

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07160

研究課題名(和文) 網膜への薬物送達実現に向けた血液網膜関門薬物排出輸送能のex vivo評価法開発

研究課題名(英文) Establishing ex vivo methods to elucidate efflux transport of drugs at the blood-retinal barrier for retinal drug development

研究代表者

赤沼 伸乙 (Akanuma, Shin-ichi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：30467089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、循環血液と網膜とを直接的に隔てる内側血液網膜関門(inner BRB)における薬物の輸送機能を評価可能な、新たなex vivo実験系の確立を目的としている。Inner BRBの実体である網膜毛細血管内皮細胞を凍結や酵素処理などの操作を介さず、ラット4匹分の網膜から解析を実施するにあたり十分量単離することに成功した。単離した網膜毛細血管を用いた蛍光基質イメージング解析によって、inner BRBにおける薬物排出輸送担体の機能が維持されていることが示唆された。以上から、inner BRB薬物排出輸送担体の機能とその変動を、本ex vivo実験系では解析可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのinner BRBを対象としたin vitro実験系では、P-糖タンパク質などのin vivoでは重要性が示されていた一部の分子について、その発現・機能が十分に解析出来ないことが知られている。今回確立したex vivo実験系ではP-糖タンパク質などの「循環血液から網膜への薬物移行を制限する」輸送担体の機能解析が可能であることが示唆された。本実験手法を活用することで、inner BRBを介した網膜への薬物分布能を制御する機構の理解が進み、そして網膜への移行性が高い薬物選定の方法論構築が加速すると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a new ex vivo experiment to elucidate drug transport function at the inner blood-retinal barrier (BRB), which directly separates the neural retina from the circulating blood. From retinae of 4 rats, we can freshly obtain enough retinal capillaries without freezing the sample and treating enzymes. Moreover, analyses by the isolated retinal capillaries using fluorescent substrates of drug transporters at the inner BRB indicate that function of these transporters is retained in the retinal capillaries. Consequently, it is suggested that ex vivo studies by the isolated retinal capillaries enable us to evaluate the function of drug transporters at the inner BRB and its regulatory systems.

研究分野：中枢神経系関門薬物動態学

キーワード：血液網膜関門 網膜毛細血管 トランスポーター P-糖タンパク質 イメージング

1. 研究開始当初の背景

網膜は「見る」を司る中枢神経系組織であり、外部からの物質到達が非常に困難な組織である。この困難さのために、糖尿病網膜症や緑内障などの網膜疾患時に、網膜へと薬物を送達する技術が限られている。例えば、糖尿病網膜症時にステロイド剤などを硝子体内に投与されている。この硝子体内投与は、医師による手術が必要され、さらに眼球に注射針を直接刺すため、罹患者の精神的負担も大きい。従って、内服や循環血液中への薬剤投与による網膜疾患に対する治療は、医師・患者に負担が小さい、革新的な医療技術と言える。

