤清香、黄倉 崇、佐藤武則、若山友彦、大槻純男、寺崎哲也、出口芳春：ラット脳関門における有機カチオントランスポーターPMATの発現解析。日本薬剤学会第24年会（静岡），2009年5月21日
- ⑭ 下村慶太、黄倉 崇、加藤清香、Margareta Hammarlund-Udenaes、寺崎哲也、出口芳春：ヒト血液脳関門モデル細胞を用いた有機カチオン性薬物の輸送解析。日本薬剤学会第24年会（静岡），2009年5月21日

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし