

令和元年6月20日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08381

研究課題名(和文) ヒト血液脳関門有機カチオン-プロトン交換輸送系の薬物認識性と実体の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the drug recognition properties and molecular entities of the organic cation-proton exchange system at the human blood-brain barrier

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳移行性に優れた中枢疾患治療薬を開発することは、患者のQOLの向上と我が国の医療費削減にとって重要な課題である。従来から、ある種の薬物を脳内に効率的に運ぶトランスポーター(有機カチオン/プロトン(OC/H+)交換輸送系)の存在が知られていたが、その実体はベールに包まれていた。この研究の目的は、ヒトの血液脳関門モデル細胞におけるOC/H+交換輸送系の発現を確認するとともに、その薬物認識特性および分子実体を解明することであった。その結果、OC/H+交換輸送系の分子実体解明には至らなかったものの、このトランスポーターの薬物認識特性とスクリーニング方法を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会の到来に伴い、アルツハイマー病や血管性認知症などの疾患が急増しており、これら中枢疾患に対する優れた中枢治療薬の開発が期待されている。従来からある種の薬物を脳内に効率的に運ぶトランスポーターの存在が知られていたが、その分子実体や輸送特性についてはベールに包まれていた。今回の研究において、このトランスポーターの輸送特性を明らかにすることができた。本研究成果は中枢疾患治療薬のドラッグデザインと新薬開発のブレークスルーになる可能性を秘めている。また、本研究は患者QOLの向上のみならず、我が国の医療費削減に対して大きなインパクトを与えることは間違いない。

研究成果の概要(英文)：To develop drugs for central disease with excellent brain transferability is an important issue for improvement of patients' QOL and reduction of medical expenses in Japan. Conventionally, the existence of a transporter (organic cation / proton (OC/H+) exchange system) that efficiently transports certain drugs into the brain has been known, but the entity has been veiled. The purpose of this study was to confirm the expression of the OC/H+ exchange system in human blood-brain barrier model and to elucidate its drug recognition properties and molecular entities. As a result, although it did not reach elucidation of the molecular entity of the OC/H+ exchange system, it was possible to clarify the drug recognition property and a screening method of this transporter.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 トランスポーター 有機カチオン輸送系 薬物認識性 ヒト脳毛細血管モデル ヒトiPS由来脳毛細血管内皮細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い、アルツハイマー病や血管性認知症などの疾患が急増しており、これら中枢疾患に対する優れた中枢治療薬の開発が期待されている。ところが、中枢治療薬の開発成功率は低迷したままであり、患者QOLの向上のみならず、40兆円を超える我が国の医療費削減政策の大きな足枷になっている。

申請者は、海外連携研究者であるCouraud博士が樹立したヒト血液脳関門細胞株(hCMEC/D3細胞)を用い、様々な薬物の血液脳関門(BBB)輸送機能を明らかにしてきた。これまでの一連の研究の中で、オキシコドン(Drug Metab Dispos., 36, 2005(2008))、ジフェンヒドラミン(Fluids Barriers CNS. 10(1), 8(2013))、トラマドール(J Pharm Sci. 103, 3335(2014))、メマンチン(Drug Metab Pharmacokin, 30, 182(2015))などの塩基性中枢作用薬はプロトンとの交換輸送系(OC/H⁺交換輸送系)によって効率的に脳内に運ばれることを見出した。この輸送系はエネルギー依存的、膜電位非依存的であるとともに、既知カチオントランスポーターの機能では説明できない新規トランスポーターであることが明らかになった。OC/H⁺交換輸送系の基質認識性と分子実体の解明は中枢治療薬開発戦略のブレークスルーになる。

2. 研究の目的

本研究の目的は「ヒト BBB の有機カチオン-プロトン(OC/H⁺)交換輸送系の薬物認識性および分子実体を解明すること」であった。

3. 研究の方法

1) ヒト BBB-OC/H⁺交換輸送系に特異性の高い基質の探索

市販中枢疾患治療薬からヒト BBB-OC/H⁺交換輸送系の強い基質を探索するため、hCMEC/D3細胞を用いた輸送実験を行った。対象とする薬物は脳移行性が高い塩基性薬物であり、物性、排出輸送系の関与については文献情報を基に27種の薬物を選定した。実験は申請者が確立したカクテルドレーシング BBB 輸送機能評価法に従った。ファーストスクリーニングとして、BBB-OC/H⁺交換輸送系の強力な基質であるジフェンヒドラミンを阻害剤として阻害実験を行った。一連の実験結果を総合的に評価し、OC/H⁺基質となる薬物を絞り込んだ。次に、Ligand-Based ファーマコホアー解析を行い、選定された薬物(化合物)の化学構造、物性から、OC/H⁺交換輸送系基質の構造上の類似性、特徴を解析した。

