

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390046

研究課題名 (和文) 薬物の中枢応答性を支配する薬物輸送機構の定量的評価法の開発

研究課題名 (英文) Development of quantitative evaluation method of the drug transport systems at the blood brain barrier which influences the CNS effect.

研究代表者

楠原 洋之 (KUSUHARA HIROYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：00302612

研究成果の概要 (和文)：本研究では、血液脳関門に発現する薬物トランスポーターに焦点をあて、その機能評価法の開発を目的とした。ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 試験により、血液脳関門において Mrp4、P-gp、Bcrp など ABC トランスポーターにより能動的に排出され、中枢神経系への移行が制限されている薬物群を明らかにした。Oat3 により脳内から排出される薬物群を明らかにし、Mrp4 とともに連携して効率的に脳内から排出していることを明らかにした。PET に適用可能なトランスポーター基質を複数見いだした。

研究成果の概要 (英文)：This study focused on the drug transporters expressed in the blood-brain barrier, and aimed at developing quantitative evaluation method of the impact of such drug transporters. *In vivo* studies using knockout mice elucidated that drugs that are actively extruded by ABC transporters, Mrp4, P-gp and Bcrp at the blood-brain barrier, and thereby, showing limited penetration into the central nervous system. This study also elucidated drugs that are removed by Oat3 from the central nervous system. In conjunction with Mrp4, Oat3 forms efficient directional transport across the blood-brain barrier. This study also found some transporter substrates applicable to PET study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬学, 薬剤反応性, 脳・神経, 血液脳関門, トランスポーター, 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系と血液との間には、血液脳関門が存在し、血液中に存在する化合物の中枢移行は制限されている。血液脳関門の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、細胞間の発達した **tight junction** が細胞間隙を介した透過を制限している。また、血液側細胞膜には、一次性能動輸送を行う ABC トランスポーター P-糖タンパク (以下 P-gp) など医薬品をはじめ

とする種々薬物のくみ出しに働くトランスポーターが発現しており、能動的関門機構として重要である。P-gp により能動的にくみ出されることで、中枢神経系内に存在する標的部近傍での薬物濃度は低く保たれているため、P-gp の機能変動は薬剤応答性に影響を与える。

研究代表者は、P-gp と同じく ABC トランスポーターである BCRP が、血液脳関門に発

現し、phytoestrogen を初めとする種々化合物の中枢移行を抑制していることを見いだした。一部の Bcrp 基質は P-gp 基質でもあり、血液脳関門では両トランスポーターによるくみ出しを受けることが示唆された。また、ABC トランスポーターの他、アニオン性薬物の細胞外から細胞内への移行を促進するトランスポーターとして、Oatp1a4、Oat3 の2つが脳側細胞膜に発現し、阻害剤を用いた in vivo 試験によりこれらのトランスポーターが中枢神経系からの医薬品の排出を促進することを示唆する結果を得ている。研究代表者が明らかにした上記トランスポーター群のほか、新たに ABC トランスポーター MRP4 が発現していることが報告された。医薬品の中枢移行性は、単純拡散を規定する脂溶性のほか、これらトランスポーターの基質認識特性によって決定される。

医薬品の体内動態に働くトランスポーターには高頻度で遺伝子の変異が存在し、発現量・輸送活性に影響を与えることが知られている。例えば BCRP には、日本人で頻度の高い SNP (アリル頻度 20-30%) が蛋白発現量に影響を与え、研究代表者も含め複数のグループが、この SNP が BCRP 基質となる薬物の血中動態の個体間変動要因となることを報告している。また、併用薬による阻害 (薬物間相互作用) も知られている。血液脳関門においても、SNP や薬物間相互作用により中枢神経系内での医薬品暴露の個人差が生じていると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、医薬品の中枢応答性を決定する要因となる血液脳関門に着目し、医薬品の透過性を決定する要因である薬物トランスポーターの分子実体を解明すること、ならびに SNP あるいは薬物間相互作用によるトランスポーター機能の個体間変動を検出するためのツールとして、PET 分子プローブを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬物トランスポーターノックアウトマウスにおける血液脳関門透過性の評価

血液脳関門に発現するトランスポーター (P-gp、Bcrp、P-gp/Bcrp、Mrp4、Oat3、Oatp1a4) のノックアウトマウスを用いて、野生型マウスとの比較により、各トランスポーターの重要性を、以下の手法により評価した。

① 中枢神経系の薬物移行性を評価した。静脈内に薬物を持続注入し、血液中濃度が定常に達した後、脳内薬物濃度を測定した。

② 脳実質内に薬物を直接投与し、時間を変えて脳内濃度を測定し、脳内からの消失速度を測定した。

(2) ヒト脳不死化毛細血管内皮細胞における薬物輸送機構の解析

ヒト脳不死化毛細血管内皮細胞 (以下 D3 細胞) を培養し、in vitro 輸送実験に用いた。細胞内への取り込みに対する飽和性、trans-stimulation 効果など、薬物輸送におけるトランスポーターの関与を検討した。

(3) PET分子プローブの開発

① ノックアウトマウスでの in vivo データに基づき、特に影響の大きかった薬物について、¹⁴Cを導入したラベル体を合成した。

② 理研で新規に開発された PET プローブである TIC、放医研で開発された PET 分子プローブ 7mPSG (グルタチオン抱合体) の血液脳関門透過性を、(1)・②の手法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) Oat3による排出輸送

Oat3(-/-)マウスでは、内因性基質 DHEAS、薬物 benzylpenicillin、p-アミノ馬尿酸 (PAH)、Ro64-0802 (抗ウイルス薬タミフルの活性代謝物) および PET 分子プローブ 7mPSG の脳内からの排出が野生型マウスに対して有意に低下し、Oat3 がこれら化合物の排出に働いていることを初めて明らかにした。一方で、PET 分子プローブ TIC の排出は野生型マウスと同程度であり、トランスポーターの関与は非常に小さいことが示唆された。Oat3(-/-)マウスにおいても、probenecid は DHEAS や benzylpenicillin 等 Oat3 基質の排出を阻害することから、Oat3 以外のトランスポーターの関与も示唆された。血液中に benzylpenicillin を投与した場合、Oat3 (-/-) マウスでは脳および脳脊髄液中濃度の増加が観察されたが、PAH、6-mercaptopurine、Ro64-0802 の脳内動態に変動は見られなかった。一部の化合物については、下記の通り MRP4 によるくみ出しの影響をうけるためである。

(2) Oatp1a4による薬物輸送

従来の仮説とは異なり、dehydroepiandrosterone sulfate の脳内からの排出速度は野生型マウスと Oatp1a4(-/-)マウスでは同定度であった。ラットとは異なり、マウス血液脳関門では、Oatp1a4 は脳側、血液側の両細胞膜に発現し、スタチンの脳内からの排出ならびに血液中からの取り込みの双方に働くことを明らかにした。同じトランスポーターが、中枢神経系への取り込みと脳内からの排出の双方に働くことを初めて実証した。

(3) Mrp4による排出輸送

Mrp4(-/-)マウスでは、長時間の暴露により、血液中からの Ro64-0802 が脳内に顕著に蓄

積することを見いだした。さらに、Mrp4(-/-)マウスでは脳内からの消失も遅延している。Oat3(-/-)マウスとの解析と併せて、脳側・血液側細胞膜で2つのトランスポーターが連携することで、脳内からの排出を効率的に実施していることを初めて実証した。Ro64-0802 は中枢神経系への移行がほとんど認められないが、これがMrp4による能動的くみ出しによるものであることを明らかにした。特に、Ro64-0802はタミフル服用時の異常行動発現が社会問題となっていた時期に実施しており、少なくとも活性体は容易に血液脳関門を透過しないこと、Mrp4の機能異常を伴う場合には、活性体であるRo64-0802が中枢神経系へと移行することを示唆する結果であり、社会的にも重要な知見である。Mrp4(-/-)マウスでは、methotrexate, raltitrexed など葉酸アナログや cefazolin の脳内濃度が有意に増加し、特にmethotrexate, raltitrexedについては脳脊髄液中濃度の増加も観察された。Mrp4がこれらの薬物の中核移行を抑制していることを明らかにした。これまでMrp4は血液脳関門に発現しているものの、薬物輸送における重要性は不明であった。本研究により、特にアニオン性薬物のくみ出しに重要であることを実証した。さらに脳内の領域別にMrp4の機能を評価した結果、methotrexateの移行性増加は小脳特異的であり、さらに大脳皮質ではMrp4(-/-)マウスでのみP-gp&Bcrp阻害剤GF120918による脳内濃度の増加が観察されるなど、大脳皮質ではMrp4を含む複数のトランスポーターが排出に関与していることを初めて明らかにした。領域ごとに、トランスポーターの寄与率が異なることを初めて示した。これまでトランスポーターの分布は同じと考えられており、本知見はそうした常識に一石を投じる知見である。

(4) P-gp、Bcrpによる排出輸送

P-gpとBCRPを同時に欠損した場合、個々のトランスポーターのノックアウトマウスで観察される脳内濃度の増加以上の増加が生じることを示した。本現象は、一見2つのトランスポーターが相乗的に作用しているように見えることから多くの議論がなされていたが、個々のトランスポーターの排出能力が単純拡散よりも大きければ、相加的な現象であることを理論的にも導いている。脳脊髄液中薬物濃度は、細胞外液中濃度を反映するとして、中枢応答性の指標として用いられるが、P-gpやBcrp基質となる薬物は血液脳関門で能動輸送を受けるため、脳内非結合型薬物濃度が血漿中非結合型薬物濃度に低く保たれており、脳脊髄液中濃度とは乖離することを明らかにした。P-gp(-/-)マウス、Bcrp(-/-)マウス、あるいはP-gp/Bcrp(-/-)マウス

スでは、こうした乖離は消失しており、血液脳関門での能動輸送が乖離の要因となることを実証した。しかし、P-gpやBcrp基質であっても、脳内非結合型薬物濃度と脳脊髄液中濃度が乖離しない薬物もあり、さらに解析を行う必要がある。

(5) ヒト脳不死化毛細血管内皮細胞における薬物輸送機構の解析

ヒト脳毛細血管由来不死化内皮細胞株(D3細胞)で、amantadineなどのカチオン性薬物について飽和性輸送を観察した。amantadine, olanzapineについては、pyrilamineによるtrans-stimulationも観察されたことから、飽和性は細胞膜に発現するトランスポーターに由来することが示唆された。血液脳関門にはこれら薬物を基質として、細胞内へと取り込むトランスポーターの発現が示唆された。特にolanzapineは単純拡散により血液脳関門を透過すると考えられており、トランスポーターの関与を示唆する初めてのデータである。

(6) PET分子プローブ

前述の通り、7mPSGはOat3の機能評価に利用できるPET分子プローブであることを明らかにした。研究成果に基づいて、BCRPプローブとなるdantrolene、in vitroでBCRP基質となることを見いだしたsulpirideについて、¹¹C体を合成した。非標識体と異なり、マウスでは代謝物が血中に多いためみかけ上、PETで検出したBcrp(-/-)マウスでの脳内濃度の増加は軽微であった。一方、サルでは脳内へ移行した放射能はバックグラウンドレベルであり、定量的なPET臨床試験への適用は困難と判断された。選択性および代謝の観点からはヒトでの有効性が期待されたものの、脳内での非特異的な結合が強い化合物あるいはカチオン性薬物のように細胞内オルガネラに蓄積する薬物を中心に探索することが必要である。

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9件)

以下全て査読有

- ① Miyajima M, Kusuhara H, Fujishima M, Adachi Y, Sugiyama Y. Organic anion transporter 3 mediates the efflux transport of an amphipathic organic anion, dehydroepiandrosterone sulfate, across the blood-brain barrier in mice. *Drug Metab Dispos.* 39:814-9, 2011
- ② Sugiyama T, Shuto T, Suzuki S, Sato T,

