

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460193

研究課題名(和文)新規カチオン性薬物輸送機構におけるオーファン分子の役割解明と創薬への展開

研究課題名(英文)Study of cationic drug efflux across the blood-retinal barrier

研究代表者

久保 義行(Kubo, Yoshiyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：20377427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：In vivo解析の結果、血液網膜関門においてクロニジンやニコチン、リボフラビン、L-オルニチンなどに対する取り込み輸送機構の存在が示唆された。モデル細胞を用いたin vitro解析の結果、これらカチオン性化合物の輸送は担体介在型であることが示唆され、特に、血液網膜関門クロニジン取り込み輸送機構が網膜への薬物送達に有用であることが示された。In vitro阻害解析やノックダウン解析の結果、血液網膜関門を介したL-オルニチン輸送にCAT1 (SLC7A1)の寄与が示唆されるとともに、内側血液網膜関門を介したリボフラビン輸送にRFVTs (SLC52A)の寄与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vivo transport study in rats suggested the facilitative transport systems for cationic compounds, such as clonidine, nicotine, riboflavin and L-ornithine at the blood-retinal barrier (BRB). In addition, in vitro transport study with TR-iBRB2 cells, an in vitro model cell line of the inner BRB, suggested the involvement of carrier-mediated process in these cationic drugs and compounds, showing the usefulness of clonidine transport system in systemic drug delivery to the retina. In vitro study of inhibition, vectorial transport and immunohistochemical analysis suggested the responsible contribution of cationic amino acid transporter 1 (CAT1/SLC7A1) to the blood-to-retina transport of L-ornithine at the inner and outer BRB. Knockdown study suggested the contribution of riboflavin transporter (RFVTs/SLC52A) to riboflavin transport at the inner BRB, and mRNA expression study supported that RFVT2 is dominant in the influx transport of riboflavin at the inner BRB.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：血液網膜関門 トランスポーター カチオン性薬物 神経保護薬

1. 研究開始当初の背景

安全な医薬品と適切な薬物療法の実施には、薬物体内動態を担う機能性タンパク質の機能と役割の解明が重要となる。特に、薬物の吸収や分布、排泄に重要な薬物輸送機構を担うトランスポーター分子の研究は、薬物送達法や精密な薬物動態予測法に直結し、社会的要請の高い医薬品の開発促進が期待される。近年、血液網膜関門では複数の新規薬物輸送機構の存在が示唆され、その特異な機能と創薬応用との連結には、トランスポーター分子の同定と機能の解明が重要である。

トランスポーターは生体の物質輸送を担う機能性タンパク質であり、薬物体内動態を制御する重要な生物化学的要因である。近年、血液網膜関門や血液脳関門などでは、複数の新規薬物輸送機構の存在が報告され、血液網膜関門においても血液網膜関門カチオン性薬物取り込み機構が複数存在することが明らかとなっている。これら薬物輸送機構に期待される創薬応用としては、医薬品の効率的薬物送達や精密な動態予測などが考えられ、その実現に必須の知見として、新規薬物輸送機構を担う分子機序の解明が挙げられる。特に、血液網膜関門カチオン性薬物取り込み機構は、カチオン性神経保護薬の新しい網膜送達機構と考えられることから、「組織関門特性を利用した疾患治療法の向上」として関心が寄せられている。このようなことから、カチオン性薬物取り込み機構と創薬の連結には、血液網膜関門に発現するトランスポーター分子の同定と機能の解明が必須と考えられる。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症などの重篤な網膜疾患は失明を引き起こし、罹患者のクオリティ オブ ライフ (quality of life; QOL) を著しく低下させることから、網膜疾患薬物療法は効率面や安全面の向上が望まれる。網膜疾患治療薬の候補となる神経保護薬には、多数のカチオン性薬物が含まれることから、血液網膜関門カチオン性薬物取り込み機構の解明は、血液網膜関門を介した網膜への効率的な薬物送達に直結するものと期待される。本研究では、血液網膜関門カチオン性薬物取り込み機構の創薬応用に向け、1) カチオン性化合物取り込み輸送機構の同定、2) 実体となるトランスポーターの分子、3) 個体や組織での役割、を検証・解明することを目的とする。

3. 研究の方法

カチオン性化合物輸送を明らかとする目的で、ラット個体においてインテグレーションプロット法、レチナルアップテイクインデックス (retinal uptake index ; RUI) 法、マイクロダイアリシス法などの *in vivo* 輸送解析を実施した。

また、カチオン性化合物輸送の詳細を明ら

かとする目的で、内側血液網膜関門モデル細胞 (ラット毛細血管内皮細胞 ; TR-iBRB2 細胞) および外側血液網膜関門モデル細胞 (ラット由来の RPE-J 細胞) における *in vitro* 輸送解析を実施した。また、カチオン性化合物の輸送を担うトランスポーター分子を探索するために、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞や培養細胞における遺伝子発現系解析も実施した。

カチオン性化合物の方向性輸送を明らかとする目的で、トランスウェルを用いた *in vitro* 輸送解析を実施するとともに、免疫組織化学的手法によって、血液網膜関門におけるトランスポーター分子の局在を検証した。

さらに、カチオン性化合物輸送に対するトランスポーター分子の寄与を明らかとするために、モデル細胞への siRNA をトランスフェクションし、遺伝子ノックダウン解析を実施した。血液網膜関門モデル細胞におけるトランスポーター mRNA 発現は、total RNA を調製した後に逆転写 PCR (RT-PCR) 法によって解析した。また、siRNA によるノックダウン効率はリアルタイム PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

(1) *In vivo* 輸送解析

ラットを用いた *in vivo* 解析においては、カチオン性薬物であるクロニジンやカチオン性化合物であるニコチン、リボフラビン、L-オルニチンが網膜内に積極的に輸送されることが示唆され、血液網膜関門にはこれらを基質とするカチオン性化合物取り込み輸送機構が生理的に存在することが示唆された。*In vivo* 阻害解析においてこれらカチオン性化合物の輸送は有意な自己阻害を示したことから、その輸送機構として、トランスポーターなどが寄与する担体介在型輸送が予想された。

(2) *In vitro* 輸送解析とクロニジン取り込み輸送機構

内側血液網膜関門モデル細胞である TR-iBRB2 細胞を用いた解析において、クロニジンやニコチン、リボフラビン、L-オルニチンの輸送が温度依存性や飽和性を示すことが明らかとなり、内側血液網膜関門におけるこれらカチオン性化合物の輸送が担体介在型輸送であることが示唆された。

In vitro 阻害解析において、TR-iBRB2 細胞によるクロニジン輸送やニコチン輸送はベラパミルやイミプラミン、ピリラミンなどのカチオン性薬物によって有意に阻害された。また、TR-iBRB2 細胞によるリボフラビン輸送はそのアナログ化合物であるフラビンアデニンジヌクレオチド (flavin adenine dinucleotide; FAD) やルミクロム、ルミフラビンによって有意に阻害され、TR-iBRB2 細胞による L-オルニチン輸送は塩基性アミノ酸である L-リシンや L-アルギニンによ

て有意に阻害された。これらの解析結果は、内側血液網膜関門に存在するカチオン性化合物取り込み輸送機構が基質特異性を有することを示唆しており、これら各々の取り込み輸送機構にトランスポーターの寄与が考えられた。特に、クロニジンに関しては神経保護作用が報告されていることから、内側血液網膜関門において示唆されたクロニジン取り込み輸送機構が、網膜への神経保護作用薬の送達に有用であることが示唆された。

(3) 血液網膜関門を介した L-オルニチン輸送における CAT1 の寄与

L-オルニチンに関しては、TR-iBRB2 細胞における詳細な *in vitro* 阻害解析の結果から、内側血液網膜関門における L-オルニチン取り込み輸送機構の基質特異性が明らかとなり、その分子実体として cationic amino acid transporter 1 (CAT1/SLC7A1) の寄与が示唆された。さらに、トランスウェル[®]上では外側血液網膜関門モデル細胞である RPE-J 細胞による方向性輸送を解析した結果、外側血液網膜関門における L-オルニチン輸送は血液から網膜方向が優勢であることが示唆された。これに関しては、CAT1 タンパク質に対する特異的抗体を用いた免疫組織学的解析も実施し、CAT1 タンパク質が内側血液網膜関門においてルミナル膜側およびアブルミナル膜側の両方に局在していることに加え、外側血液網膜関門において基底膜側に局在していることが明らかとなり、外側血液網膜関門における方向性輸送はタンパク質局在の観点からも支持された。

(4) 内側血液網膜関門を介したリボフラビン輸送における RFVTs の寄与

L-オルニチンと同様に、リボフラビンに関しても詳細な *in vitro* 阻害解析を実施した結果、内側血液網膜関門におけるリボフラビン取り込みの分子実体としてリボフラビントランスポーター (riboflavin transporters; RFVTs/SLC52A) の寄与が示唆された。RT-PCR を用いて SLC52A アイソフォームの発現解析を実施した結果、TR-iBRB2 細胞において RFVT2 (Slc52a2) および RFVT3 (Slc52a3) の転写産物の発現が示され、内側血液網膜関門におけるこれらトランスポーターの発現が示唆された。内側血液網膜関門における RFVT2 および RFVT3 の寄与を検証するために *in vitro* ノックダウン解析を実施した結果、内側血液網膜関門を介したリボフラビン輸送における RFVT2 および RFVT3 の寄与が示唆された。別途実施したリアルタイム PCR の結果を考慮すると、RFVT2 の寄与がより優勢であると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1) Kubo Y, Yahata S, Miki S, Akanuma S,

Hosoya K. Blood-to-retina transport of riboflavin via RFVTs at the inner blood-retinal barrier. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有. 32. 92-99 (2017).

DOI: 10.1016/j.dmpk.2016.09.006

(2) Usui T, Nakazawa A, Okura T, Deguchi Y, Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K. Histamine elimination from the cerebrospinal fluid across the blood-cerebrospinal fluid barrier: involvement of plasma membrane monoamine transporter (PMAT/SLC29A4). *J Neurochem.* 査読有. 139. 408-418 (2016).

DOI: 10.1111/jnc.13758

(3) Kubo Y, Seko N, Usui T, Akanuma S, Hosoya K. Lysosomal Trapping Is Present in Retinal Capillary Endothelial Cells: Insight into Its Influence on Cationic Drug Transport at the Inner Blood-Retinal Barrier. *Biol Pharm Bull.* 査読有. 39. 1319-24 (2016).

DOI: 10.1248/bpb.b16-00140

(4) Tega Y, Yuzurihara C, Kubo Y, Akanuma S, Ehrhardt C, Hosoya K. Functional expression of nicotine influx transporter in A549 human alveolar epithelial cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有. 31. 99-101 (2016).

DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.11.006

(5) Kubo Y, Akanuma S, Hosoya K. Impact of SLC6A transporters in physiological taurine transport at the blood-retinal barrier and liver. *Biol Pharm Bull.* 査読有. 39. 1903-1911 (2016).

(6) Kubo Y. Carrier-mediated Transport of Cationic Drugs across the Blood-Tissue Barrier. *Yakugaku Zasshi.* 査読有. 135. 1135-40 (2015).

DOI: 10.1248/yakushi.15-00181

(7) Tega Y, Kubo Y, Yuzurihara C, Akanuma S, Hosoya K. Carrier-Mediated Transport of Nicotine Across the Inner Blood-Retinal Barrier: Involvement of a Novel Organic Cation Transporter Driven by an Outward H(+) Gradient. *J Pharm Sci.* 査読有. 104. 3069-75 (2015).

DOI: 10.1002/jps.24453

(8) Kubo Y, Obata A, Akanuma S, Hosoya K. Impact of Cationic Amino Acid Transporter 1 on Blood-Retinal Barrier Transport of L-Ornithine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 査読有. 56. 5925-32 (2015).

DOI: 10.1167/iovs.15-17398

(9) Kubo Y, Tsuchiyama A, Shimizu Y, Akanuma S, Hosoya K. Involvement of

carrier-mediated transport in the retinal uptake of clonidine at the inner blood-retinal barrier. Mol Pharm. 査読有. 11. 3747-53 (2014). DOI: 10.1021/mp500516j

〔学会発表〕(計 25 件)

