

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790136
 研究課題名（和文）有機カチオン感受性トランスポーターを介した麻薬性鎮痛薬の
 血液脳関門輸送
 研究課題名（英文）Blood-brain barrier transport of opioid agonists mediated by
 organic cation-sensitive transporter
 研究代表者
 黄倉 崇（OKURA TAKASHI）
 帝京大学薬学部・講師
 研究者番号：80326123

研究成果の概要：麻薬性鎮痛薬であるオキシコドンは、特殊なトランスポーター（運び屋タンパク質）によって脳内へ運ばれ、鎮痛作用を発揮することが示された。このトランスポーター分子を探索したところ、血液と脳の間に関門に、新たなトランスポーターを発見した。このトランスポーターは薬物のみでなく、セロトニンなどの神経伝達物質を脳から血液に汲み出すことにより、脳内の神経伝達物質の濃度を調節すると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：薬物動態学

1. 研究開始当初の背景

麻薬鎮痛薬の脳内動態はその鎮痛作用を規定する重要な因子となることは疑いの余地はない。麻薬性鎮痛薬などの中枢作用薬の中には、オキシコドンを始めカチオン性薬物が数多く存在する。そのようなカチオン性薬物が単純拡散のみで血液脳関門（Blood-brain barrier, BBB）を透過するとは考え難く、何らかの輸送系がその脳移行に関わるものと予想される。しかしカチオン性薬物の脳移行を担う輸送分子ならびにその機能的特徴は未だ解明されていない。BBB におけるこの有機カチオン感受性の輸送系の解明は、鎮痛薬に限らず新たな中枢作用薬の

脳デリバリー戦略の開発に繋がる可能性がある。またカチオン性薬物が併用された場合、このトランスポーターを介した薬物間相互作用が起こる可能性がある。創薬・創剤に加えて医薬品の適正使用の観点からも、BBB におけるカチオン輸送機構の解明は重要な研究課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) オキシコドンの血液脳関門輸送特性の解明、(2) 血液脳関門におけるオキシコドンの輸送分子の同定、(3) 麻薬鎮痛薬の適正使用の観点から、オキシコドン輸送分子を介した薬物間相互作用の評価、(4) 血

液脳関門における有機カチオントランスポーターの発現と機能的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) オキシコドンの血液脳関門輸送特性の解明 In vitro BBB モデル細胞として条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株

(TR-BBB13)を用いてオキシコドンの輸送特性解析を行い、駆動力の検討ならびに構造類似化合物による阻害効果を含めた詳細な輸送特性を解析した。In vitroにおける輸送解析と同時に、in vivoにおけるオキシコドンのBBB輸送特性についてin situ rat brain perfusion法を用いて検討した。

(2) 血液脳関門におけるオキシコドンの輸送分子の同定 有機カチオンを基質とするトランスポーターとして同定されているorganic cation transporter (OCT1-3, OCTN1,2), plasma membrane monoamine transporter (PMAT), multidrug and toxin extrusion type transporter (MATE1-2)のTR-BBB13細胞における遺伝子発現を、定量的RT-PCR法により測定した。BBB細胞に高発現することが確認されたトランスポーターをクローニングし、発現細胞系を構築した。発現細胞系を用いて、オキシコドンまたは³Hピリラミンの基質認識性について検討した。

(3) オキシコドン輸送分子を介した薬物間相互作用の危険性評価 オキシコドントランスポーターのプローブリガンドとして³Hピリラミンを用い、鎮痛補助薬のオキシコドントランスポーターを介した相互作用について検討した。即ち、TR-BBB13細胞における³Hピリラミン輸送に対する阻害実験を、13種の鎮痛補助薬を用いて行った。このうち、阻害効果がみられた薬物について、オキシコドン取り込みに対する阻害作用を検討した。さらに、最も強い阻害作用を示したアミトリプチリンについて、in vivo実験系を用いてオキシコドンの薬物動態ならびに鎮痛作用における相互作用を解析した。鎮痛作用はtail flick法により測定した。

(4) 血液脳関門における新規有機カチオントランスポーターPMATの発現と機能の解析 上記(2)オキシコドン輸送分子の同定過程で見つかった新規有機カチオントランスポーターのPMATについて、血液脳関門における発現と機能を解析した。PMATの発現細胞系ならびにTR-BBB13細胞を用いたin vitro解析に加えて、in vivoにおけるBBB輸送解析法(in situ rat brain perfusion法、brain efflux index法、brain microdialysis法)により、PMATのBBBにおける機能を解析した。