- Koga T, Suico MA, Kusuhara H, Sugiyama Y, Cyr DM, Kai H. Posttranslational negative regulation of glycosylated and non-glycosylated BCRP expression by Derlin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 404:853-8, 2011
- ③ Ose A, Kusuhara H, Endo C, Tohyama K, Miyajima M, Kitamura S, Sugiyama Y. Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos*, 38:168-76, 2010.
- ④ Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther*, 333:788-96, 2010.
- ⑤ Takashima T, Nagata H, Nakae T, Cui Y, Wada Y, Kitamura S, Doi H, Suzuki M, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y, Watanabe Y. Positron emission tomography studies using (15R)-16-m-[11C]tolyl-17,18,19,20-tetrakisocarbacyclin methyl ester for the evaluation of hepatobiliary transport. *J Pharmacol Exp Ther*. 335:314-23, 2010
- ⑥ Higashikuni Y, Sainz J, Nakamura K, Takaoka M, Enomoto S, Iwata H, Sahara M, Tanaka K, Koibuchi N, Ito S, Kusuhara H, Sugiyama Y, Hirata Y, Nagai R, Sata M. The ATP-binding cassette transporter BCRP1/ABCG2 plays a pivotal role in cardiac repair after myocardial infarction via modulation of microvascular endothelial cell survival and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:2128-35, 2010.
- ⑦ Ose A, Ito M, Kusuhara H, Yamatsugu K, Kanai M, Shibasaki M, Hosokawa M, Schuetz JD, Sugiyama Y. Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos*, 37:315-21, 2009.
- 総説 (査読有)
- ⑧ Watanabe T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*. 37:575-90, 2010
- ⑨ Kusuhara H, Sugiyama Y. In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney. *Drug Metab Pharmacokinetic*. 24:37-52, 2009
- [学会発表] (計 33 件)
- ① Kanamitsu K 他、Prediction of CNS effect of histamine H1 antagonist based on the systemic exposure and in vitro experiments、日本薬物動態学会、第 25 回年会、平成 22 年 11 月 18 日、東京
- ② Wu C 他、Prediction of cationic drug disposition in the human brain、日本薬物動態学会 第 25 回年会、平成 22 年 11 月 18 日、東京
- ③ Kodaira H 他、Prediction of differences between drug concentrations in the extracellular fluid in the brain and cerebrospinal fluid、日本薬物動態学会 第 25 回年会、平成 22 年 11 月 18 日、東京
- ④ Miyajima M 他、Characterizing organic anion transport at the blood-brain barrier、FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress/AAPS Annual Meeting and Exposition、平成 22 年 11 月 16 日、New Orleans, USA
- ⑤ (招待講演)Kusuhara H、Modulation of Drug Response by Transporter-Mediated Membrane Transport、GPEN2010、平成 22 年 11 月 12 日、North Carolina, USA
- ⑥ Miyajima M 他、Transport mechanisms of organic anions at the blood-brain barrier、GPEN2010、平成 22 年 11 月 12 日、North Carolina, USA
- ⑦ (招待講演)Kusuhara H、IVIVE for hepatic and renal transporters、FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress/AAPS Annual Meeting and Exposition、平成 22 年 11 月 16 日、New Orleans, USA

- ⑧ (招待講演)楠原洋之、医薬品体内動態における薬物トランスポーターの役割:機能変動が薬剤応答性に与える影響、日本毒性病理学会 第11会 教育セミナー、平成22年11月6日、大阪
- ⑨ (招待講演)Kusuhara H、Role of Drug Transporters in Modulation of Drug Response by Transporter-Mediated Membrane Transport、New Horizons in Toxicity Prediction The 2nd International Lhasa Symposium、平成22年9月16日、Leeds, UK
- ⑩ 楠原洋之 他、血液脳関門・血液脳脊髄液関門の能動的関門機構としてのABCトランスポーターMRP4の重要性、第4回トランスポーター研究会九州部会、平成22年9月12日、長崎
- ⑪ 楠原洋之 他、血液脳関門・血液脳脊髄液関門の能動的関門機構としての有機アニオントランスポーターOAT3の重要性、第4回トランスポーター研究会九州部会、平成22年9月12日、長崎
- ⑫ (招待講演)楠原洋之、マイクロドーズ臨床試験による医薬品体内動態特性評価、第35回医用マスマスペクトル学会年会、平成22年9月10日、名古屋
- ⑬ Miyajima M 他、Involvement of multiple organic anion transporters in the brain-to-blood efflux of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)、Biomedical Transporters 2009、平成21年8月9日、トゥーン(スイス)
(ベストポスター賞に採択された)
- ⑭ (招待講演)楠原洋之、トランスポーターを介した薬物間相互作用の予測、医療薬学フォーラム2010、平成22年7月11日、広島
- ⑮ (招待講演)Kusuhara H、Role of Drug Transporters in the Blood-Brain Barrier、4th International Symposium Rational Integration of Transport Metabolism and Drug Delivery、平成22年5月26日、Soul, Korea
- ⑯ Kusuhara H 他、Multiplicity in the efflux transport system for organic anions at the blood-brain barrier、第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成21年12月1日、大阪
- ⑰ Kanamitsu K 他、Importance of multidrug resistance-associated protein 4 (mrp4) in blood-brain barrier、第24回日本薬物動態学会、平成21年11月27日、京都
- ⑱ Kodaira H 他、Quantitative investigation of the synergistic role of p-glycoprotein (p-gp/abcb1) and breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib and mitoxantrone、第24回日本薬物動態学会、平成21年11月28日、京都
- ⑲ Miyajima M 他、Multiple organic anion transporters involved in blood-brain barrier transport、第24回日本薬物動態学会、平成21年11月27日、京都
- ⑳ 楠原洋之 他、抗インフルエンザ薬 OSELTAMIVIR およびその活性体 RO64-0802 の脳内濃度の個体間変動の解析、第25回日本DDS学会、平成21年7月3日、東京
- ㉑ (招待講演)Kusuhara H、Investigation of the efflux mechanisms of oseltamivir and its active form RO64-0802 across the blood-brain barrier、8th Cerebral Vascular Biology International Conference、平成21年6月28日、仙台
- ㉒ Kodaira H 他、Active efflux across the blood-brain barrier causes differences between the drug concentrations in the extracellular fluid in the brain and csf、8th Cerebral Vascular Biology International Conference、平成21年6月28日、仙台
- ㉓ Miyajima M 他、Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is effluxed by organic anion transporter 3 across the blood-brain barrier、8th Cerebral Vascular Biology International Conference、平成21年6月28日、仙台
- ㉔ (招待講演)楠原洋之、トランスポーターノックアウトマウス、in vitro系を用いた医薬品体内動態の解析:腎臓、脳に焦点をあてて、第2回 Biomonthly Symposium トランスポーターシンポジウム:トランスポーター研究の新たな展開、平成21年6月2日、神戸
- ㉕ 小平浩史 他、脳脊髄液中薬物濃度が脳中遊離型薬物濃度の指標となるための条件解析、日本薬剤学会第24年会、平成21年5月21日、静岡
- ㉖ 宮島真理 他、デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体(DHEAS)の血液脳関門排出輸送機構の解析、日本薬剤学会第24年会、平成21年5月21日、静岡
- ㉗ 楠原洋之、杉山雄一、医薬品の中枢応答性と血液脳関門における異物排泄、日本薬学会、平成21年3月28日、京都
- ㉘ 宮島真理 他、血液脳関門におけるデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体(DHEAS)の輸送機構の解明、第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジ

- ウム、平成20年12月20日、京都
- ②⑨ 楠原洋之 他、抗インフルエンザ薬 oseltamivir およびその活性代謝物 Ro64-0802 の血液脳関門を介した排出メカニズムの解析、第29回日本臨床薬理学会年会、平成20年12月4日、東京
 - ③⑩ Miyajima M 他、Carrier-mediated efflux of DHEAS across the blood-brain barrier、第23回日本薬物動態学会、平成20年10月30日、熊本
 - ③⑪ Kodaira H 他、Can drug concentration in the cerebrospinal fluid be a surrogate for the unbound concentration of cns drugs in the brain?、第23回日本薬物動態学会、平成20年10月30日、熊本
 - ③⑫ Ose A 他、Active efflux of ro 64-0802, the active form of oseltamivir, across the blood-brain barrier、第23回日本薬物動態学会、平成20年10月30日、熊本
 - ③⑬ 楠原洋之、トランスポーターを利用した医薬品の中枢へのデリバリー、第24回日本DDS学会学術集会、平成20年6月29日、東京

〔図書〕(計3件)

- ① 楠原洋之、血液脳関門・腎尿細管分泌における薬物トランスポーターの役割、遺伝子医学Mook12 最新トランスポーター研究 2009、12(266)、2009
- ② 楠原洋之、前田和哉、杉山雄一、メディカルドゥ、薬物動態関連遺伝子多型による薬物動態の変動予測法の開発、”創薬技術の革新 マイクロドーズからPET分子イメージングへの新展開“(編集 杉山雄一、山下伸二、栗原千絵子)、10(243)、2010
- ③ 楠原洋之、メディカルドゥ、トランスポーターノックアウトマウスを用いた医薬品体内動態の解析、“トランスポートソーム 生体膜輸送機構の全体像に迫る”(編集 金井好克)、10(274)、2011

〔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.f.u-tokyo.ac.jp/~sugiyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠原 洋之 (KUSUHARA HIROYUKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：00302612

(2) 研究分担者

前田 和哉 (MAEDA KAZUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：00345258

(3) 連携研究者

渡辺 恭良 (WATANABE YASUYOSI)

理化学研究所分子イメージング科学研究

センター・センター長

研究者番号：40144399