- (1) 中沢 亜弓, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 血液網膜関門を介した verapamil 輸送における lysosomal trapping の関与. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年 3 月 27 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).
- (2) 久保義行. 血液網膜関門におけるカチオン性薬物・栄養物輸送機構. 第 38 回生体膜と薬物相互作用シンポジウム. 2016 年 11 月 18 日. 名古屋市立大学(愛知県名古屋市).
- (3) 久保義行. 血液組織関門における塩基性薬物吸排制御機構に関する研究. 日本薬物動態学会第 31 回年会. 2016 年 10 月 14 日. キッセイ文化ホール(長野県松本市).
- (4) 久保義行, 八幡静香, 三木智史, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液網膜関門における SLC52A/RFVT を介した riboflavin 輸送. 日本薬物動態学会第 31 回年会. 2016 年 10 月 14 日. キッセイ文化ホール(長野県松本市).
- (5) 久保義行, 三浦宏明, 富瀬彩加, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液網膜関門を介した網膜からのポリアミン排出輸送機構の解明. 日本脂質栄養学会第 25 回大会. 2016 年 9 月 16 日. にぎわい交流館(秋田県秋田市).
- (6) Kubo Y. Impact of carrier-mediated transport of cationic neuroprotectants to the retina. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network. 2016 年 9 月 12 日. Toyama International Conference Center (Toyama, Japan).
- (7) Usui T, Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K. Histamine elimination from the cerebrospinal fluid: involvement of plasma membrane monoamine transporter at choroid plexus epithelial cells. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network. 2016 年 9 月 12 日. Toyama International Conference Center (Toyama, Japan).
- (8) Tega Y, Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K. Functional expression of nicotinic influx transporter driven by an outward H^+ gradient in rat blood-brain and liver. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network. 2016 年 9 月 12 日. Toyama International Conference Center (Toyama, Japan).
- (9) 久保義行, 三浦宏明, 富瀬彩加, 赤沼伸乙, 細谷健一. 内側血液網膜関門における担体介在型 putrescine 輸送機構の解明. 日本薬学会第 31 年会. 2016 年 5 月 19 日. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).
- (10) 三浦宏明, 富瀬彩加, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 内側血液網膜関門を介した網膜からの putrescine 排出輸送機構の解明. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 27 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
- (11) 手賀悠真, 譲原千広, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. Nicotine 生体膜輸送における H^+ /有機カチオン交換輸送体の関与. 第 37 回生体膜と薬物相互作用シンポジウム. 2015 年 11 月 19 日. 熊本大学(熊本県熊本市).
- (12) 八幡静香, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 網膜への riboflavin 供給に対する血液網膜関門輸送機構の関与. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 年 11 月 15 日. 富山大学(富山県富山市).
- (13) 中沢亜弓, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. Verapamil 網膜関門透過に対する lysosomal trapping の寄与. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 年 11 月 15 日. 富山大学(富山県富山市).
- (14) 譲原千広, 手賀悠真, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 血液網膜関門における nicotine 輸送機構の解明. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 年 11 月 15 日. 富山大学(富山県富山市).
- (15) 三浦宏明, 富瀬彩加, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 内側血液網膜関門を介した網膜から循環血液へのプトレシン輸送における輸送担体の関与. 日本薬物動態学会第 30 年会. 2015 年 11 月 13 日. 船堀タワーホール(東京都).
- (16) 久保義行, 山本正和, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液網膜関門を介したカチオン性化合物排出輸送機構における PMAT (SLC29A4) の関与. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会. 2015 年 5 月 28 日. オークスカナルパーク富山(富山県富山市).
- (17) 臼井拓也, 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液脳脊髄液関門を介したヒスタミン排出輸送における PMAT の関与. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会. 2015 年 5 月 28 日. オークスカナルパーク富山(富山県富山市).
- (18) 手賀悠真, 譲原千広, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 内側血液網膜関門を介したニコチン輸送における H^+ /有機カチオン対向輸送体の関与. フォーラ

ム富山「創薬」第41回研究会. 2015年5月28日. オークスカナルパーク富山(富山県富山市).

- (19) 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液網膜関門におけるカチオン性薬物輸送機構. 第36回生体膜と薬物相互作用シンポジウム. 2014年11月21日. 徳島大学(徳島県徳島市).
- (20) 久保義行. 血液組織関門におけるカチオン性薬物輸送機構の解明. 日本薬学会北陸支部第126例会. 2014年11月16日. 金沢大学(石川県金沢市).
- (21) 山本正和, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. *In vitro* 血液網膜関門モデルにおける 1-methyl-4-phenylpyridinium 輸送解析. 日本薬学会北陸支部第126回例会. 2014年11月16日. 金沢大学(石川県金沢市).
- (22) 瀬古成美, 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一. 網膜毛細血管内皮細胞へのカチオン性薬物取り込みに対する lysosomal trapping の影響. 日本薬学会北陸支部第126回例会. 2014年11月16日. 金沢大学(石川県金沢市).
- (23) Kubo Y, Tsuchiyama A, Shimizu Y, Akanuma S, Hosoya K. The blood-to-retina transport of clonidine at the inner blood-retinal barrier. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting. 2014年10月22日. Hilton San Francisco (San Francisco, USA).
- (24) Tega Y, Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K. Nicotine transport in the rat blood-brain barrier and liver: Involvement of the proton-coupled organic cation transporter. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting (2014年10月22日. Hilton San Francisco (San Francisco, USA).
- (25) Usui T, Kubo Y, Akanuma S, Hosoya K. Involvement of PMAT in histamine efflux from the cerebrospinal fluid across the blood-cerebrospinal fluid barrier. 19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting 2014年10月22日. Hilton San Francisco (San Francisco, USA).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 義行 (KUBO, Yoshiyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号: 20377427

(2) 研究分担者

赤沼 伸乙 (AKANUMA, Shin-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号: 30467089

(3) 連携研究者

細谷 健一 (HOSOYA, Ken-ichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号: 70301033

西 毅 (Nishi, Tsuyoshi)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号: 60403002