また、ガラスビーズ法により脳毛細血管を単離し、PMATの遺伝子ならびにタンパクレベルで発現を調べるとともに、免疫組織染色法によりその局在を調べた。

4. 研究成果

(1) オキシコドンの血液脳関門輸送特性 TR-BBB13細胞におけるオキシコドンの輸送は、代謝阻害剤により有意に抑制された。さらに、オキシコドンの輸送は細胞外メディウムのアルカリ化、細胞内の酸性化により顕著に増加し、細胞外の酸性化、細胞内のアルカリ化、プロトノフォア処理により低下した。従って、オキシコドンのBBB輸送はエネルギー依存的であり、逆向きのプロトン勾配を駆動力とすることが示唆された。また、オキシコドンのBBB輸送は、ピリラミン、キニジン、アマンタジンなどのカチオン性薬物により顕著に阻害された。In vitro脳関門モデル細胞でみられたこのような輸送特性は、in vivo条件下でも観察された。さらに、このエネルギー依存的なプロトンアンチポーターは、オキシコドンのみでなく、ピリラミンを基質とすることが示され、オキシコドンに限らず、多くの中枢作用型カチオン性薬物の脳への移行を担うことが示唆された。

(2) 血液脳関門におけるオキシコドンの輸送分子の同定 有機カチオンを基質とする既知トランスポーターである、MATE1-2, OCT1-3, OCTN1-2, PMATのTR-BBB13細胞におけるmRNA発現は、PMATが最も高く、次いでOCTN2の順で、それ以外の有機カチオントランスポーターのBBB細胞における発現は極めて低値を示した。そこで、ラットBBB細胞からPMATおよびOCTN2をクローニングし、発現細胞系を構築して、オキシコドンまたは³Hピリラミンの輸送を測定した。しかし、これら薬物をOCTN2またはPMATが輸送するというエビデンスは得られなかった。従って、未同定の輸送システムが、これら中枢作用型カチオン性薬物のBBB輸送を担う可能性が考えられる。

(3) オキシコドン輸送分子を介した薬物間相互作用 オキシコドントランスポーターのプローブリガンドとして³Hピリラミンを用い、鎮痛補助薬の輸送阻害作用をスクリーニングした。その結果、アミトリプチリン、フルボキサミン、メキシレチンを始めとする鎮痛補助薬は³Hピリラミンの輸送を阻害した。これらカチオン性の鎮痛補助薬はオキシコドンのBBB輸送を阻害したが、その抑制効力(Ki値)は、13~65 μMであった。治療血中濃度域はこれらKi値の5~300倍高く、臨床上、鎮痛補助薬とオキシコドンのBBB輸送阻害の起こる可能性は低いと考えられた。さ

らに in vivo でオキシコドンとアミトリプチリンの薬物動態ならびに鎮痛作用における相互作用を解析したところ、アミトリプチリンはオキシコドンの脳移行過程に影響を与えることなく鎮痛作用を増強することが示された。従って、アミトリプチリンなどのカチオン性の鎮痛補助薬は、高濃度血中に存在した場合、オキシコドンの脳移行に影響を与える可能性があるが、臨床有効量で脳移行過程における相互作用が問題となる可能性は低いと考えられる。

(4) 血液脳関門における新規有機カチオントランスポーターPMATの発現と機能
TR-BBB13細胞よりクローニングしたラットPMAT遺伝子は、マウスおよびヒトPMATと高い相同性を示した。テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、ラットPMAT発現CHO細胞を作製した。FLAGタグをN末に付加したPMATの細胞内発現を免疫染色により確認したところ、主に細胞膜での発現が観察された。Western blotting法により測定したその発現量と1-Methyl-4-phenylpridinium (MPP)の輸送活性は良く相関した。MPPを基質として用いてその輸送機能を解析したところ、PMATはモノアミンに加えて、有機カチオンに感受性を示した。そこで、さらにin vivoにおけるPMATの発現と機能を解析した。ガラスビーズ法によりラット脳から脳毛細血管を単離しPMATの発現を解析したところ、全脳に比べ、単離脳毛細血管で高いPMAT mRNA発現を確認した。さらに、PMATの抗体を作製し、タンパク質レベルでPMATの発現を調べた。Western blotting法により、PMATの発現が単離脳毛細血管でみられた。さらに免疫組織染色法により、脳毛細血管内皮細胞でPMATの発現を確認した。In vivoにおけるPMATの脳関門輸送機能を in situ brain perfusion法、brain efflux index法ならびに in vivo brain microdialysis法により解析した。その結果、PMATは血液から脳側への輸送には関与せず、脳から血液側の輸送に関わることが示された。従って、脳関門におけるPMATは有機カチオンを脳から血液中に排出することにより、脳内モノアミンや外因性有機カチオンの脳内濃度の調節機構としての役割を担っていると考えられる。