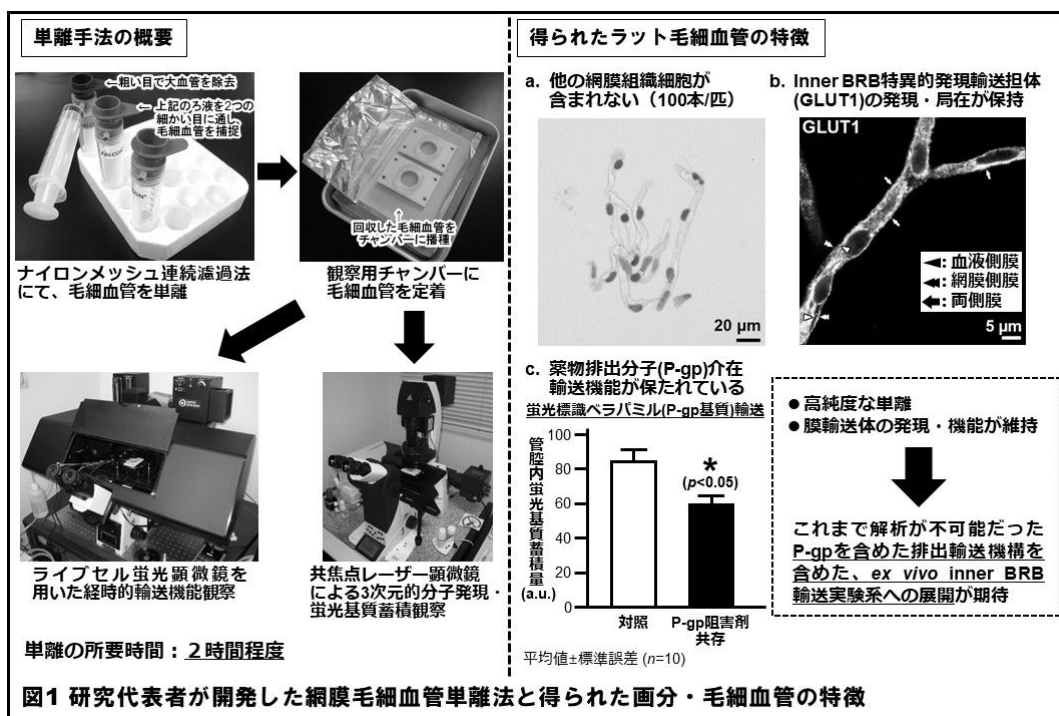
この革新的医療法を確立させるために課題となるのは、循環血液と網膜とを隔てる血液網膜関門(BRB)の突破である。BRBは、網膜毛細血管内皮細胞を実体とする内側血液網膜関門(inner BRB)と外側血液網膜関門(outer BRB)にて構成されている。網膜毛細血管は網膜組織内を張り巡らされているため、網膜実質組織と循環血液中との物質交換を担うのは、主に inner BRB である。従って、inner BRB を介した薬物透過評価系は循環血液中薬物投与による網膜疾患治療法の実現に貢献する技術である。

研究代表者らは、*in vitro* inner BRB モデル細胞 (TR-iBRB2 細胞) を活用し、inner BRB に発現する循環血液-網膜間への薬物交換を制御する分子実体を特定してきている。一方で、網膜への薬物移行を制限する排出輸送担体、P-糖タンパク質 (P-gp) や多剤耐性関連タンパク質 (MRP)、乳がん耐性タンパク質 (BCRP) について、inner BRB 発現の報告があるものの、*in vitro* におけるこれら分子の機能評価は進んでいない。これは、P-gp などの機能が TR-iBRB2 細胞において一部反映されていないことに起因する (*Pharm. Res.*, 20, 1357-63 (2003))。これら輸送担体が要因で、脳・網膜へ薬物が循環血液から到達出来ず、内服薬としての開発が断念されることが知られている。従って、これら *in vivo* にて高い重要性を示す輸送担体の機能を評価可能な、かつ TR-iBRB2 細胞などの *in vitro* モデルを超えた、解析法確立が課題である。

2. 研究の目的

本研究開始前に、研究代表者は予備的に低侵襲的に inner BRB の実体である網膜毛細血管を単離する方法を見出した。これまでの網膜毛細血管、もしくは本血管内皮細胞を調製する方法として、凍結処理やコラゲナーゼなどの酵素処理を施した手法が執られていた。一方、我々が見出した方法は網膜ホモジネートを複数のナイロンメッシュにて連続ろ過することによって網膜毛細血管を回収するものであり、ラット 1 匹から 100 本程度の網膜毛細血管が単離可能であった。さらに、この単離網膜毛細血管をカスタム設計した観察用チャンパーに播種することで免疫染色や輸送解析に供する可能性が見出された。さらに、*in vitro* 細胞株では機能低下が示された P-gp の機能は本単離血管ではその機能が維持されていることが示唆された (図 1)。

以上のように、申請者が予備的に確立した *ex vivo* 手法は *in vitro* では解析が困難であった薬物輸送担体の inner BRB における役割に迫ることが可能と期待される。本研究の目的は、この *ex vivo* 単離網膜毛細血管解析系が、inner BRB を介した薬物の網膜分布を制御する分子機構を解明する上で高い優位性を有していることの実証である。



