

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460199

研究課題名(和文)薬物のヒト脳移行性を予測する新規実験的評価法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel experimental evaluation method for predicting the drug delivery to the brain in human

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は国際的に信頼性のあるヒト脳毛細血管内皮細胞hCMEC/D3細胞株を用い、ヒト血液脳関門(BBB)の薬物輸送機能を予測する信頼性の高い実験的評価法を開発することである。本研究の成果として、1) 複数の薬物のヒトBBB輸送機能を評価できるインビトロカクテルドーシング法を確立することができた。加えて、前臨床試験段階で有用となるインビボカクテルドーシング/マイクロダイアリシス法を確立した。2) hCMEC/D3細胞を用いた新規培養法について、細胞表面を循環してシェアストレスをかけた循環培養法について検討し、重要な情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study are to develop reliable experimental-method(s) for predicting functions of human blood-brain barrier (BBB), using hCMEC/D3 cells, an in vitro human BBB model. As for the research achievements, 1) the in vitro cocktail dosing method could be developed for evaluating the human BBB function. In addition, in vivo microdialysis method with cocktail-dosing could be developed. The latter method will be important for making the preclinical study more efficient. 2) We could gain the important information about a novel and flow-based cultivation method with shear stress.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 ヒト脳移行性 トランスポーター 有機カチオン性薬物 ヒト血液脳関門モデル細胞 循環培養システム

1. 研究開始当初の背景

我が国における高齢者人口の割合は 2010 年で 23%、2030 年には 30%を超えると予想されている。高齢者人口の増加に伴い認知症などの中枢疾患に罹患する患者が増加している。優れた中枢治療薬の開発は患者の QOL の向上のみならず我が国の医療費削減にとって重要な課題である。新規中枢治療薬の開発におけるヒト臨床試験の成功率は 5%と低い。その主な原因は、候補化合物の BBB 透過性が実験動物で得られた結果と大きく乖離していることによる。そのため、臨床試験の段階で予期せぬ中枢毒性が現れるか、期待した効果が得られないことがある。候補化合物のスクリーニングの段階において、ヒトにおける脳移行性が予測できない限り、この成功率を高めることは困難である。

薬物の脳移行性は BBB の物質輸送能に強く依存する。BBB の実体である脳毛細血管内皮細胞は、末梢血管と異なり細胞同士が密着結合で連結しており、脳と血液間の物質交換は経細胞膜輸送過程により制御されている。脳毛細血管内皮細胞の脂質膜構造や機能性タンパク質の発現プロファイルおよび発現量に種差がある。このことは、実験動物で得られたデータを単純にヒトにスケールアップすることが困難であることを示している。ヒトの BBB を介した薬物透過速度を直接測定する方法としてポジトロン断層法 PET などのイメージング技術が開発されているが、汎用されるに至っていない。また、ヒト脳毛細血管内皮細胞の脂質構成を模倣した人工脂質膜、あるいは特定の遺伝子を動物由来のホスト細胞に導入した発現細胞を用いる透過実験法が代替的に使われているものの、これらはヒト BBB の全ての機能を再現したものではない。ヒトの BBB を介した薬物の輸送機能を効率的かつ信頼性の高い実験法で評価し、ヒト個体の脳移行性を予測する方法論の開発が望まれている。

近年、コシヤン研究所の Couraud 博士 (研究協力者) らによってヒトの脳毛細血管内皮細胞の不死化細胞株 (hCMEC/D3 細胞) が樹立された (FASEB J. 19, 1872(2005))。この細胞は、ヒト BBB モデルとして国際的に評価されている細胞株の 1 つであり、動物由来の脳毛細血管細胞株に比べ、BBB の特徴であるタイトジャンクションタンパク質の発現が多く、かつ血液側と脳側細胞膜の極性が保持されている (J. Cereb. Blood Flow Metab, 28, 312- 328(2008))。また、栄養物質を脳に供給する 4 種のトランスポーターおよび 2 種のレセプター、さらに BBB の動的バリアー機能の実体である 7 種の排出トランスポータータンパク質の発現が確認されている (Mol. Pharm, 2012, 10, 289(2013))。さらに、アニオン性薬物を輸送する OATP2A 遺伝子の発現に加え (Mol. Pharm., 7, 1057(2010))、申請者らのグループはカチオン性薬物を輸送する OCTN1、OCTN2 および PMAT のトランスポ

ーター遺伝子が比較的多く発現することを明らかにした。このように、hCMEC/D3 細胞における薬物輸送体の遺伝子およびタンパク質の発現が明らかにされつつあるが、薬物の輸送機能との関連はほとんど明らかにされていない。この理由は、多くの薬物の輸送機能をハイスループットで評価する汎用性の高い実験法がなかったこと、および BBB を介した血液から脳側または脳から血液側への方向性のある経細胞輸送 (ベクトリアル輸送) が検出可能な透過実験モデルがないためである。

