

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790150

研究課題名（和文）炎症惹起時血液脳関門 PGE₂ 排出低下の分子機構：薬剤誘発性脳炎副作用回避への展開研究課題名（英文）Attenuation of PGE₂ elimination across the blood-brain barrier in inflammation: application to avoidance of neural side-effect of drugs

研究代表者

赤沼 伸乙 (Shin-ichi Akanuma)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30467089

研究成果の概要（和文）：リポ多糖を投与したマウス（LPS 投与マウス）における、血液脳関門（BBB）を介した³H]prostaglandin (PG) E₂ 排出を *in vivo* brain efflux index 法によって評価した。LPS マウスにおいて大脳皮質に投与した³H]PGE₂ 排出の消失半減期は saline 投与マウスと比較し 7.7 倍上昇したことから、炎症時において BBB を介した PGE₂ 排出機能は低下していることが示された。また、β-lactam 系抗生物質である cefmetazole の静脈内投与によって、その排出機能は薬物投与によってさらに阻害されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：³H]Prostaglandin (PG) E₂ efflux transport across the BBB in lipopolysaccharide (LPS)-treated mice was evaluated using *in vivo* brain efflux index method. The half-life of ³H]PGE₂ administrated in the cerebral cortex of LPS-treated mice was 7.7 times greater than that of saline-treated mice, suggesting that PGE₂ efflux transport across the BBB is attenuated in inflammation. Moreover, ³H]PGE₂ efflux transport in LPS-treated mice was inhibited by intravenous administration of cefmetazole. This result indicates that PGE₂ efflux transport across the BBB is further attenuated by drug administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：血液脳関門、プロスタグランジン、リポ多糖、炎症、β-ラクタム系抗生物質、クリアランス、排出輸送機能、有機アニオン輸送担体

1. 研究開始当初の背景

Swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus (通称-新型インフルエンザウイルス)のパンデミックに応じ、感染及び炎症応答に対し様々な投薬治療が行われている。しかし、インフルエンザ脳炎による死亡事例や痙攣発作、それに追従する予後の知能指数 (IQ) 低下などの神経障害が後を絶たず、加えて連日のマスコミュニケーションによる感染増大

の報道から、漫然とした不安は国民に増大する一方である。一方で、炎症時に用いられる薬物 (NSAIDs 及び抗ウイルス薬、抗生物質など) が副作用として前述した症状を呈するため、炎症時という状況に最も適した薬剤選択及び投与設計を行う必要がある。即ち、炎症時に投与薬物による副作用及び予後不良を発生させないような投与計画を立案し、インフルエンザウイルスに感染したとしても

適切な薬物治療が受けられる医療環境を作り上げるのが、急務の課題である。

脳における過剰な炎症応答及びそれに応ずる興奮神経毒性及び神経細胞死について、prostaglandin E₂ (PGE₂) 介在型のシグナルが関与することが明らかにされている(Nature 391, 281-5 (1998), Eur. J. Physiol. 456, 837-46 (2008))。加えて、influenza virus 感染マウスでは脳において PGE₂ 合成酵素 (COX) の機能が上昇することが報告されている。従って、脳における過剰炎症及びそれに応答した神経障害を防ぐ戦略の一つとして、脳内 PGE₂ 濃度調節が有効な可能性が非常に高い。一方で、プロスタグランジンの不活性化酵素 (15-PGDH) は脳皮質部において活性は非常に低く(Brain Res. 39, 545-8 (1972))、脈絡叢には発現が認められるものの発達過程に伴って発現が減少する (Dev. Brain Res. 121, 145-55 (2000))。以上から、成人脳におけるプロスタグランジンの濃度調節は厳密に行われる必要があるにも関わらず、酵素的な不活性化はほとんど行われていないと考えられる。

炎症時には脳内 PGE₂ 濃度が上昇することが報告されており、さらに申請者は『Lipopolysaccharide (LPS) 惹起性炎症時には脳から血液脳関門 (BBB) を介した [³H]PGE₂ 排出は減弱する』ことを予備的に見出している。本結果は「炎症時に血液脳関門 PGE₂ 排出輸送担体の発現及び機能は低下している」を示唆している点であり、重要な点として「炎症時においてもある程度は PGE₂ 排出機能が保持されている」ということもまた明らかにしている。LPS 投与によって引き起こされる PGE₂ 排出抑制効果は免疫反応などを活性化させるためであるものと推測されるが、保持されている輸送機能が投与薬物によって阻害された場合、脳内 PGE₂ 濃度が過剰に蓄積し、脳に必要以上の PGE₂ 介在型炎症応答を引き起こし、痙攣などの神経障害を誘発する可能性が高い。

