

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20890079
 研究課題名(和文) 炎症時使用薬物の血液脳関門 PGE₂ 排出阻害による中枢神経副作用
 発生機構解明
 研究課題名(英文) Mechanism of inhibition of prostaglandin E₂ efflux via blood-
 brain barrier by drugs for the avoidance of neural side-effect
 研究代表者 赤沼 伸乙 (Shin-ichi Akanuma)
 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)・助教
 研究者番号：30467089

研究成果の概要(和文)：In vivo マウス BBB を介した PGE₂ 排出を in vivo 実験法を用いて解析した結果、大脳皮質に投与した [³H]PGE₂ は半減期 16 分で消失し、非標識 PGE₂ にてその排出は阻害された。血液脳関門には PGE₂ を基質とする輸送担体として multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) が発現しており、in vitro MRP4 PGE₂ 輸送を阻害する薬物はマウスへの投与にて in vivo BBB を介した [³H]PGE₂ 輸送を阻害された。従って、MRP4 を強く阻害する薬物は脳から BBB を介した [³H]PGE₂ 排出を阻害し、脳内 PGE₂ 濃度を上昇させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： [³H]PGE₂ in the mouse brain was eliminated across the blood-brain barrier (BBB) and the elimination was inhibited by unlabeled PGE₂. We focused on multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) which is expressed at the luminal membrane of the BBB. The drugs which inhibited in vitro MRP4-mediated [³H]PGE₂ transport attenuated in vivo [³H]PGE₂ efflux transport via the BBB. In conclusion, it was suggested that in vivo PGE₂ elimination from brain via the BBB is suppressed by the administration of drugs inhibiting in vitro PGE₂ transport via MRP4.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：血液脳関門、prostaglandin E₂、抗炎症薬、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症時に用いられる薬とその問題点

炎症治療を目的として非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)、そして炎症を伴う細菌感染症時には抗生物質が現在広く用いられている。NSAIDs はアラキドン酸から prostaglandin (PG) E₂ の産生における律速段階の酵素、シクロオキシゲナーゼ(COX)の阻

害剤であり、末梢組織における過剰な PG 合成を抑制することで、抗炎症効果を示すものと考えられている。その一方で、ジクロフェナックなどの一部の NSAIDs は眠気を強く引き起こすこと、さらにはインフルエンザウイルス感染時の投与にて脳炎を発症することが報告されており、臨床における適用について様々な問題が発生している。抗生物質に

については比較的安全性は唱われているものの、投与量によっては中枢神経症状(けいれん、過剰発熱)などを引き起こすことが問題となっている。これら中枢神経症状は脳における PGE₂ を介在したシグナル系が非常に重要な役割を果たしており、先に述べた問題を解決するにあたり、脳内の PGE₂ 量をコントロールすることは脳における過剰な炎症反応の阻止という点で非常に重要である。

(2) 脳における PGE₂ の不活化経路 (酵素と脳関門を介した排出について)

脳実質において cyclooxygenase (COX) や prostaglandin E synthase (PGES) の発現が報告されている。従って、脳にて PGE₂ は合成されていると考えられる。しかしながら、PGE₂ を含めた PG の不活性化に関与する 15-prostaglandin dehydrogenase の発現は脳実質においては非常に低いことが報告されている。従って脳実質において合成された PGE₂ がどのように消失するかは不明である。

脳実質には循環血液と脳実質を隔てる血液脳関門 (BBB; 実体は脳毛細血管内皮細胞) が存在しており、脳内 PGE₂ は本関門を介して循環血液中に排出されることで、脳における作用が消失されると考えられる。しかしながら、BBB を介して PGE₂ が消失するエビデンスは報告されていなかった。また、PGE₂ は中性条件では主にイオン型で存在する化合物 (pKa ~4.75) であり、単純拡散にて BBB を透過するとは考えにくい。

BBB には各種有機アニオン化合物を輸送するトランスポーターが発現している。

- ① Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)
- ② Organic anion transporter 3 (OAT3)
- ③ Organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4)
- ④ Prostaglandin transporter (PGT)