2. 研究の目的

本研究は、国際的信頼性のあるヒト脳毛細血管内皮細胞 hCMEC/D3 細胞株を用い、薬物のヒト BBB 輸送機能並びに脳移行性を解明する汎用性の高い実験的評価法の確立を目的とする。そのため、1) LC-MS/MS を用い、複数の薬物の BBB 輸送機能を評価するカクテルドーシング法を確立する。さらに、2) 脳内を走行する毛細血管の解剖学的かつ生理学的環境を再現する 3 次元フロー培養モデルによる実験法を開発する。3) 分子実体既知および未知の輸送体に対する基質探索に本評価法を応用する。

3. 研究の方法

1) 薬物の BBB 輸送機能を網羅的に評価するインビトロカクテルドーシング法の確立: ディッシュ上に培養した hCMEC/D3 細胞に多種類の薬物を同時に添加し、細胞内への取り込み量を LC-MS/MS を用いて一斉分析することにより、薬物の BBB 輸送機構を網羅的に評価するカクテルドーシング法を確立する。標的輸送系としてプロトン/カチオン交換輸送系を選択した。数年間にわたる詳細な検討から、申請者は本輸送系が hCMEC/D3 細胞で機能していることを明らかにしている。プロトン/カチオン交換輸送系の 7 種の基質を検証セットとして、時間依存性、濃度依存性、阻害実験、駆動力、エネルギー依存性などの検討を行った。カクテルドーシング法を行う上で問題となるカクテル中の薬物数、分析検出感度、標的輸送分子に対する薬物間の阻害、初期取り込み速度に対する線形領域の確保、吸着アーティファクトの回避などについて詳細に検討し、普遍性のある実験条件を提案する。なお、LC-MS/MS による対象薬物の一斉分析については予備検討が終了しており、各薬物で 10 fmol/injection 以上の十分な定量感度が得られている。

2) hCMEC/D3 細胞を用いた新規フロー培養システムの構築: 培養液を還流し、シェアストレスを加えることで hCMEC/D3 細胞のタイトジャンクション形成能が高まることが報告されている (J. Cereb. Blood Flow Metab. 28, 312 (2008))。本研究課題において、まず、トランスウェル型フロー培養システムを用

いて、薬物透過実験のための実験法構築を試みた。透析ファイバー型フロー培養システムについては Couraud 博士らの方法 (J. Cereb. Blood Flow Metab., 28, 312 (2008)) を改良したシステムの構築を検討した。

3) 基質探索への応用: 上記で検討したインビトロカクテルドーシング法並びに新規培養法を用い、プロトン/カチオン交換輸送系の基質探索を行った。

4. 研究成果

1) インビトロカクテルドーシング法

プロトン/カチオン交換輸送系に認識される薬物の混合液7種をカクテル溶液とし、様々な条件下で細胞内取込み実験を行った。まず、カクテル溶液中の適正濃度と薬物数について検討した結果、薬物の総濃度が $20 \mu\text{M}$ を超えると、全ての薬物で取込み速度が減少した。プロトン/カチオン交換輸送系の K_m 値が $50 \mu\text{M}$ 近傍であることから、カクテル薬物の総濃度が標的輸送系を飽和しない $20 \mu\text{M}$ 以下の濃度であれば、LC/MS/MS の感度を考慮してカクテルの薬物数を増やすことが可能であることがわかった。

次にカクテルドーシング法で阻害実験が可能かを検討した。阻害剤として、プロトン/カチオン交換輸送系の基質および阻害剤であるピリラミンおよびジフェンヒドラミンを用いた結果、 0.1mM 以上の阻害剤濃度でカクテル溶液中の全ての薬物の取込みが有意に低下した。一方で、阻害剤として 1mM のトラマドールを用いたところ、メマンチンの取込みは他の薬物に比べ取込み量は変化しなかった。また、細胞内 pH をアルカリ化させた系において駆動力の検討を行った結果、カクテル薬物の全てにおいて、外向きプロトン勾配消滅に伴い取込み量の有意な減少がみられた。

以上から、hCMEC/D3 細胞のプロトン/カチオン交換輸送系を標的としたインビトロカクテルドーシング法において、試験薬物の濃度と数を適正化することにより、複数の薬物の輸送を同時に測定できることのみならず、阻害プロファイルおよび駆動力の検討から、試験薬物の輸送の共通性や差異を明らかにできることが示唆された。