2. 研究の目的

本申請課題は申請者独自の仮説「炎症疾患時において血液脳関門 (BBB) における PGE₂ 輸送担体機能及び発現パターンはダイナミックに変動する」ことを実証することを第一の目的とする。さらに、炎症疾患時において BBB にて変化した PGE₂ 排出輸送担体の特徴を利用し、脳における過剰な炎症応答を回避させる炎症時や感染症時に用いるべき薬物の輸送担体プロファイルを提案することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炎症惹起マウス作成

マウスに対し LPS (E. coli. serotype O111:B4) を腹腔内投与 (3.0 mg/kg) し、24 時間通常飼育し、解析に用いた。Control として LPS の代わりに生理食塩水 (saline) を投与した。

(2) *In vivo* マウス脳から BBB を介した [³H]PGE₂ 排出輸送

Pentobarbital sodium をマウスに対し腹腔内投与し (50 mg/kg)、マウス頭部を脳固定装置 (SR-5M; Narishige) に固定し頭皮を除いた。頭蓋骨上の bregma を基準点とし、X 軸方向 3.8 mm の地点に歯科用ドリルを用いて直径 1 mm の穴を開けた。5 μL 用マイクロシリンジにポリスチレンチューブを介して外形 330 μm の注射針を接続させ、その注射針を上述の穴の中に Z 軸方向 (頭蓋骨の面に垂直の方向) 2.5 mm の深さまで挿入させ、0.3 μL のトレーサー液を注入した。投与後のトレーサー液の backflux 防止を目的として、トレーサー液を投与後 4 分間、注射針及びマイクロシリンジを留置した。指定時間に投与側大脳を摘出し、2N NaOH 2.0 mL を加え、55°C で 3 時間インキュベートして可溶化した。液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor; PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を加え、攪拌後静置し、サンプル中の放射活性を測定した。

大脳皮質へ阻害剤及び薬物を前投与する際には、トレーサー液を microinjection する 5 分前にポリスチレンチューブを介して外形 330 μm の注射針を接続させた 50 μL 用マイクロシリンジを用い、左大脳皮質に 10 μL の溶液を 2 分間かけて投与した。静脈内へ阻害剤及び薬物を投与する際には、トレーサー液を microinjection する 15 分前に頸静脈へ 200 μL の溶液を投与した。なお、静脈内投与後 5 分間、ホットプレート (37°C) 上に静置し、マウスの体力を回復させた。

BBB を介した [³H]PGE₂ 排出は、薬物が BBB を介して脳から排出された割合を Brain Efflux Index (BEI) と定義されることから、脳内残存率 (100-BEI) を指標に評価した。この (100-BEI) 値の時間推移を片対数プロットし、その傾きから見かけの BBB 排出速度定数 (k_{eff}) を算出し、被検化合物排出速度定数及び消失半減期を得た。

(3) マウス脳毛細血管画分における有機アニオン輸送担体タンパク質発現量定量

マウス大脳皮質毛細血管画分は dextran による capillary depletion 法と glass beads column 法を組み合わせで調製した。本脳毛細血管画分を還元的アルキル化した後に、trypsin 消化した。Trypsin 消化したサンプルに内標準物質

(有機アニオン輸送担体特異的 trypsin 消化産物ペプチドの同位体標識体)を加えた後、Kemiie らの方法に従って (Pharm. Res. 25, 1469-83 (2008)), LC-MS/MS (Agilent 1100-API5000) にて、サンプルに含有する有機アニオン輸送担体由来 trypsin 消化産物 (ペプチド) を定量した。

(4)細胞膜小胞へのβ-ラクタム系抗生物質取り込み輸送

Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) 細胞膜小胞 (ジェノメンブレン) を反応開始前に 5 分間プレインキュベートし、あらかじめ 10 分間プレインキュベートした β-ラクタム系抗生物質含有 transport assay buffer を加えることで反応を開始させた。指定時間経過後、4°C の反応停止液を加え、直ちに減圧条件下 0.22 μm polyvinylidene difluoride membrane filters (Durapore®, Millipore Corporation) へ溶液を apply した。さらに 3 mL 反応停止液を減圧条件下 3 回洗浄し、洗浄終了後の membrane filter に 1 mL methanol を加え、shake (室温, 1 時間) することで化合物を抽出した。抽出液は遠心濃縮機 (CC-105; TOMY, Tokyo, Japan) にて濃縮し、0.1%ギ酸を加えて定量サンプルとした。サンプル中 β-Lactam 系抗生物質の定量は LC-MS/MS にて行った。

