

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790148

研究課題名(和文) 神経活動依存的な血液脳関門 PGE2 排出輸送機構変動とその分子的要因解明

研究課題名(英文) Neural activity-dependent attenuation of PGE2 elimination across the blood-brain barrier and molecular mechanisms of this attenuation

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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：脳内L-グルタミン酸(L-Glu)が血液脳関門(BBB)を介したプロスタグランジンE2(PGE2)排出輸送に与える影響をbrain efflux index法にて評価した。大脳皮質へのL-Glu前投与によって、ラットBBBを介したPGE2排出は阻害された。このL-GluによるPGE2排出減弱はN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬共存にて正常化した。さらに、NMDA受容体作動条件下にて、PGE2排出輸送はL-Gluと同様に減弱した。以上から、L-グルタミン酸はBBBを介したPGE2排出輸送を減弱させること、その過程にはNMDA受容体が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：L-Glutamate is reported to be involved in the excitatory neural responses. Using brain efflux index method, I evaluated the effect of intracerebral L-glutamate on prostaglandin E2 (PGE2) elimination across the blood-brain barrier (BBB). By the pre-administration of L-glutamate, the elimination of PGE2 across the BBB was attenuated. This attenuation of PGE2 elimination was abolished by the co-existence of antagonists for N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type L-glutamate receptors. In addition, the elimination of PGE2 across the BBB was attenuated by the pre-administration of agonists for NMDA-type L-glutamate receptors as well as L-glutamate. These results suggest that L-glutamate attenuates PGE2 elimination across the BBB via NMDA-type L-glutamate receptor-mediated processes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：PGE2 血液脳関門 グルタミン酸 プロスタグランジン 神経伝達物質 有機アニオン輸送担体 クリアランス グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、脳内神経伝達物質の恒常性維持破綻は様々な神経症状・疾患に関与することが明らかにされている。L-グルタミン酸 (L-glutamate) などの興奮性神経伝達物質は Na^+ や Ca^{2+} などの神経細胞への流入、それに伴う脱分極を誘発し、この神経細胞脱分極はてんかん発作や、拡延性抑制 (spreading depression) を前兆とする偏頭痛などの中枢神経症状を引き起こす要因となることが明らかにされている。これら中枢神経疾患は症状に合わせた使用薬物の初期選択が治療の上で非常に重要であるものの、その選択は現在非常に難しい。これら疾患は日常生活の質を低下させるだけではなく、生産性も低下させると考えられ、事実、アメリカの場合、片頭痛が要因で年間 170 億ドル程度まで国の生産性が低下していると報告されている (Arch. Intern. Med. 159, 813-8 (1999))。従って、これら中枢神経疾患は個人だけではなく社会全体の利益上、速やかに対策を講じる必要がある。

Prostaglandin E_2 (PGE_2) は興奮性神経伝達促進因子であり、発熱、痙攣発作や発痛などに関与することが報告されている (J. Biol. Chem. 282, 32676-88 (2007))。また、実験的に痙攣及び偏頭痛を誘発させることによって、脳内もしくは末梢組織における PGE_2 量は上昇することが報告されている (Prostaglandins Other Lipid Mediat. 71, 205-16 (2003); Headache 50, 844-51 (2010))。従って、これら疾病時では脳内 PGE_2 恒常性維持機構は変動している可能性が考えられ、その変動機構解明はこれら疾病の発症・進行メカニズムの理解、そして治療法確立において重要である。

申請者は脳における薬物の効果、そして内因性化合物の脳内量調節及びその変動への血液脳関門輸送担体の役割を解明することを目的とし、これまで独自の研究を推進してきた。脳内 PGE_2 について、脳実質では PGE_2 を不活性化する酵素活性が非常に低いことが報告されており (Cerebrospinal Fluid Res. 5:5 (2008))、神経細胞やグリア細胞にて産生された PGE_2 がどのように排除されるか、「脳にプロスタグランジンが存在する」という報告から約 45 年経過しても不明なままであった。申請者はこれまでの研究から、BBB を介し PGE_2 が排出輸送され、その過程に ABC 輸送担体 MRP4 が関与すること、炎症惹起時にその排出機構は減弱することを見出している。以上の結果から、BBB は脳内 PGE_2 クリアランスに寄与し、その機構は外的環境に応じてダイナミックに変動することが示唆された。この排出機

構のダイナミックな変動について検討を進めた結果、大脳皮質への高濃度塩化カリウム投与時や L-Glu 投与によって、 PGE_2 排出が阻害されることを予備的に見いだした。大脳皮質へのカリウムイオン投与にて spreading depression が誘発されること、グルタミン酸受容体作動時には神経細胞の脱分極が誘発されることがそれぞれ報告されている。以上の点から、「脳における神経活動の脱分極 (即ち、興奮性神経伝達活性化) は BBB における PGE_2 排出輸送を減弱させる」と仮説立てられる。