2) インビボカクテルドーシング/マイクロダイアリス法

医薬品開発段階において、動物で得られた脳移行性のデータをヒトにスケールアップすることは重要な課題である。通常、脳移行性は脳/血漿間濃度比 (K_p 値) で評価されるが、血液脳関門透過性を直接評価できるパラメータは脳/血漿間非結合形濃度比 (K_{puu} 値) である。 K_{puu} 値はブレインマイクロダイアリス法を用いて直接測定することができるが、実験手技が難しいこと、実験時間が長いことからスルーポットの改善が望まれていた。申

請者らのグループは、この問題を解決するため、本助成金の一部を使い、インビボカクテルドーシング/マイクロダイアリス法について検討した。5種の薬物 (ジフェンヒドラミン、メマンチン、オキシコドン、ピリラミン、トラマドール) をカクテルとし、インビボカクテルドーシング/マイクロダイアリス法でラット BBB を介した輸送機構を同時測定した。その結果、BBB での相互作用がない領域にカクテル溶液の濃度を設定することにより、これら薬物の K_{puu} 値を同時に測定することが可能であった。5種の薬物の K_{puu} 値は全て $1.8 \sim 5.2$ の範囲にあり、これらの薬物がプロトン/カチオン交換輸送系に認識され脳内にアクティブに取り込まれる過去の報告に良く一致した。

3) hCMEC/D3 細胞を用いた新規フロー培養システムの構築

本研究課題の目的に、hCMEC/D3 を用いた新規フロー培養システムの構築がある。その一環としてトランスウェル型培養法における共培養系および循環システムを用いたシェアストレスの影響について検討した。hCMEC/D3 細胞の単独培養と比較し、ヒトアストロサイトとの共培養、Wnt シグナル経路賦活剤 (リチウム) 添加により、電気抵抗値は上昇し、細胞間隙マーカーの透過性は低下する傾向にあった。しかし、今のところ著しい変化は観察されなかった。最終年度において、透析ファイバー型フローシステム装置 (Flocel System, Flocel Inc.) を本助成金とは別の共同研究者から貸借し培養法について検討した。これについても現在のところタイトジャンクション形成の著しい改善はみられていない。

4) 基質探索への応用

本助成金で確立したインビトロカクテルドーシング法を応用し、市販中枢薬の中からプロトン/カチオン交換輸送系に認識性の高い薬物を探索した。その結果、単純拡散の寄与が少なく、標的トランスポーターに認識性の高い薬物としてバレニクリンをピックアップすることができた。

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) Kitamura A, Higuchi K, Okura T, Deguchi Y, Cocktail-dosing microdialysis study to simultaneously assess delivery of multiple organic-cationic drugs to the brain, 105, 935-940 (2016). (査読あり)
- 2) Okura T, Higuchi K, Deguchi Y, The blood-brain barrier transport mechanism controlling analgesic effects of opioid drugs in CNS, Yakugaku Zasshi, 135,

- 697-702 (2015). (査読あり)
- 3) Higuchi K, Kitamura A, Okura T, Deguchi Y, Memantine transport by a proton-coupled organic cation antiporter in hCMEC/D3 cells, an in vitro human blood-brain barrier model, Drug Metab Pharmacokinet, 30, 182-187 (2015). (査読あり)
 - 4) Okura T, Higuchi K, Kitamura A, Deguchi Y, Proton-coupled organic cation antiporter-mediated uptake of apomorphine enantiomers in human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3, Biol. Pharm. Bull, 37, 286-291 (2014). (査読あり)
 - 5) Kitamura A, Higuchi K, Okura T, Deguchi Y, Transport characteristics of tramadol in the blood-brain barrier, J. Pharm. Sci, 103, 3335-3341 (2014). (査読あり)
 - 6) Okura T, Kato S, Deguchi Y, Functional expression of organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2/SLC22A5) in human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3, a human blood-brain barrier model, Drug Metab Pharmacokinet. 29, 67-74 (2014). (査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

