

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16453

研究課題名(和文) ヒト血液脳関門に発現する新規有機カチオン輸送体の基質構造と分子実体解明

研究課題名(英文) Characterization of structural requirement for substrates recognition and identification of the molecular entity of proton/organic cation antiporter expressed at the human blood-brain barrier

研究代表者

手賀 悠真 (Tega, Yuma)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：50809043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒト血液脳関門において、塩基性薬物を脳内へ輸送するH⁺/有機カチオン交換輸送体の存在が示唆されており、その機能的特性から医薬品開発への応用が期待されている。しかし、H⁺/有機カチオン交換輸送体の分子実体は明らかになっておらず、基質構造に関する情報も少ない。本申請課題では、H⁺/有機カチオン交換輸送体の認識に重要な化学構造を明らかにするとともに、分子実体の解明を目的とした。その結果、分子実体の同定までは至らなかった一方で、H⁺/有機カチオン交換輸送体による輸送に重要なアミン構造を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会に伴い、アルツハイマー病をはじめとする中枢神経疾患の罹患患者数は増加しているが、それらに対する医薬品の開発成功率は非常に低いのが現状である。その原因の1つに、血液脳関門によって薬物の脳移行が妨げられることが挙げられる。本研究の成果は、トランスポーターを介した脳への薬物送達に新たな可能性を提示するものであり、中枢を標的としたドラッグデザインや精密な薬物動態予測につながることを期待される。また、新たな中枢薬の開発が促進されることで、中枢神経疾患患者のQOL向上につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been suggested the functional expression of H⁺/organic cation antiporter that transport basic drugs into the brain at the human blood-brain barrier, and it is expected to be applied to drug development. However, the molecular entity of H⁺/organic cation antiporter have not been clarified, and there is little information on the substrate recognition. The present study was performed to clarify the structural requirement, which are important for substrate recognition and transport, and to elucidate the molecular entity. Although the molecular entity is still unclear, the present results clarified the amine structures that are important for the transport by the H⁺/organic cation antiporter.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 塩基性薬物 トランスポーター Diphenhydramine誘導体 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進行する中で中枢神経系疾患の増加が世界的な問題となっている。しかし、中枢作用薬の開発成功率は、いまだ他の領域と比較しても極めて低い。その最大の理由は、非臨床試験から予測される薬効が臨床試験段階で再現できないことにある。薬物の脳移行性は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) の透過性によって支配されており、BBB での薬物輸送を媒介するトランスポータータンパク質は薬効あるいは毒性発現を考慮する上で重要な要素となる。したがって、ヒト BBB の薬物輸送機能の全容解明は、中枢作用薬開発の効率化とドラッグデザインにとって重要な意義がある。近年、ヒトの血液脳関門には塩基性薬物を促進的に脳内へ輸送する H⁺/有機カチオン交換輸送体の存在が明らかにされている (*J Pharm Sci* 2017, 106:2576-2582; *Drug Metab Pharmacokinet* 2015,30:182-7.)。現在、使用されている中枢疾患治療薬の多くが分子内にアミン構造を有する塩基性薬物であることから、薬物の中枢移行に対する H⁺/有機カチオン交換輸送体の影響は非常に大きいと予想され、医薬品開発への応用が期待されている。しかし、この輸送体の基質構造はおろか、分子実体もいまだ十分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

H⁺/有機カチオン交換輸送体の機能を詳細に解析することは、ヒト BBB のさらなる理解向上および中枢作用薬の効率的な開発に貢献するものと期待される。そこで本研究では、「H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質認識に重要な分子構造を明らかにするとともに、その分子実体を解明する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、第三級アミン及びアミド構造を有する diphenhydramine 誘導体を合成し、その輸送特性を人口脂質膜を介した透過解析 (PAMPA) あるいはヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) を用いて評価することで、H⁺/有機カチオン交換輸送体を介した輸送と化学構造との関連性について検討した。また、分子実体解明に迫る上で高親和性プローブを探索するため、基質と輸送速度の構造活性相関モデルの作成を試みた。

4. 研究成果

人口脂質膜を介した透過解析 (PAMPA) を実施した結果、diphenhydramine 誘導体の透過性は脂溶性の大きさに比例し、アミド構造を持つものが大きな透過性を示した (図 1A)。一方で、hCMEC/D3 細胞における初期取り込み速度は、第三級アミン構造を有する化合物で非常に大きく、第三級アミド構造を有する化合物は、第三級アミンよりも小さかった (図 1B)。また、hCMEC/D3 細胞におけるアミンの輸送は、H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質として知られる pyrilamine によって顕著に阻害された一方で、アミドの輸送では pyrilamine による阻害効果も限定的であった。アミン構造を有する diphenhydramine 誘導体の輸送特性について詳細に解析したところ、それらは細胞内 pH・温度・エネルギー依存的であること、プロトノフォア (FCCP) によって減少することが示された。さらに、Lineweaver-Burk plot を用いた解析により、誘導体の輸送が H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質によって競合的に阻害されること、これら化合物が H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質輸送を相互的に阻害することを確認した。

以上から、H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質認識には少なくとも塩基性を示すアミン構造が必須であることが示唆された。アミン化合物の中でも、環状アミン化合物の取り込み速度が大きかったことから、複素環構造が H⁺/有機カチオン交換輸送体による輸送に重要である可能性が示唆された。アミン構造を有する diphenhydramine 誘導体の輸送では、H⁺/有機カチオン交換輸送体基質による trans-stimulation 効果も示されたが、興味深いことに、一部の化合物では温度依存性や trans-stimulation 効果において、これまで報告された H⁺/有機カチオン交換輸送体基質とは異なる特性を示すことを見出した。これら化合物の輸送モデルについては、今後詳細な解析を実施する必要があるが、窒素原子の塩基性度の違いが影響している可能性がある。また、これまで使用してきた化合物 (36 種) の化学構造から 3 次元分子記述子を計算し、Random Forest を用いて化合物とトランスポーターの親和性予測を試みたところ、相関のあるモデルの作成が可能であることが示された。ただし、化合物数に制限があったため精密なモデル作成は困難であった。今後、化合物数をさらに増やし精密なモデルが作成できれば、H⁺/有機カチオン交換輸送系の高親和性プローブを探索できるとともに、それを用いて分子実体の解明にもつながることが期待される。

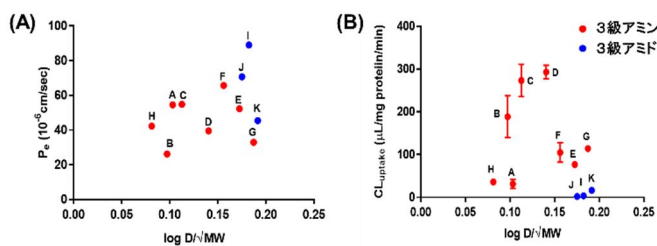


図 1. 人口脂質膜における透過性 (A) および hCMEC/D3 細胞における輸送速度 (B) と化合物の脂溶性との関係性

以上、本研究の最終目標である H⁺/有機カチオン交換輸送系の分子同定には至らなかったものの、H⁺/有機カチオン交換輸送体の基質認識性について、重要な知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tega Yuma, Tabata Hidetsugu, Kurosawa Toshiki, Kitamura Atsushi, Itagaki Fumio, Oshitari Tetsuta, Deguchi Yoshiharu	4. 巻 110
2. 論文標題 Structural Requirements for Uptake of Diphenhydramine Analogs into hCMEC/D3 Cells Via the Proton-Coupled Organic Cation Antiporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 397 ~ 403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.09.001	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuma Tega, Hidetsugu Tabata, Toshiki Kurosawa, Atsushi Kitamura, Fumio Itagaki, Tetsuta Oshitari, Yoshiharu Deguchi.
2. 発表標題 Characterization of structural features required for recognition by the H ⁺ /organic cation antiporter expressed at the human blood-brain barrier.
3. 学会等名 第34日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手賀悠真、田畑英嗣、黒澤俊樹、北村 敦、板垣文雄、忍足鉄太、出口芳春
2. 発表標題 血液脳関門におけるH ⁺ /有機カチオン交換輸送体を介した輸送への化学構造の影響
3. 学会等名 第41回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手賀悠真、田畑英嗣、黒澤俊樹、北村敦、板垣文雄、忍足鉄太、出口芳春
2. 発表標題 ヒト血液脳関門におけるH ⁺ /有機カチオン交換輸送体の基質探索研究
3. 学会等名 第63回 薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手賀悠真, 田畑英嗣, 黒澤俊樹, 北村 敦, 板垣文雄, 忍足鉄太, 出口芳春
2. 発表標題 H+/有機カチオン交換輸送体を介したジフェンヒドラミン誘導体の膜透過性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------