3. 研究の方法

雄性 Wistar/ST 系統ラット (160-200 g) を安楽死させた後、眼球を摘出した。摘出した眼球から網膜を回収し、buffer 中にてガラス製ポッター型ホモジナイザーにてホモジナイズした。最終濃度 15% となるように、Ficoll® PM 400 溶液を加え、遠心した (4,500 × g, 4°C, 25 分)。Pellet を buffer に懸濁後、200 μm ナイロンメッシュを使ってろ過し、そのろ液をさらに 40 μm ナイロンメッシュにてろ過した。そのろ液を 30 μm ナイロンメッシュにて処理し、本メッシュ上にて捕捉されたサンプルを網膜毛細血管フラクションとして回収した。本フラクションは buffer にて 2 回洗浄し、明視野顕微鏡にて網膜毛細血管が回収されたことを確認した後、各種解析に供した。

分子発現解析について、網膜毛細血管フラクションを観察用チャンバーにて播種後、3% パラホルムアルデヒド/0.25% グルタルアルデヒド/リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて固定処理し、0.5% Triton X-100 にて透過処理を行った後に、ブロッキング・抗原抗体反応を行った。タンパク質分子発現局在は共焦点レーザー顕微鏡による観察にて解析した。mRNA 発現は、本フラクションから total RNA を調製し、これをサンプルとして reverse transcription-polymerase chain reaction にて解析した。

P-糖タンパク質介在輸送を解析するため、特異的基質として知られる cyclosporin A を蛍光団である NBD で標識した NBD-cyclosporin A を合成した。本標識体が P-gp の輸送基質となるかは、P-gp 過剰発現株である LLC-GA5-Col300 細胞を用いて検証した。ラット単離網膜毛細血管における P-gp 介在輸送機能を評価するため、網膜毛細血管フラクションを観察用チャンバーに播種し、室温にて約 15 分インキュベートすることで定着させた。NBD-cyclosporin A 含有 buffer を apply することで反応を開始し、指定時間後に共焦点レーザーにて毛細血管管腔内への NBD-cyclosporin A 蓄積を観察した。撮影した image について、NBD-cyclosporin A 由来の蛍光を 8 bit グレースケール化し、網膜毛細血管管腔内における単位面積当たりの pixel 輝度を 0-255 の範囲での arbitrary unit (a.u.) として算出し、蛍光基質輸送活性とした。

他の蛍光団標識トランスポーター基質として、BCRP 基質として BODIPY®-prazosin を、MRP4 基質として 8-(2-[fluoresceinyl]aminoethylthio) adenosine-3',5'-cyclicmonophosphate (8-[fluor]-cAMP) を用いた。なお、8-[fluor]-cAMP が他の BBB トランスポーターに認識される可能性は、トランスポーター過剰発現アフリカツメガエル卵母細胞発現系にて評価した。

4. 研究成果 (引用文献(1))

(1) ラットからの単離網膜毛細血管単離

Wistar 系ラット網膜 4 匹分の網膜 (約 100 mg) から解析を実施するにあたり十分な、直径 10 μm の網膜毛細血管を単離することが可能となった。単離した血管を inner BRB マーカータンパク質であるグルコーストランスポーター1 (GLUT1) に対する抗体にて免疫染色を行ったところ、血管の形質膜において強力なシグナルが検出されたことから、単離した血管が網膜毛細血管であることが確認された。さらに、各種網膜組織細胞を対象とした mRNA 発現解析の結果、調製した網膜毛細血管フラクションにおける網膜神経細胞や Müller 細胞 (網膜固有グリア)、網膜ペリサイトの混入は最小限であることが示唆された。以上のことから、確立した手法にて他の網膜細胞の混入が最小限の網膜毛細血管フラクションが調製されることが示唆された。

(2) ラット単離網膜毛細血管における P-gp 機能

調製した単離網膜毛細血管における P-gp 機能を精査するため、4-vinylbenzylamine を利用した cyclosporin A の NBD 標識を行った。合成した NBD-cyclosporin A の P-gp 過剰発現細胞における取り込みは、P-gp 基質である verapamil と quinidine 共存によって有意に上昇した。従って、本研究にて合成した NBD-cyclosporin A は P-gp を介し輸送されることが示唆された。

この NBD-cyclosporin A を単離網膜毛細血管フラクションとインキュベートした結果、単離網膜毛細血管内腔への NBD-cyclosporin A の蓄積が示された。さらに、この蓄積は P-gp の基質共存によって有意に阻害された。以上の結果から、凍結・酵素処理を施さずに回収した本網膜毛細血管において P-gp 介在薬物輸送機能は保持されていることが示唆された。