- 1) 黄倉 崇、樋口 慧、出口芳春, 麻薬性鎮痛薬の中核効果を制御する血液脳関門輸送機構, 日本薬学会第 134 回年会, 2014 年 3 月 27-30 日 (熊本大学、熊本県熊本市)
- 2) 樋口 慧、北村 敦、黄倉 崇、出口芳春, hCMEC/D3 細胞を用いたカクテル法による H⁺/有機カチオン交換輸送体基質探索の基礎的検討, 日本薬学会第 134 回年会, 2014 年 3 月 27-30 日 (熊本大学、熊本県熊本市)
- 3) 北村敦、樋口慧、黄倉崇、祖父江佳奈、福島貴人、出口芳春, 脳マイクロダイアリシス法を用いたカクテル投与による薬物の脳移行性評価, 日本薬剤学会第 29 回年会, 2014 年 5 月 20-22 日 (大宮ソニックシティビル、埼玉県大宮市)
- 4) 黄倉 崇、佐藤樹夏、樋口 慧、北村 敦、柄谷礼人、久保敬史、小林俊生、櫻庭美菜子、出口芳春, アポモルヒネの高い脳移行性を担う血液脳関門輸送のインビボ解析, 第 58 回薬学会関東支部大会, 2014 年 10 月 4 日 (昭和薬科大学、東京都町田市)
- 5) 北村敦、黒澤俊樹、樋口慧、黄倉崇、福島貴人、祖父江佳奈、出口芳春, 脳マイクロダイアリシス法による薬物カクテルの脳移行性評価, 第 58 回薬学会関東支部大会, 2014 年 10 月 4 日 (昭和薬科大学、東京都町田市)
- 6) Kitamura A, Higuchi K, Okura T, Deguchi Y, N-IN-ONE ASSAY FOR ASSESSING DRUG DELIVERY TO THE BRAIN BY BRAIN MICRODIALYSIS, 19th North American ISSX

- Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014. 10. 19-23 (San Francisco)
- 7) Deguchi Y, Kitamura A, Higuchi K, Okura T, TRANSPORT CHARACTERISTICS OF TRAMADOL AT THE BLOOD-BRAIN BARRIER, 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014. 10. 19-23 (San Francisco)
 - 8) Higuchi K, Kitamura A, Okura T, Deguchi Y, TRANSPORT CHARACTERISTICS OF MEMANTINE IN HUMAN BLOOD-BRAIN BARRIER MODEL CELLS, 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, 2014. 10. 19-23 (San Francisco)
 - 9) 樋口 慧、北村 敦、黄倉 崇、出口芳春, ヒト血液脳関門細胞における H⁺/有機カチオン交換輸送体輸送機能の多様性, 日本薬剤学会第 30 回年会 2015 年 5 月 20-23 日 (長崎ブリックホテル、長崎県長崎市)
 - 10) 黄倉 崇、樋口 慧、北村 敦、出口芳春, アポモルヒネエナンチオマーの血液脳関門輸送のインビボ解析, 日本薬剤学会第 30 回年会 2015 年 5 月 20-23 日 (長崎ブリックホテル、長崎県長崎市)
 - 11) Okura T, Higuchi K, Kitamura A, Deguchi Y, Blood-to-brain transport of apomorphine enantiomers by proton-coupled organic cation antiporter at the blood-brain barrier, 11th International Conference on Cerebral Vascular Biology, 2015. 7. 6-9 (Paris)
 - 12) Higuchi K, Kitamura A, Okura T, Deguchi Y, Involvement of functionally diverse proton-coupled organic cation antiporter in blood-brain barrier transport of memantine, 11th International Conference on Cerebral Vascular Biology, 2015. 7. 6-9 (Paris)
 - 13) 黒澤俊樹、東 昂翔、山崎有里奈、宮川諒、北村 敦、樋口 慧、黄倉 崇、出口芳春, カクテルマイクロダイアリシス法による薬物の脳移行性評価, 第 59 回薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日 (日本大学薬学部、千葉県船橋市)
 - 14) Higuchi K, Okura T, Uematsu Y, Kondo A, Ito H, Deguchi Y, Analysis of gene expression profiles related to the transport activity of the proton/organic cation antiport system in hCMEC/D3 cells, Barcelona BioMed Conference, Blood Brain Barrier, 2015. 11. 2-4 (Barcelona (Spain))
 - 15) Higuchi K, Okura T, Uematsu Y, Kondo A, Ito H, Deguchi Y, Gene expression profiles in hCMEC/D3 cells with different transport activities of proton/organic cation antiporter, 第 30 回日本薬物動態学会年会, 2015 年 11 月 12-14 日 (タワーホール船堀、東京都江戸

川区)

16) Higuchi K, Okura T, Deguchi Y et al, Histamine H1-receptor signaling in human blood-brain barrier cells, 第30回日本薬物動態学会年会, 2015年11月12-14日(タワーホール船堀、東京都江戸川区)

17) Higuchi K, Okura T, Deguchi Y, Memantine uptake mediated by a functionally diverse proton-coupled organic cation antiporter in human brain endothelial cells, The Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) Conference 2015, 2015. 11. 25-27 (Bangkok (Thailand))

[図書] (計1件)

1) 出口芳春、新薬剤学第3版(分布)、97-102 (2014)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/dotai/index.html>

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

黄倉 崇 (OKURA TAKASHI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号: 80326123

樋口 慧 (HIGUCHI KEI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号: 10625304

(3) 連携研究者

細山田 真 (HOSOYAMADA MAKOTO)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 00291659