2) 2種の BBB 細胞を用いた BBB-OC/H⁺交換輸送系機能の評価

起源が異なるヒト脳毛細血管内皮細胞においては、トランスポーターや受容体などの機能性タンパク質の発現量および機能が異なることが知られている。申請者は BBB-OC/H⁺交換輸送系分子の発現についても同様であり、細胞間で輸送活性が異なれば、その差を利用した機能差分析ができると予想した。そこで、ヒト脳毛細血管内皮細胞として hCMEC/D3 細胞に加え、ヒト iPS 由来脳毛細血管内皮細胞(hiPS-BMECs)を用いて輸送の比較実験を行った。hiPS-BMECs はヒト iPS(IMR 90-4)から Lippmannらの方法に従って分化誘導した。

3) Function-based molecular cloning (FBMC)法を用いた BBB-OC/H⁺交換輸送系の分子同定

Function-based molecular cloning (FBMC)法にて OC/H⁺交換輸送系の輸送機能が大きくことなる hCMEC/D3 細胞のクローンを単離した。具体的には、hCMEC/D3 細胞を限界希釈法にて25クローン細胞に単離し、ジフェンヒドラミンの取込み輸送解析から機能の異なる細胞を分取した。これらの細胞を用いてトランスポーター遺伝子の発現をマイクロアレイで解析し、OC/H⁺の候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

1) ヒト BBB-OC/H⁺交換輸送系基質の探索

ジフェンヒドラミンを阻害剤としたファーストスクリーニングの結果に基づいて、70%以上阻害された薬物群をジフェンヒドラミン感受性、それ以外の薬物群をジフェンヒドラミン非感受性の2群に分類した。当初、ligand-based ファーマコホアー解析を行い OC/H⁺交換輸送系基質の特徴を解析する予定であったが、今回の薬物数では解析不能であったため、細胞への取込みクリアランスと物性との相関から OC/H⁺交換輸送系基質の関連性を検討した。ジフェンヒドラミン非感受性群では、取込みクリアランスと脂溶性との間に有意な正の相関関係が認められたが、位相幾何学的極性表面積(tPSA)との間には負の相関関係が認められた。この結果は単純拡散機構で BBB を透過する薬物に良く見られることから、ジフェンヒドラミン非感受性群は主に単純拡散機構で BBB を透過することが推定された。一方、ジフェンヒドラミン感受性の薬物では取込みクリアランスと物性(脂溶性、tPSA)との間には有意な相関関係は見られなかった。さらにジフェンヒドラミン感受性の薬物群には K_{puu} 値の高い薬物が 50%以上含まれていた。以上の結果から、OC/H⁺交換輸送系の基質としての十分条件は脂溶性および tPSA でないことが示唆された。また、OC/H⁺交換輸送系基質のファーストスクリーニングにジフェンヒドラミンによる阻害実験が有用であることが示唆された。

2) 異種 BBB 細胞を用いた BBB-OC/H⁺交換輸送系の機能評価

平成 29 年度の実験では、異種 BBB 細胞を用いてジフェンヒドラミン輸送の機能差分析から分子同定を試みた。hiPS-BMECs のヒト iPS 細胞からの分化誘導は申請者にとって初めての経験であり、安定的な細胞を得るのに予定よりも時間がかかった。しかし、連携研究者の川端博士の協力の下、強固なタイトジャンクションを持つ細胞を得ることに成功した。まず、hCMEC-D3 細胞と hiPS-BMECs におけるトランスポーター遺伝子の発現を検討した結果、一部のトランスポーターの発現強度に違いが見られ、異種 BBB 細胞での発現量に違いがあることが確認できた。一方、ジフェンヒドラミンを基質とした取込みクリアランスは hCMEC-D3 細胞と hiPS-BMECs で大差がなく、機能差分析を行うまでには至らなかった。しかし、今回の結果から hiPS-BMECs においても OC/H⁺交換輸送系が機能的に保存されていることが明らかになった。

3) FBMC 法を用いた BBB-OC/H⁺交換輸送系の分子同定

申請者らのグループが開発した FBMC 法を用いて、OC/H⁺交換輸送系の輸送活性が大きく異な

る2つのクローンを分取した。このクローン細胞でトランスポーター遺伝子発現の差分解析を行いOC/H⁺交換輸送体分子実体の解明を試みた。得られた31の遺伝子をsiRNAでノックダウンしOC/H⁺交換輸送系の基質で取込み輸送活性を測定した。その結果、9種類のノックダウン細胞で基質の取込み量がコントロールに比べて有意に減少した。次にこの中の6種の遺伝子について過剰発現細胞をHEK293で作製し、OC/H⁺交換輸送系基質の取込み輸送活性を測定した。導入した遺伝子はいずれも1000倍以上の過剰発現を示したが、OC/H⁺交換輸送系基質の取込みについては有意な上昇は見られなかった。

以上から、本研究プロジェクトではOC/H⁺交換輸送体の分子同定には至らなかったものの、OC/H⁺交換輸送系の基質認識性、FBMC法の開発など多くの重要な知見が得られた。本研究成果は中枢疾患治療薬のドラッグデザインと新薬開発のブレークスルーになる可能性を秘めている。また、本研究は患者QOLの向上のみならず、我が国の医療費削減に対しても大きなインパクトを与えることは間違いない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

1. Kurosawa T, Tega Y, Higuchi K, Yamaguchi T, Nakakura T, Mochizuki T, Kusuhara H, Kawabata K, Deguchi Y. Expression and Functional Characterization of Drug Transporters in Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. Pharmaceutics*. 15(12), 5546-5555 (2018). DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00697 (査読有)
2. Hiranaka S, Tega Y, Higuchi K, Kurosawa T, Deguchi Y, Arata M, Ito A, Yoshida M, Nagaoka Y, and Sumiyoshi T.: Design, synthesis, and blood-brain barrier transport study of pyrilamine derivatives as histone deacetylase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 9(9), 884-888. (2018). DOI:10.1021/acsmedchemlett.8b00099 (査読有)
3. Nakanishi T, Tamai I, and Deguchi Y.: Recent advances in research on biological membranes that regulate the central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1322 - 1323 (2018). (査読有)
4. Nakamura Y, Nakanishi T, Shimada H, Shimizu J, Aotani R, Maruyama S, Higuchi K, Okura T, Deguchi Y, and Tamai I. Prostaglandin Transporter OATP2A1/SLC02A1 Is Essential for Body Temperature Regulation during Fever. *J. Neurosci.* 38 (24), 5584 - 5595 (2018). doi: 10.1523/JNEUROSCI.3276-17.2018. (査読有)
5. Kurosawa T, Higuchi K, Okura T, Kobayashi K, Kusuhara H, Deguchi Y: Involvement of proton-coupled organic cation antiporter in varenicline transport at blood-brain barrier of rats and in human brain capillary endothelial cells. *J. Pharm. Sci.* 106, 2576-2582 (2017). doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.032 (査読有)
6. Kitamura A, Higuchi K, Okura T, Deguchi Y: Cocktail-dosing microdialysis study to simultaneously assess delivery of multiple organic-cationic drugs to the brain. *J. Pharm. Sci.* 105, 935-940 (2016) doi: 10.1002/jps.24691. (査読有)

[学会発表](計 16件)

1. 手賀悠真, 北村 敦, 大町路子, 黒澤俊樹, 樋口慧, 板垣文雄, 出口芳春, ヒト血液脳関門モデル細胞を用いたH⁺/有機カチオン交換輸送体の基質スクリーニング、第3回トランスポーター研究会関東部会(千葉), 2018年11月17日
2. 住吉孝明, 平中誠弥, 手賀悠真, 樋口慧, 黒澤俊樹, 出口芳春, 本間光貴, 新真由美, 伊藤昭博, 吉田稔, 長岡康夫: 血液脳関門透過性を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の探索研究、第36回メディシナルケミストリーシンポジウム(京都), 2018年11月28-30日
3. 黒澤俊樹, 手賀悠真, 樋口慧, 山口朋子, 中倉敬, 望月達貴, 楠原洋之, 川端健二, 出口芳春: ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるトランスポーター機能の解明、第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(仙台), 2018年10月18-19日
4. Tatsuki Mochizuki, Tadahaya Mizuno, Kei Higuchi, Yuma Tega, Toshiki Kurosawa, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Yoshiharu Deguchi, Hiroyuki Kusuhara: Investigation of SLC35F2 drug transport function in mouse brain and primate BBB models. 第33JSSX第22MD0合同年会(金沢), 2018年10月1-5日
5. Atsushi Kitamura, Yuma Tega, Toshiki Kurosawa, Kei Higuchi, Yoshiharu Deguchi: Screening of proton-coupled organic cation antiporter substrates using hCMEC/D3 cells: an in vitro human blood-brain barrier model、第33JSSX第22MD0合同年会(金沢), 2018年10月1-5日
6. Yasuyuki Debori1, Tomoko Igari, Masanori Nakakariya, Nobuyuki Amano, Yuma Tega, Kei Higuchi, Takashi Okura and Yoshiharu Deguchi: Characterization of mesoridazine transport in human cerebral microvessel endothelial cells, hCMEC/D3. 第33JSSX第22MD0合同年会(金沢), 2018年10月1-5日