(3) 本単離網膜毛細血管における BODIPY®-prazosin 及び 8-[fluor]-cAMP の輸送機能

BCRP の蛍光基質である BODIPY®-prazosin を用い、単離網膜毛細血管フラクションを用いた輸送解析を行った。本血管管腔への BODIPY®-prazosin の蓄積は BCRP 阻害剤である Ko 143 共存によって有意に低下した。従って、単離した網膜毛細血管において P-gp と同様に BCRP もまた機能が維持されていることが示唆された。

MRP4 基質として報告されている 8-[fluor]-cAMP の単離網膜毛細血管内腔への蓄積は、MRP4 の阻害剤として知られる dipyrindamole 共存によって有意に低下したことから、単離網膜毛細血管において MRP4 機能が保持されていることが示唆された。また、MRP4 だけではなく有機アニオントランスポーター3 (OAT3) の基質としても知られる benzylpenicillin の共存においても、網膜毛細血管管腔内への 8-[fluor]-cAMP 蓄積は有意に低下した。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた解析において、OAT3 過剰発現卵母細胞において非発現細胞と比して有意な 8-[fluor]-cAMP 取り込み上昇が示された。以上のことから、単離網膜毛細血管において有機アニオン排出輸送機構として MRP4 だけではなく OAT3 の機能が認められることが示唆された。

(4) 結論及び今後の展望

本研究を通じて確立した手法によって、薬物排出輸送機構の機能が維持された状態での毛細血管の単離が可能であることが示唆された。本 *ex vivo* 解析手法は inner BRB の薬物輸送担体の発現・機能を統合的に評価可能な新たな手法であり、薬物の網膜移行性評価や網膜疾患の発症・進行への inner BRB の関与を精査する上での今後の応用が期待される。また、本研究遂行を通じて、単離網膜毛細血管 *ex vivo* 解析系だけでなく、inner BRB スフェロイド構築などの、新たな *in vitro* 実験系の確立にも成功している（現在、論文投稿中）。これらの新規の非動物実験系を活用することで、末梢投与型網膜疾患治療薬開発に向けた化合物の inner BRB 透過性評価や効率的な網膜移行を目指した至適デザイン提案に繋がると考えられる。

<引用文献>

- (1) Tajima K., Akanuma S., Ohishi Y., Yoshida Y., Bauer B., Kubo Y., Inouye M., Hosoya K.; Freshly isolated retinal capillaries to determine efflux transporter function at the inner BRB. *J. Control. Release*, 343, 434-42 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akanuma S, Han M, Murayama Y, Kubo Y, Hosoya K	4. 巻 39
2. 論文標題 Differences in cerebral distribution between imipramine and paroxetine via membrane transporters at the rat blood-brain barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharm. Res.	6. 最初と最後の頁 223 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-022-03179-0	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 Tajima K, Akanuma S, Ohishi Y, Yoshida Y, Bauer B, Kubo Y, Inouye M, Hosoya K	4. 巻 343
2. 論文標題 Freshly isolated retinal capillaries to determine efflux transporter function at the inner BRB	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Control. Release	6. 最初と最後の頁 434 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.01.037	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 該当する
1. 著者名 Shinozaki Y, Akanuma S, Mori Y, Kubo Y, Hosoya K	4. 巻 13
2. 論文標題 Comprehensive evidence of carrier-mediated distribution of amantadine to the retina across the blood-retinal barrier in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13091339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jomura R, Akanuma S, Bauer B, Yoshida Y, Kubo Y, Hosoya K	4. 巻 38
2. 論文標題 Participation of monocarboxylate transporter 8, but not P-glycoprotein, in carrier-mediated cerebral elimination of phenytoin across the blood-brain barrier	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharm. Res.	6. 最初と最後の頁 113 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-021-03003-1	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 該当する

