

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06976

研究課題名（和文）薬物輸送トランスポーター遺伝子発現の概日リズムに着目した、血液網膜関門機能解析

研究課題名（英文）Analysis of blood-retinal barrier based on circadian expression of drug transporters.

研究代表者

赤嶺 孝祐（AKAMINE, TAKAHIRO）

大分大学・医学部・特任助教

研究者番号：60799435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：網膜には循環血液からの物質輸送を制限する血液網膜関門と呼ばれるバリア機能が存在しているため、経口・静脈内投与による眼疾患の薬物治療は困難である。血液網膜関門には多数の薬物輸送トランスポーターが発現しており、これらが循環血液から網膜への薬物輸送を制御する要因の一つだと考えられている。本研究では血液網膜関門を構成する網膜色素上皮細胞を用いて検討を行った。その結果、薬物排泄に寄与するトランスポーターの発現量に概日リズムが認められた。また、網膜の神経保護作用が報告されているバルプロ酸の細胞内取り込み量も時刻により異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から循環血液から網膜への薬物輸送に時刻による変動が認められることが示唆された。投与時刻を最適化するという非常に簡便な手法で薬物の治療効果を高めることが期待できる。また、眼の副作用がある薬物は眼に移行しにくい時間帯に投与することで視機能の異常を回避できる可能性がある。近年では、医師主導のサプリメントによる健康維持の気運が高まっている。循環血液から網膜へ物質が移行しやすい時間帯、移行しにくい時間帯があることが示唆されたため、ビタミンAに代表される眼に必須の栄養素のサプリメントを飲む時刻にも最適な時刻があり、今後それらの時刻を明らかにすることで視機能の健康維持にも貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The retina has a barrier function called the blood-retinal barrier that restricts the transport of drugs from circulating blood. Drug treatment of eye disease by oral and intravenous administration is difficult. A number of drug transporters are expressed at the blood-retinal barrier, and these are considered to be one of the factors controlling drug transport from circulating blood to the retina. In this study, we examined retinal pigment epithelial cells that constitute the blood-retinal barrier. As a result, the circadian expression of transporters contributing to drug excretion was observed. Furthermore, it was shown that the cellular uptake of valproic acid, for which the neuroprotective action of the retina has been reported, also varies with time.

研究分野：時間薬理学

キーワード：眼科薬理学 時間薬理学 トランスポーター 血液網膜関門

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視力の消失は患者の Quality of life (QOL)を著しく低下させるため、原因疾患の治療の重要性は高い。厚生労働省の調査により、日本の中途失明原因疾患の第2位から第4位が糖尿病網膜症などの網膜疾患であることが明らかにされている。さらに原因第1位の緑内障に対しても網膜神経の保護を目的とした医薬品の開発が行われており、網膜に対する効率的なドラッグデリバリーシステムの開発が要求されている。眼疾患の薬物治療は点眼による薬物投与が主流であるが角膜や硝子体に物理的に阻まれ、後眼部へ薬物が到達しにくいという大きな弱点がある。近年、血管新生阻害剤である抗 VEGF 薬の硝子体内投与やステロイドのテノン嚢下投与などの後眼部を対象とした薬物投与方法が実施されているが、患者への侵襲性が高い点や術者に高い技術が要求される点など課題が多く残っている。経口・静脈内投与による眼疾患の薬物治療が可能になれば上記の問題を解決できるが、網膜には循環血液からの物質輸送を制限する血液網膜関門と呼ばれるバリア機能が存在しているため、これを克服する必要がある。循環血液から組織への薬物輸送過程には組織と血管の間に発現するトランスポーターが関与する。血液網膜関門には多数の排泄トランスポーターが発現しており、このことが循環血液から網膜への薬物輸送を妨げる要因の一つだと考えられている。

一方、哺乳動物における遺伝子発現には、約24時間を1サイクルとする概日リズムが認められる。このリズムは「時計遺伝子」と呼ばれる約20種類の転写因子群によって制御されている。概日リズムの中核は視交叉上核に存在し、視交叉上核から発振される神経伝達物質やグルココルチコイドホルモンなどの刺激によって、末梢組織における個々の細胞内の時計遺伝子の発現リズムが同調し、様々な転写因子の発現リズムを介して睡眠・覚醒などの生体機能に概日性的変動が生じる。薬物輸送に関与するトランスポーターの多くが、時計遺伝子の制御下にあり、その発現や機能に概日リズムが認められる。そのため、生体内での薬物輸送には時刻による変動が認められ、薬物の組織透過性や血中濃度、さらには治療効果が投与時刻依存的に変化することが明らかになってきた (Akamine T et al., J Pharmacol Exp Ther, 2015. Wada E et al., Mol Pharmacol., 2015.)