これらの中で MRP4、OAT3 及び PGT は PGE₂ を基質とするという報告がなされている。従って、BBB に発現するこれらのトランスポーターを介して脳内 PGE₂ は循環血液中に排出されている可能性が考えられる。しかし、これらのトランスポーターが BBB において PGE₂ 輸送に寄与するかは未だ不明である。

(3) 薬物が血液脳関門 PGE₂ 排出阻害を引き起こした場合の脳への影響

細菌やウイルス感染症時にはアスピリンを初めとした NSAIDs、セフェム系を初めとした抗生物質が用いられる。これらが血液脳関門を介した PGE₂ 排出を阻害した場合、脳における PGE₂ の過剰な蓄積を引き起こすことが予想される。この点から、BBB を介した PGE₂ 排出輸送を阻害しない、抗炎症薬及び抗生物質を用いることが感染症時の適切な薬

物療法と考えられる。従って、BBB を介し PGE₂ が輸送された場合、その排出にどのような薬物が影響を与えるかを解析することは、脳で PGE₂ を蓄積させない、即ち過剰な炎症を引き起こさせない薬を開発する上で非常に重要な情報になりうる。

2. 研究の目的

研究背景から、「COX を阻害し、かつ血液脳関門を介した PGE₂ 排出を阻害しない NSAIDs、さらに脳における過剰 PGE₂ 蓄積を引き起こさない抗生物質」が今後新たな炎症時に用いられる薬のスタンダードになると申請者は提案する。そのためには未だ明らかにされていない、血液脳関門 PGE₂ 排出機構解明は必要不可欠な課題である。

本研究では、マウス血液脳関門を介し、脳内 PGE₂ が排出されるかを明らかにすることを目的とする。特に申請者は NSAIDs 及び抗炎症薬を広範囲に認識することが報告されている MRP4 に着目し、MRP4 を高親和的に阻害する薬物を *in vitro* MRP4 発現 Sf9 細胞膜ベシクル取り込み実験によって明らかにすると共に、本 *in vitro* 解析の結果、阻害が認められた化合物の影響を BBB を介した物質の排出過程を *in vivo* にて直接的に評価が可能な mouse brain efflux index (BEI) 法にて解析した。

3. 研究の方法

(1) Mouse BEI 法

マウス脳から BBB を介した PGE₂ 排出を評価するため、³H]PGE₂ と BBB 非透過性マーカーである [¹⁴C]Inulin carboxyl の混合溶液 (³H]PGE₂ 94 nCi/[¹⁴C]Inulin carboxyl (inulin) 4.8 nCi in 0.3 μL) を調製し、マウス大脳皮質 secondary somatosensory (S2) 領域に [³H]/[¹⁴C] 混合溶液を 0.3 μL 投与した。指定時間後に断頭することで反応を終了し、投与側大脳皮質を 2 M NaOH にて 55°C、3 時間インキュベートすることで可溶化した。可溶化した脳は液体シンチレーションカクテルを加え、良く攪拌後、サンプル中の ³H 及び ¹⁴C の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

脳から BBB を介して排出された [³H]PGE₂ の割合を BEI (%) と定義すると、³H]PGE₂ の脳内残存率は 100-BEI (%) と決定される。100-BEI(%) は以下の式を用いて算出した。

100-BEI (%)

$$= \frac{([3\text{H}]\text{PGE}_2 / [14\text{C}]\text{Inulin})_{\text{brain}}}{([3\text{H}]\text{PGE}_2 / [14\text{C}]\text{Inulin})_{\text{injectate}}}$$

この 100-BEI (%) の時間推移パターンは 1-コンパートメントモデルと推定され、BBB を介した [³H]PGE₂ の消失速度定数 (k_{el}) を以下の

式から算出した。

$$100\text{-BEI}(t) (\%) = A \exp(-k_{el} \times t)$$

(A は $t=0$ での $100\text{-BEI} (\%)$ を示す)

なお、薬物投与による脳から BBB を介した $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 排出阻害効果は $[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}]$ 混合溶液投与 40 分後における BEI (%) 値を用いて評価した。

(2) MRP4 発現膜ベシクルを用いた $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 取り込みに対する各種薬物の阻害効果解析。