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)

Takashi Okura, Yuki Morita, Yoshihiko Ito, Yoshiyuki Kagawa, Shizuo Yamada, Effects of quinidine on antinociception and pharmacokinetics

of morphine in rats. J. Pharm. Pharmacol. 61, 593-597, 2009, 査読有
Takashi Okura, Tadahiro Ozawa, Yoshihiko Ito, Midori Kimura, Yoshiyuki Kagawa, Shizuo Yamada, Enhancement by grapefruit juice of morphine antinociception. Biol. Pharm. Bull. 31, 2338-2341, 2008, 査読有
Takashi Okura, Asami Hattori, Yusuke Takano, Takenori Sato, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. Drug Metab. Dispos. 36, 2005-2013, 2008, 査読有
Shizuo Yamada, Yasuhiro Kato, Takashi Okura, Yoshiyuki Kagawa, Kazuki Kawabe, Prediction of α 1-adrenoceptor occupancy in the human prostate from plasma concentrations of silodosin, tamsulosin and terazosin to treat urinary obstruction in benign prostatic hyperplasia. Biol. Pharm. Bull. 30, 1237-1241, 2007, 査読有

[学会発表](計10件)

Takashi Okura, Keita Shimomura, Sayaka Kato, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, The pyrilamine transporter functions as the multispecific organic cation transporter at the blood-brain barrier. 第23回日本薬物動態学会年会, 2008年10月31日, 熊本
Takenori Sato, Sayaka Kato, Takashi Okura, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, Expression and functional characterization of plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in the rat blood-brain barrier. 第23回日本薬物動態学会年会, 2008年10月31日, 熊本
Takashi Okura, Asami Hattori, Yusuke Takano, Takenori Sato, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, Blood-brain barrier transport and pharmacological effect of opioids. 11th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, September 20, 2008, Amsterdam
Yoshiharu Deguchi, Takashi Okura, Yusuke Takano, Takenori Sato, Atsushi Yamashita, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki, Expression and functional

characterization of plasma membrane monoamine transporter (PMAT) in the rat blood-brain barrier. 11th International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier, September 20, 2008, Amsterdam
佐藤武則、黄倉 崇、高野祐輔、山下 純、寺崎哲也、出口芳春：カチオントランスポーターPMATの脳関門における発現と輸送機能解析.日本薬学会第23年会, 2008年5月20日, 札幌
黄倉 崇、高野祐輔、佐藤武則、山下 純、大槻純男、寺崎哲也、出口芳春, Expression and transport function of rat plasma membrane transporter (rPMAT) in the brain barrier system. 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007年11月26-27日, 仙台
Takashi Okura, Yusuke Nakazawa, Asami Hattori, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, Drug-drug interactions between oxycodone and adjuvant analgesics at the blood-brain barrier. 8th International ISSX Meeting, October 9-12, 2007, Sendai
Takashi Okura, Blood-brain barrier transport of cationic drugs, APSTJ Global Education Seminar, Sept 14, 2007, Tokyo
黄倉 崇、中澤佑介、服部麻美、寺崎哲也、出口芳春, 麻薬性鎮痛薬オキシコドンと鎮痛補助薬の相互作用解析. 日本薬学会第22年会, 2007年5月23日, 大宮
Asami Hattori, Takashi Okura, Yusuke Nakazawa, Margareta Hammarlund-Udenaes, Tetsuya Terasaki, Yoshiharu Deguchi, Blood-brain barrier transport of oxycodone, an opioid receptor agonist. The 5th International Symposium on Membrane Receptors, Signal Transduction and Drug Action, May 10 11, 2007, Shizuoka

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黄倉 崇 (OKURA TAKASHI)
帝京大学・薬学部・講師
研究者番号：80326123

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし