

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08409

研究課題名(和文) 血液網膜関門カチオン性薬物エフラックス機構の分子機序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・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：20377427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物輸送機構の創薬応用に向け、血液網膜関門カチオン性薬物エフラックス機構の検証・解明を目的とした。In vivo解析では、血液網膜関門において1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)やputrescineなどを基質とするエフラックス機構が示唆された。またIn vitro機能特性評価では、血液網膜関門におけるMPP+やputrescineのエフラックス輸送機構が担体介在輸送であることが示唆され、これら輸送機構の分子実体が未知のトランスポーター分子であることが示唆された。さらにこれらを担う分子実体の同定に向け、遺伝子発現系を利用した輸送機能評価を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液網膜関門では神経保護作用を有する薬物を基質とする血液網膜関門カチオン性薬物インフラックス機構が発見され、網膜疾患治療薬の効率的送達などへの応用が期待されている。これに加え、血液網膜関門カチオン性薬物エフラックス機構が網膜疾患治療薬の体内動態に重要な影響を及ぼすことが予想され、P-gpなどとは明確に異なるエフラックス輸送機構の探索と機能解明は、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とともに、網膜疾患治療の向上に寄与すると期待される。特に、重篤な網膜疾患においては失明を伴うことが知られており、患者のQOL低下も深刻である。本研究はこの問題解決の一助となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to clarify the efflux transport system of cationic drugs at the blood-retinal barrier (BRB). The in vivo analysis, with microdialysis and retinal uptake index, suggested efflux transport systems for 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and putrescine at the BRB since these cationic compounds showed the faster elimination from the retina than that of D-mannitol, a bulk flow marker. In the in vitro analysis with the in vitro model cell line of inner and outer BRB, the study of temperature-dependence, ionic condition, concentration-dependence and inhibition suggested the involvement of carrier-mediated transport in the efflux transport of cations, such as MPP+ and putrescine, at the inner and outer BRB, although their responsible molecules still remains unknown. These results will provide helpful information for the establishment of safe and efficient drug delivery to the retina.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：血液網膜関門 エフラックス トランスポーター カチオン性薬物

1. 研究開始当初の背景

安全な医薬品創成と適切な薬物療法の実施には、薬物動態を制御するタンパク質分子の機能と役割の解明が必須である。特に、トランスポーターは生体の輸送機構を担う重要な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と位置づけられる。これまでに血液網膜関門や血液脳関門では、複数の新規薬物輸送機構が見出されており、これら薬物輸送機構が、医薬品の効率的薬物送達や精密な動態予測などにおいて有用であることが示唆された。

特に、網膜への薬物取り込みに寄与する血液網膜関門カチオン性薬物インフラックス機構に関しては、カチオン性神経保護作用薬の新しい網膜送達機構として期待される一方、さらなるアンメットメディカルニーズの解決には、血液網膜関門において、薬物インフラックス機構に加え、薬物エフラックス機構を含めたカチオン性薬物輸送機構の全容を解明し、網膜での精密な薬物動態予測を図ることが必須と考えられた。

2. 研究の目的

薬物の吸収や分布、排泄に重要な薬物輸送機構およびその分子実体となるトランスポーター分子の研究は、薬物送達法開発や薬物動態予測の精密化に直結し、これによってアンメットメディカルニーズの解消などが期待される。本研究では、組織関門薬物輸送機構の創薬応用に向け、血液網膜関門カチオン性薬物エフラックス機構に着目し、1)新規薬物輸送機構と機能特性、2)分子実体、3)個体での役割、4)病態変動、を検証・解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、カチオン性薬物エフラックス機構を探索する目的で、*in vivo* 輸送解析において種々テスト化合物を用いたマイクロダイアリシス解析を実施した。また、カチオン性薬物エフラックス機構の詳細な機能特性を明らかにする目的で、内側および外側血液網膜関門モデル細胞系を利用した *in vitro* 輸送解析を実施した。さらに、薬物エフラックス機構の分子実体を同定する目的で、遺伝子発現系解析や遺伝子ノックダウン解析を実施するとともに、分子の発現・局在を明らかにする。その特異的抗体を用いた免疫組織学的解析を実施した。

4. 研究成果

*In vivo*における薬物エフラックス機構の新規探索

血液網膜関門において、1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)を基質とするエフラックス機構が存在することが示唆された。MPP⁺は、神経毒性を有するカチオン性化合物であることから、今回の *in vivo* 解析の結果は、このカチオン性化合物エフラックス機構の生理的および薬理学的重要性を支持するものであった。マイクロダイアリシス法および retinal uptake index (RUI)法を用いた解析を実施した結果、bulk flow marker である [¹⁴C]D-mannitol に比して、[³H]MPP⁺ がより早い消失特性を示したことから、カチオン性化合物である MPP⁺ を基質とするエフラックス機構が血液網膜関門に存在することが支持された。さらに本解析においては、ポリアミンの1種である putrescine を基質とするエフラックス機構の存在が示唆された。Microdialysis 法や retinal uptake index 法による解析を実施した結果、bulk flow marker である [¹⁴C]D-mannitol に比して [³H]putrescine がより早い消失特性を有することが明らかとなった。Putrescine には、網膜内における生理活性が報告されており、血液網膜関門におけるカチオン性化合物エフラックス機構が網膜内 putrescine 恒常性に寄与していることが示唆された。

薬物エフラックス機構の *in vitro* 機能特性評価

内側血液網膜関門および外側血液網膜関門のモデル細胞として TR-iBRB2 細胞と初代培養 RPE 細胞を採用し、*in vitro* 解析を実施した。その結果、内側血液網膜関門および外側血液網膜関門における MPP⁺ エフラックス輸送が担体介在輸送であることが示唆された。また、*in vitro* 輸送特性解析の結果、MPP⁺ エフラックス輸送の膜電位感受性および、ナトリウムイオンおよびクロライドイオン、pH 非感受性が示された。また、種々のトランスポーター分子の基質や阻害剤を用いた解析では、これら関門における MPP⁺ エフラックス機構の分子実体が未知のトランスポーター分子であることが示唆された。また putrescine に関しては、内側血液網膜関門および外側血液網膜関門のモデル細胞として TR-iBRB2 細胞と RPE-J 細胞を採用し *in vitro* 解析を実施し、その分子実体が未知のトランスポーター分子であることが示唆された。

薬物エフラックス機構の分子実体の探索・同定

内側血液網膜関門および外側血液網膜関門のモデル細胞として TR-iBRB2 細胞と初代培養 RPE 細胞 (あるいは RPE-J 細胞) を採用して転写産物発現解析を実施した。その結果、内側および外