7. 樋口 慧、手賀悠真、黒澤俊樹、濱弘太郎、横山和明、出口芳春：ゲノム編集ヒト血液脳関門細胞における薬物輸送機能評価、日本薬剤学会第33年会（静岡），2018年5月30-6月1日
8. 手賀悠真、黒澤俊樹、樋口 慧、山口朋子、川端健二、出口芳春：ヒトiPS細胞由来脳毛細血管内皮細胞におけるトランスポーターの機能的発現、日本薬剤学会第33年会（静岡），2018年5月30日-6月1日
9. Toshiki Kurosawa, Yuma Tega, Kei Higuchi, Tomoko Yamaguchi, Kenji Kawabata, Yoshiharu Deguchi: Gene expression and function of drug transporters in brain microvascular endothelial cells derived from human iPS cells、第32日本薬物動態学会年会（東京），2017年11月29-12月1日
10. Seiya Hiranaka, Yuma tega, Kei Higuchi, Yoshiharu Deguchi, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Yasuo Nagaoka, Takaaki Sumiyoshi: Brain-targeting drug delivery system: Molecular design and functional assessment of hybrid compound composed of histone deacetylase inhibitor and pyrillamine、第32日本薬物動態学会年会（東京），2017年11月29-12月1日
11. 黒澤俊樹、手賀悠真、樋口 慧、山口朋子、川端健二、出口芳春：ヒトiPS由来脳毛細血管内皮細胞における薬物輸送能の解明、第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（金沢）2017年10月26-27日
12. 手賀悠真、平中誠弥、樋口慧、出口芳春、伊藤昭博、吉田稔、長岡康夫、住吉孝明：H⁺/有機カチオン交換輸送体を標的としたHDAC阻害剤の脳へのデリバリー、第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（金沢）2017年10月26-27日
13. 樋口 慧、手賀悠真、黒澤俊樹、濱弘太郎、横山和明、出口芳春：CRISPR-Cas9システムを用いたヒト血液脳関門細胞の排出輸送系ノックアウト、第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（金沢）2017年10月26-27日
14. 樋口 慧、近藤麻美、上松祐貴、黒澤俊樹、黄倉 崇、出口芳春：ヒト血液脳関門プロトン/有機カチオンアンチポーターの機能制御因子の解析、日本薬学会第137年回（仙台）2017年03月24-27日
15. 樋口 慧、黒澤俊樹、黄倉 崇、楠原洋之、出口芳春：血液脳関門におけるバレニクリンの輸送解析、第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（名古屋），2016年11月17-18日
16. Toshiki Kurosawa, Kei Higuchi, Takashi Okura, Hiroyuki Kusahara, and Yoshiharu Deguchi: Transport characteristics of varenicline in the blood-brain barrier、第31日本薬物動態学会年会（松本），2016年10月13-15日

〔図書〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://researchmap.jp/read0070655/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：黄倉 崇
ローマ字氏名：Okura, Takashi

所属研究機関名：帝京大学
部局名：薬学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80326123

研究分担者氏名：樋口 慧
ローマ字氏名：Higuchi, Kei
所属研究機関名：帝京大学（H28 - H29）
部局名：薬学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：10625304

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川端 健二
ローマ字氏名：Kawabata, Kenji

研究協力者氏名：山口 朋子
ローマ字氏名：Yamaguchi, Tomoko

研究協力者氏名：楠原 洋之
ローマ字氏名：Kusuhara, Hiroyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。