4. 研究成果

(1) 炎症モデルマウスにおける PGE₂ 排出輸送の減弱とその過程への薬物投与の影響

炎症モデルである LPS 投与マウスにおける [³H]PGE₂ 排出輸送を mouse BEI 法にて評価した。Saline 投与マウスと比較し LPS 投与マウスでは [³H]PGE₂ 脳内残存率は上昇していた。その脳内残存率の経時変化を測定し、 [³H]PGE₂ 消失半減期を算出した結果、LPS 投与マウスにおける消失半減期は 121 分であり、saline 投与マウスと比較し 8 倍高値であった (16 分)。従って、炎症時において BBB を介した PGE₂ 排出輸送は減弱していることが示唆された。

排出輸送が減弱する要因として、BBB に発現する有機アニオン輸送担体タンパク質発現量が変動している可能性が考えられた。そこで、LC-MS/MS による膜タンパク質絶対定量法によって、LPS 投与マウス脳毛細血管 whole lysate サンプル中の各種有機アニオン輸送担体発現量を解析した。申請者は BBB を介した PGE₂ 排出輸送に少なくとも一部 MRP4 が関与することを明らかにしている。LPS 投与マウス脳毛細血管サンプルにおける MRP4 タンパク質発現量は saline 投与マウスのものと比較し有意な変化は示されなかった。また、他の有機アニオン輸送担体として、organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) 及び

organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4/Slc1a4) タンパク質発現量は、それぞれ 26% 及び 39% 低下していた。これらのトランスポーター発現量の低下度は BBB を介した PGE₂ 排出輸送減弱の程度 (約 87%) と比較し小さかった。従って、LPS 投与マウスで観察された BBB を介した PGE₂ 排出輸送低下は BBB 有機アニオン輸送担体発現量変動によるものではないと考えられた。その他、減弱が引き起こされる要因として、BBB 形質膜における有機アニオン輸送担体局在パターンの変動、そして BBB の実体である脳毛細血管内皮細胞内における Mrp4 輸送阻害物質 (内因性 PGE₂ など) の合成量上昇が挙げられ、より詳細な解析が必要と判断された。

LPS 投与マウス [³H]PGE₂ 脳内残存率は非標識 PGE₂ 共存によって上昇した。本結果は、BBB において担体介在型の PGE₂ 排出輸送は一部維持されていることを示唆している。申請者は、正常マウスにおいて β-lactam 系抗生物質である cefmetazole の脳内及び静脈内投与によって BBB を介した PGE₂ 排出輸送は阻害されることを明らかにしている (雑誌論文 ③)。LPS 投与マウスにおいてもまた、cefmetazole の脳内投与及び静脈内投与によって BBB を介した [³H]PGE₂ 排出輸送は阻害された。本結果から、正常時と同様に炎症時においてもまた、BBB を介した PGE₂ 排出輸送は薬物投与によって阻害されることが示唆された。

(2) In vitro 実験による MRP4 に認識される薬物の特徴解明

炎症時において PGE₂ 排出を阻害する cefmetazole は強力な MRP4 阻害剤である。β-ラクタム系抗生物質は炎症時に汎用される薬物であることから、どのような β-ラクタム系抗生物質が MRP4 に認識されるか明らかにすることは、炎症時における適切な抗生物質選択に繋がることを期待される。そこで、MRP4 発現細胞膜小胞を用いた *in vitro* 輸送実験にて、MRP4 を介した各種 β-ラクタム系抗生物質の輸送を解析し、MRP4 に認識される β-ラクタム系抗生物質の構造的特徴を明らかにすることを目的とした。

MRP4 発現細胞膜小胞への高い取り込み輸送が示されたのは cefotiam、cefdinir、ceftriaxone などの生理的にはアニオン帯電するセファロsporin系抗生物質 (アニオン型セファロsporin) であった。一方、cephalexin や cefixime などの生理的には中性帯電するセファロsporin系抗生物質 (両性イオン型セファロsporin) について、アニオン型セファロsporinと比較し、MRP4 は低い輸送活性を示した。また、MRP4 は両セファロsporinについて、reference として用いた MRP4 基質 methotrexate 以上の輸送活性

を示したが、セファロスポリン系抗生物質とは異なる中心構造を有するペニシリン系抗生物質などについて、methotrexate と比較し低い輸送活性であった。以上の結果を総合すると、MRP4 はアニオン型セファロスポリンに対し高い輸送活性を示すことが明らかとなった。