2. 研究の目的

本研究は申請者独自の仮説「神経活動が血液脳関門 PGE_2 排出輸送を変動させ、脳内 PGE_2 介在作用を調節する」の実証を目標とする。神経活動、特に興奮性神経伝達の亢進は偏頭痛や各種神経変性疾患の発症・進行に関与することが知られている。そこで、特に興奮性神経伝達を介在する L-glutamate による、BBB を介した PGE_2 排出輸送機能の変化を解析すると共に、その過程に関与する分子・機構の解明を目的とし、研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ラット大脳皮質から BBB を介した PGE_2 排出輸送機能評価 (brain efflux index 法)

麻醉下 Wistar 系統雄性ラット大脳皮質 Par2 領域に放射標識 PGE_2 (^3H] PGE_2) 及び BBB 非透過性物質 (^{14}C] 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 ^{14}C 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) ラット脳スライス取り込み実験による脳内 PGE_2 分布容積算出

安楽死処理後の Wistar 系統雄性 4-6 週齢ラットから大脳皮質を単離し、即座にマイクロスライサー (Leica) を用い、厚さ約 400 μm の脳スライスを調製した。調製した脳スライスを加温した生理バッファー (37°C) にて 5 分間プレインキュベーションし、次いで ^3H] PGE_2 含有生理的バッファーに移すことで、取り込み実験を開始した。反応時間

経過後、氷冷生理バッファーにて洗浄後、水酸化ナトリウム容器にて可溶化し(55°C, 1時間)、液体シンチレーションカクテルを加え、十分に攪拌後、放射活性を測定した。定常状態に達した ^3H PGE₂取り込み (mL/g brain) と、脳スライス付着容積との差を、 ^3H PGE₂の分布容積とした。

(3) 大脳皮質への L-Glu 及びその他薬物投与処理

L-Glu 及びその他受容体作動薬・拮抗薬を生理バッファーに溶解させ、各種解析実施5分前に大脳皮質へ 50 μL 投与した。対照実験として、生理的バッファーを投与し、解析を実施した。

(4) ラット大脳皮質における

mPGES-1 タンパク質発現量解析

L-Glu 投与処理側大脳皮質を単離し、crude membrane fraction を調製した。本サンプルを、抗 mPGES-1 抗体 (*J. Neurochem.*, 123, 750-60 (2012)) を用いた Western blot 解析に供した。

4. 研究成果

(1) ラット BBB を介した PGE₂ 排出輸送特性評価

本解析を実施するにあたり、*in vivo* ラット BBB を介した PGE₂ 排出輸送特性を評価した。大脳皮質に投与した ^3H PGE₂ は経時的に消失し、その消失半減期は 14 分、消失速度定数 ($k_{el, \text{BBB}}$) は $5.07 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ であった。脳スライスへの ^3H PGE₂ 取り込み解析の結果、その取り込みは 20 分以降定常状態に達していると判断され、その分布容積 ($V_{d, \text{brain}}$) は 1.19 mL/g brain と算出された。これら $k_{el, \text{BBB}}$ 及び $V_{d, \text{brain}}$ の積から算出した BBB を介した PGE₂ 排出輸送クリアランス ($CL_{\text{BBB}, \text{eff}}$) は $60.1 \mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$ であった。この BBB を介した排出輸送クリアランスは、脳脊髄液中からの PGE₂ 消失クリアランスと比較し高値であったことから、BBB を介した PGE₂ 排出輸送は脳内 PGE₂ 消失に重要な役割を果たすことが示唆された。

In vivo ラット BBB を介した ^3H PGE₂ 排出輸送は非標識 PGE₂ 共存によって有意に阻害されたことから、この排出輸送は担体介在型であることが示唆された。この排出輸送を担う分子を明らかにするため、各種化合物を用いた阻害実験を実施した。その結果、 ^3H PGE₂ 排出輸送は organic anion transporter 3 (OAT3) 及び multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) の基質・阻害剤と報告されている

benzylpenicillin 及び Ro64-0802 共存にて協力的に阻害された。従って、BBB を介した PGE₂ 排出輸送には OAT3 及び MRP4 が主に関与することが示唆された。