側血液網膜関門には、OCTN1 (SLC22A4)や OCTN2 (SLC22A5)、PMAT (SLC29A4)、MATE (SLC47A1) などの発現が示唆された。さらに、MPP⁺および putrescine 輸送機構の分子実体を同定するため、機能未知のトランスポーター分子に関して、特異的抗体の作成およびアフリカツメガエル卵母細胞や HEK293 発現系を利用した輸送機能評価を実施した。また、本研究計画に有効な新たな解析手法として、蛍光基質を活用した輸送解析を試み、これを riboflavin や vitamin B₁₂ 輸送機構、lysosomal trapping 機構などの解析に試用した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 久保 義行	4. 巻 55
2. 論文標題 蛍光標識体を用いた血液網膜関門輸送機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1145 ~ 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.12_1145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Miki Satoshi, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Riboflavin transport mediated by riboflavin transporters (RFVTs/SLC52A) at the rat outer blood-retinal barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 380 ~ 386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2019.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Yuri, Nogami Kagayaki, Jomura Ryuta, Akanuma Shin-ich, Abe Hajime, Inouye Masahiko, Kubo Yoshiyuki, Hosoya Ken-ichi.	4. 巻 15
2. 論文標題 Investigation of Receptor-Mediated Cyanocobalamin (Vitamin B12) Transport across the Inner Blood-Retinal Barrier Using Fluorescence-Labeled Cyanocobalamin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 3583-3594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology	6. 最初と最後の頁 513-531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17425255.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Nakazawa Ayumi, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Blood-to-Retina Transport of Fluorescence-Labeled Verapamil at the Blood-Retinal Barrier	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-018-2384-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 40
2. 論文標題 Influx Transport of Cationic Drug at the Blood-Retinal Barrier: Impact on the Retinal Delivery of Neuroprotectants	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1139 ~ 1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Yamamoto Masakazu, Matsunaga Kensuke, Usui Takuya, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 106
2. 論文標題 Retina-to-Blood Transport of 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Involves Carrier-Mediated Process at the Blood-Retinal Barrier	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2583 ~ 2591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2017.04.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山田未希, 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 血液網膜関門カチオン性薬物輸送におけるlysosome内取り込みの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (京都)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 蛍光標識化合物を用いた血液網膜関門輸送機構の解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保義行, 李 開理, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 外側血液網膜関門におけるputrescine輸送特性の解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福永飛自幾, 定村龍太, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター・MCT14 の輸送機能および網膜における発現局在解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部会第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田未希, 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 血液網膜関門カチオン性薬物輸送におけるlysosomal trappingの影響 : リソソーム濃縮画分を用いたアプローチ
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部会第131回例会(金沢)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保義行, 李 開理, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 外側血液網膜関門を介したputrescine輸送特性の解明
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 開理, 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞における putrescine 輸送特性の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保義行
2. 発表標題 生体内薬物輸送機構の解明と創薬への応用
3. 学会等名 Toyama Academic GALA 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kinoshita Yuri, Nogami Kagayaki, Jomura Ryuta, Akanuma Shin-ich, Abe Hajime, Inouye Masahiko, Kubo Yoshiyuki, Hosoya Ken-ichi.
2. 発表標題 Study of receptor-mediated cyanocobalamin (vitamin B12) transport at the blood-retinal barrier with Cy5-labeled cyanocobalamin
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会/第22回MD0シンポジウム国際合同学会(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保義行、木下由梨、野上暁生、阿部 肇、井上将彦、赤沼伸乙、細谷健一
2. 発表標題 内側血液網膜閉門におけるcyanocobalamin (vitamin B12)輸送機構の解明
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 粉川紗希、久保義行、赤沼伸乙、細谷健一
2. 発表標題 内側血液網膜閉門におけるカチオン性薬物輸送に及ぼす酸性小胞内蓄積の影響
3. 学会等名 日本薬学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 開理、赤沼伸乙、久保義行、細谷健一
2. 発表標題 外側血液網膜閉門におけるputrescine輸送機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 粉川 紗希、久保義行、赤沼伸乙、細谷健一
2. 発表標題 内側血液網膜閉門カチオン性薬物輸送に対する酸性小胞内蓄積機構の寄与
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保義行, 三浦宏明, 富瀬彩加, 李開理, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 血液網膜関門を介したpolyamine排出輸送機構
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保義行, 木下由梨, 野上暁生, 阿部 肇, 井上将彦, 赤沼伸乙, 細谷健一
2. 発表標題 内側血液網膜関門を介したcyanocobalamin取り込み輸送機構
3. 学会等名 日本薬剤学会第32年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kubo Yoshiyuki, Akanuma Shin-ichi, Hosoya Ken-ichi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 17
3. 書名 In vivo analysis to study transport across the blood-retinal barrier. ' Barichello T / Springer Protocols, Blood-Brain Barrier, Neuromethods 142	

1. 著者名 Akanuma Shin-ichi, Kubo Yoshiyuki, Hosoya Ken-ichi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 18
3. 書名 Techniques for evaluating efflux transport of radiolabeled drugs and compounds from the cerebrospinal fluid across the blood-cerebrospinal fluid barrier. ' Barichello T / Springer Protocols, Blood-Brain Barrier, Neuromethods 142	

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学 大学院医学薬学部 薬剤学研究室
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>
 富山大学 薬学部
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp>
 富山大学薬学部薬剤学研究室
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phaphzai/index-j.html>
 富山大学薬学部
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	赤沼 伸乙 (Akanuma Shin-ichi) (30467089)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教 (13201)	