これらを踏まえ、「血液網膜関門を構成する薬物輸送トランスポーターの発現に概日リズムが認められ、薬物を投与する時刻によって循環血液から網膜への薬物輸送能が変動する」と仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

血液網膜関門を構成する薬物輸送トランスポーターの発現に概日リズムが認められるか否か、また薬物を投与する時刻によって循環血液から網膜への薬物輸送能が変動するか否かを明らかにすることを目的に実験を行なった。

3. 研究の方法

実験には血液網膜関門を構成するヒト網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を用い、デキサメタゾンを添加することで時計遺伝子の発現リズムを同調させた。mRNA の発現量を real-time RT-PCR によって測定した。タンパク質の発現量は Western Blotting 法により測定した。評価薬物として網膜神経保護作用が報告されているバルプロ酸を用いた。細胞内バルプロ酸取り込み量は LC-MS/MS を用いて測定した。

4. 研究成果

ARPE-19 に対してデキサメタゾン (10 nM) を添加し、添加後 52 時間目までの時計遺伝子 Per1 mRNA の発現量を 4 時間ごとに測定した。その結果、Per1 mRNA の発現量には 24 時間周期で増減する概日リズムが認められた。また、代表的な薬物排泄トランスポーター (Mdr1, Bcrp, Mate1, Mrp2) の mRNA 発現量をデキサメタゾン添加後 52 時間目まで 4 時間ごとに測定した。その結果、Mdr1, Bcrp においてデキサメタゾン添加後 32 時間目をピーク、44 時間目をトラフとする概日リズムが認められた。この結果から、BRB における薬物輸送トランスポーターが担うバリア機能には概日リズムが認められることが示唆された。次に、トランスポーターを介した薬物輸送機能を評価するためにバルプロ酸を評価薬物として用いた。デキサメタゾン添加後 32 時間目または 44 時間目の ARPE-19 にバルプロ酸 (10 μ M) を 1 時間暴露後、細胞を採取し、細胞内バルプロ酸濃度を測定した。その結果、細胞内バルプロ酸濃度はデキサメタゾン暴露後 32 時間目と比較して、44 時間目に高値を示した。バルプロ酸をマウスの腹腔内に投与することで循環血液から網膜に移行し、網膜神経保護作用を示すことが既報により明らかになっている。本研究の知見より、投与時刻を調節することでより効果的にバルプロ酸を循環血液から網膜へ送達することが可能であることが示唆された。

本研究結果から循環血液から網膜への物質輸送には時刻による変動が認められることが示唆された。現在、網膜をはじめとする後眼部へのドラッグデリバリー研究は硝子体内インプラントなどの特殊なデバイスを用いた研究が多い。このようなデバイスには特殊な技術や知識が必要となる。本研究は、臨床で最も一般的な投与経路である経口投与や静脈内投与による眼疾患の治療の構築を指向している。そのため、特殊な技術や知識を必要とせず、臨床に浸透しやすい。投与時刻の最適化という非常に簡便な手法で「飲む目薬」の開発が期待できる。また、ステロイド薬による白内障や緑内障を例とする既存の眼科関連副作用が問題視されている薬物の副作用回避の手法としても本研究結果は有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Katamune C, Koyanagi S, Hashikawa KI, Kusunose N, Akamine T, Matsunaga N, Ohdo S. Mutation of the gene encoding the circadian clock component PERIOD2 in oncogenic cells confers chemoresistance by up-regulating the Aldh3a1 gene. *J Biol Chem.*, 294(2):547-558, 2019. 査読あり

DOI: 10.1074/jbc.RA118.004942.

(2) Kusunose N, Akamine T, Kobayashi Y, Yoshida S, Kimoto K, Yasukochi S, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S and Kubota T. Contribution of the clock gene DEC2 to VEGF mRNA upregulation by modulation of HIF1 protein levels in hypoxic MIO-M1 cells, a human cell line of retinal glial (Müller) cells. *Jpn J Ophthalmol.* 62(6):677-685, 2018. 査読あり

DOI: 10.1007/s10384-018-0622-5.

(3) Akamine T, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S and Ohdo S. Accumulation of sorbitol in the sciatic nerve modulates circadian properties of diabetes-induced neuropathic pain hypersensitivity in a diabetic mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 503(1);181-187, 2018. 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.209.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Takahiro AKAMINE, Naoki KUSUNOSE, Yoshiyuki KOBAYASHI, Shigeo YOSHIDA, Naoya MATSUNAGA, Satoru KOYANAGI, Kenichi KIMOTO, Shigehiro OHDO, and Toshiaki KUBOTA. The clock gene DEC2 contributes to VEGF upregulation by modulating HIF1 protein levels in hypoxic MIO-M1 cells, a human cell line of retinal glial (Muller) cells. The 11th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists. 2018年12月1日~2日。Centennial Hall. (福岡県, 福岡市)

(2) 赤嶺孝祐、楠瀬直喜、松永直哉、小柳悟、木許賢一、大戸茂弘、久保田敏昭。線維芽細胞におけるマイトマイシンCによる時計遺伝子発現変容メカニズムの解明。第28回日本緑内障学会。2017年9月29日~2017年10月1日。リーガロイヤルホテル広島/NTTクレドホール。(広島県, 広島市)

〔図書〕(計 1 件)

赤嶺孝祐、久保田敏昭。小児科ステロイドの使い方・止め方・続け方。稲毛康司編。文光堂。27-29, 2019。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

(1) 赤嶺孝祐、楠瀬直喜、木許賢一、久保田敏昭。時計遺伝子 DEC2 による網膜 VEGF 発現制御。第 35 回大分大学眼科研究会。2019 年 3 月 16 日。労働福祉会館・ソレイユ 7F。(大分県, 大分市) 一般公開

(2) 赤嶺孝祐、加納一頼、木許賢一、久保田敏昭。マウス線維芽細胞を用いたマイトマイシン(MMC)細胞内取り込み機構の解明。第35回大分大学眼科研究会。2018年3月3日。労働福祉会館・ソレイユ7F。(大分県, 大分市) 一般公開

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

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。