このアニオン型セファロスポリンの MRP4 を介した輸送について、他の MRP4 発現細胞膜小胞の報告とも総合して解析すると、高分子量のアニオン型セファロスポリンは MRP4 を介し強く輸送される傾向が示された。従って、MRP4 は「高分子量アニオン型セファロスポリン」に対する認識性が高いことが示唆された。

(3) 総括

本研究の結果、炎症時において BBB を介した PGE₂ 排出輸送は遅延することが示唆された。これまで炎症時における脳内 PGE₂ 濃度上昇は PGE₂ 合成酵素発現量上昇でのみ解釈されていた。本知見は炎症時における脳内 PGE₂ 濃度変動、それに伴う脳細胞シグナル応答に BBB が一部役割を果たすという点で、BBB の神経生理学的重要性提案へ繋がること期待される。

また、炎症時における BBB を介した PGE₂ 排出は、アニオン型セファロスポリンである cefmetazole の静脈内投与によって阻害された。従って、炎症疾患時のセファロスポリン誘発型中枢神経副作用に、BBB を介した PGE₂ 排出輸送阻害が関与することが考えられた。また、本研究にて MRP4 と各種 β-ラクタム系抗生物質輸送との相関性が一部明らかとなった。本知見は、炎症時での BBB を介した PGE₂ 排出阻害による脳内過剰炎症を回避するための投与薬選択に繋がると期待される。

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 4 件)

- ① Akanuma S., Uchida Y., Ohtsuki S., Kamiie J., Tachikawa M., Terasaki T., Hosoya K., Attenuation of prostaglandin E₂ elimination across the mouse blood-brain barrier in lipopolysaccharide-induced inflammation and additive inhibitory effect of cefmetazole, *Fluids Barriers CNS*, 査読有, 8:24, 2011, DOI: 10.1186/2045-8118-8-24
- ② Akanuma S., Uchida Y., Ohtsuki S., Kamiie J., Tachikawa M., Terasaki T., Hosoya K., Molecular-weight-dependent, anionic-substrate-preferential transport of β-lactam antibiotics via multidrug resistance-associated protein 4, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読

有, 26, 2011, 602-11, DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-063

- ③ Akanuma S., Hosoya K., Ito S., Tachikawa M., Terasaki T., Ohtsuki S., Involvement of multidrug resistance-associated protein 4 in efflux transport of prostaglandin E₂ across mouse blood-brain barrier and its inhibition by intravenous administration of cephalosporins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 査読有, 333, 2010, 912-9, DOI: 10.1124/jpet.109.165332
- ④ Ohkura Y., Akanuma S., Tachikawa M., Hosoya K., Blood-to-retina transport of biotin via Na⁺-dependent multivitamin transporter (SMVT) at the inner blood-retinal barrier, *Exp. Eye Res.*, 査読有, 91, 2010, 387-92, DOI: 10.1016/j.exer.2010.06.010

[学会発表] (計 5 件) うち招待講演 1 件

- ① Akanuma S., Ozeki G., Tachikawa M., Hosoya K., Role of organic anion transporter 3 at the blood-cerebrospinal fluid barrier in the elimination of prostaglandin E₂ produced in the brain, 日本薬物動態学会第 26 回年会、2011 年 11 月 16 日-18 日、広島県広島市
- ② 赤沼 伸乙、伊藤 慎悟、内田 康雄、立川 正憲、大槻 純男、寺崎 哲也、細谷 健一、血液脳関門 PGE₂ 排出機能への ABC トランスポーター MRP4 阻害薬投与の影響、第 6 回トランスポーター研究会年会、2011 年 6 月 11 日-12 日、宮城県仙台市 (招待講演)
- ③ 赤沼 伸乙、内田 康雄、立川 正憲、大槻 純男、寺崎 哲也、細谷 健一、Lipopolysaccharide 投与による血液脳関門 prostaglandin E₂ 排出輸送の変動、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 28 日-31 日、静岡県静岡市
- ④ 赤沼 伸乙、伊藤 慎悟、内田 康雄、大槻 純男、立川 正憲、寺崎 哲也、細谷 健一、血液脳関門を介した prostaglandin E₂ 排出輸送と薬物の相互作用、第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010 年 11 月 29 日-30 日、富山県富山市
- ⑤ Akanuma S., Uchida Y., Ohtsuki S., Tachikawa M., Terasaki T., Hosoya K., Prostaglandin E₂ efflux transport via the blood-brain barrier in lipopolysaccharide-induced inflammatory model mice, 日本薬物動態学会第 25 回年会、2010 年 10 月 7 日-9 日、埼玉県さいたま市

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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