1. 著者名 Akanuma S	4. 巻 140
2. 論文標題 Membrane transporters and their regulatory mechanisms at the brain and retinal barriers to establish therapies for refractory central nervous system diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1235 ~ 1242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00127	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 Maruyama S, Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K	4. 巻 43
2. 論文標題 Characteristics of hemichannel-mediated substrate transport in human retinal pigment epithelial cells under deprivation of extracellular Ca ²⁺	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00290	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 Akanuma S, Hashimoto K, Yoshida Y, Kubo Y, Hosoya K	4. 巻 43
2. 論文標題 Inflammation-induced attenuation of prostaglandin D ₂ elimination across rat blood-brain barrier: involvement of the downregulation of organic anion transporter 3 and multidrug resistance-associated protein 4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 1669 ~ 1677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00388	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20件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小笠原 美希、赤沼 伸乙、今 秀輝、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 ラット血液脳関門多細胞性スフェロイドモデルの確立
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 広樹、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 ラット血液脳関門におけるABCトランスポーターのストレプトゾトシン誘発型糖尿病モデルにおける変化とその要因
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今 秀輝、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 細胞膜透過性ペプチドangiopep-2付加による内側血液網膜関門の物質透過性向上とその輸送機構解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤沼 伸乙、小笠原 美希、今 秀輝、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 条件的不活化ラット血液脳関門スフェロイドにおける密着結合及び薬物輸送担体の発現・機能
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今 秀輝、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 内側血液網膜関門における細胞膜透過性ペプチドangiopep-2輸送
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 広樹、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 糖尿病ラット脳毛細血管におけるABCトランスポーター輸送機能変動とその要因の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小笠原 美希、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 In vitro多細胞性ラット血液脳関門スフェロイドの構築とその特性
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 脳・網膜関門の薬物輸送分子機構理解に向けた2種のin vitroモデル開発：単離毛細血管と多細胞性スフェロイド
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤沼 伸乙、永野 正敏、牧野 令奈、竹内 駿徳、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 ラット網膜色素上皮細胞における薬物のin vitroリソソーム隔離の特性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 雄大、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 In vivo薬物輸送特性の評価を目的とした多細胞性ラット血液網膜関門スフェロイドの確立
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤沼 伸乙、山本 雄大、久保 義行、細谷 健一
2. 発表標題 In vitroラット内側血液網膜関門3次元スフェロイドモデルにおける密着結合・薬物輸送担体の機能
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田嶋 孝亮、赤沼 伸乙、吉田 有紀子、大石 雄基、久保 義行、井上 将彦、細谷 健一
2. 発表標題 トランスポーター介在薬物輸送機能を保持したラット単離網膜毛細血管単離法の確立
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田嶋 孝亮、赤沼 伸乙、大石 雄基、久保 義行、井上 将彦、細谷 健一
2. 発表標題 ABCトランスポーターの機能評価に向けた網膜毛細血管の単離法確立
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 赤沼 伸乙
2. 発表標題 難治性中枢神経疾患の治療方法確立に向けた脳・網膜関門における生体膜輸送体およびその制御機構の特定
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 雄大, 赤沼 伸乙, 久保 義行, 細谷 健一
2. 発表標題 In vivo薬物輸送特性の評価を目的としたラット血液網膜関門スフェロイドモデルの確立
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田嶋 孝亮, 赤沼 伸乙, 大石 雄基, 久保 義行, 井上 将彦, 細谷 健一
2. 発表標題 単離網膜毛細血管におけるABCトランスポーターの機能評価法
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤沼 伸乙
2. 発表標題 炎症性中枢神経系疾患克服に指向した脳・網膜関門における輸送分子機構の機能解明
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤沼 伸乙, 牧野 令奈, 永野 正敏, 久保 義行, 細谷 健一
2. 発表標題 ラット網膜色素上皮細胞におけるカチオン性薬物リソソーム隔離の特徴
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 田嶋 孝亮, 赤沼 伸乙, 大石 雄基, 久保 義行, 井上 将彦, 細谷 健一
2. 発表標題 単離網膜毛細血管におけるABCトランスポーターの機能評価法
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 山本 雄大, 細谷 健一, 久保 義行, 赤沼 伸乙
2. 発表標題 生体における薬物輸送特性評価のための内側血液網膜関門多細胞性スフェロイドモデルの確立
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Akanuma S, Kubo Y, Hosoya K	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 18
3. 書名 Blood-brain barrier (Springer Protocols)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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	大石 雄基 (Ohishi Yuki) (00778467)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教 (13201)	
研究分担者	細谷 健一 (Hosoya Ken-ichi) (70301033)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Kentucky		