(2) 大脳皮質への L-Glu 投与による BBB を介した PGE₂ 排出輸送の減弱

大脳皮質に L-Glu が高濃度で存在するような疾患時において、脳内 PGE₂ 濃度が上昇することが報告されている。この上昇には病態時脳において、PGE₂ の過剰合成に関与する microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) のアップレギュレーションが関与すると言われている。一方、大脳皮質に L-Glu 溶液 (50 mM) を投与後、投与側大脳皮質を単離し、mPGES-1 タンパク質発現量を解析した結果、コントロールと比して劇的な上昇は観察されなかった。従って、脳内に L-Glu が過剰に存在した際に認められる脳内 PGE₂ 濃度上昇には、mPGES-1 アップレギュレーション以外の機構が関与する可能性が考えられた。そこで、L-Glu 投与後に BBB を介した PGE₂ 排出輸送を brain efflux index 法にて評価した結果、有意な排出低下が示された。従って、脳内過剰 L-Glu が誘発する脳内 PGE₂ 上昇には、少なくとも一部、BBB を介した PGE₂ 排出輸送の低下が関与することが示唆された。

この排出輸送低下を誘発する因子を明らかにするため、各種 L-Glu 受容体作動薬・拮抗薬を用いた解析を実施した。L-Glu 受容体の一つ、NMDA 受容体の拮抗薬を L-Glu 溶液に共存させることによって、L-Glu 投与時に示された ^3H PGE₂ 排出輸送低下は観察されなくなった。さらに、NMDA 受容体アゴニスト投与によって、BBB を介した PGE₂ 排出輸送は、L-Glu 投与時と同様に低下した。一方、代謝型 L-Glu 受容体 (mGluR) 作動薬の投与では、BBB を介した PGE₂ 排出輸送は変化しなかった。以上の結果から、L-Glu 投与による PGE₂ 排出輸送の低下は NMDA 受容体を介し誘発されることが示唆された。

(5) まとめ

本研究の成果として、以下の二つが挙げられる。

ラット BBB を介し PGE₂ は排出輸送され、その過程には OAT3 及び MRP4 が関与する。

本 BBB を介した PGE₂ 排出輸送は脳内過剰 L-Glu 存在下にて減弱し、その過程には NMDA 受容体が関与する。

L-Glu が介在する興奮性神経伝達が過剰な中枢神経系疾患時には脳内 PGE₂ 濃度が上昇す

ることが報告されている。本研究成果にて、この脳内 PGE₂ 濃度上昇への血液脳関門 PGE₂ クリアランス機構が果たす役割の一部が明らかとなった。本成果は、将来的には、興奮性神経伝達が過剰である中枢神経系疾患、例えばアルツハイマー病などにおいて観察される脳内炎症応答の制御に繋がるものと期待される。

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3件)

Akanuma S., Higuchi T., Higashi H., Ozeki G., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K., Transporter-mediated prostaglandin E₂ elimination across the rat blood-brain barrier and its attenuation by the activation of N-methyl-D-aspartate receptors, *Drug Metab. Pharmacokinet.* (印刷中); DOI, 10.2133/dmpk.DMPK-14-RG-004 (査読有)

Akanuma S., Hirose S., Tachikawa M., Hosoya K., Localization of organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a4 and Oatp1c1 at the rat blood-retinal barrier., *Fluids Barriers CNS*, 10:29 (2013); DOI, 10.1186/2045-8118-10-29 (査読有)

立川 正憲、赤沼 伸乙、寺崎 哲也, 脳関門プロスタグランジン輸送の分子病態生理, *細胞工学*, 32, 946-49 (2013); URL, <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901467.html> (査読無)

[学会発表](計5件)

赤沼 伸乙、樋口 貴則、東 秀行、小関剛、立川 正憲、久保 義行、細谷 健一; NMDA 受容体を介した大脳皮質内 L-glutamate による prostaglandin E₂ 排出輸送低下; 日本薬学会第 134 年会, 平成 26 年 3 月 27 日-30 日, 熊本

Akanuma S., Higuchi T., Higashi H., Ozeki G., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Attenuation of prostaglandin E₂ efflux transport across the rat blood-brain barrier via N-methyl-D-aspartate receptor activation; 日本薬物動態学会第 28 年会, 平成 25 年 10 月 9 日-11 日, 東京

Akanuma S., Higashi H., Higuchi T., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Attenuation of prostaglandin E₂ elimination across the rat blood-brain barrier by intracerebral L-glutamate administration; 10th

international conference on cerebral vascular biology, 平成 25 年 6 月 18 日-21 日, Montreal (Canada)

Akanuma S., Murakami K., Tachikawa M., Kubo Y., Hosoya K.; Profile of hemichannels mRNA expression at the blood-brain and inner blood-retinal barriers in mice; 日本薬物動態学会第 27 回年会, 平成 24 年 11 月 20 日, 東京

東 秀行、樋口 貴則、赤沼 伸乙、久保義行、細谷 健一; NMDA 型グルタミン酸受容体を介した血液脳関門プロスタグランジン E₂ 排出抑制; 日本薬学会北陸支部平成 24 年度第 124 回例会, 平成 24 年 11 月 18 日, 富山

[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

<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