MRP4 発現 Sf9 細胞膜ベシクルは株式会社ジェノメンブレンから購入した。細胞膜ベシクル 5 μg に対し、最終 $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 濃度が 20 nM となるように反応バッファーを加えることで反応を開始した。4°C の反応停止バッファーを加えた後に、減圧条件下にてニトロセルロース膜にベシクルをトラップさせた。さらに 3 mL の 4°C 反応停止バッファーを用いて 3 回洗浄し、洗浄終了後のニトロセルロース膜をバイアル瓶に移し、液体シンチレーションカクテルを加えた。攪拌後、ニトロセルロース膜中の ^3H 放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

4. 研究成果

(1) マウス血液脳関門を介した $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 排出解析

Mouse BEI 法にて脳から BBB を介し、 $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ は消失半減期 16 分にて消失することが明らかとなった (Fig. 1-A)。さらに、投与 40 分後における脳内残存率は非標識 PGE_2 投与によって有意に上昇した (Fig. 1-B)。以上の結果から、脳内 PGE_2 は BBB を介して排出され、その輸送は担体介在型であることが示唆された。

(2) MRP4 発現膜小胞への $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 取り込みに対する各種薬物の阻害効果。

マウス血液脳関門の血液側膜に発現する MRP4 が PGE_2 輸送に影響を与えると予想した。In vitro MRP4 を介した $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 輸送はセフェム系抗生物質である cefmetazole によって阻害され、その IC_{50} 値は 10 μM であった (Fig. 2)。本 IC_{50} 値は MRP4 を介した cefmetazole 輸送の K_m 値である 28.5 μM と近似したことから、 PGE_2 輸送を cefmetazole は競合的に阻害することが示唆された。また、20 μM 条件下にてセフェム系抗生物質である、ceftriaxone、cefotaxime、cefdinir、cefotiam 及び cefazolin によって $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 輸送が有意に阻害された。同条件下にて NSAIDs である、indomethacin、ketoprofen、ibuprofen、celecoxib 及び acetaminophen 共存下にて有意な $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 取り込み阻害が認められた。その一方で、同条件下にて clarithromycin 等、他種の

抗生物質は有意に $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 取り込みの阻害は認められなかった。

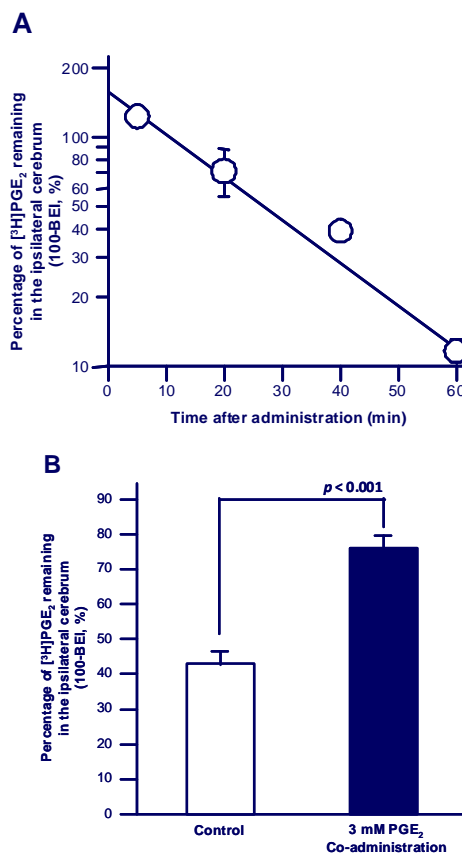


Fig. 1 マウス脳から BBB を介した $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 排出解析。(A) 脳内残存率の時間推移 (B) 自己阻害効果

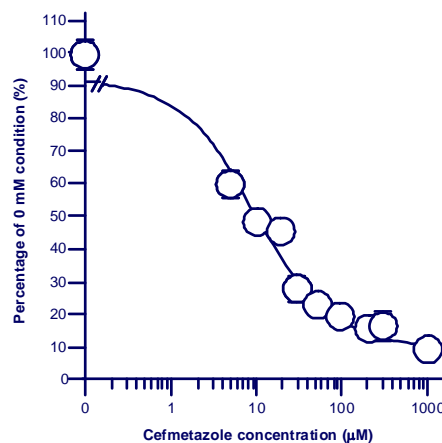


Fig. 2 MRP4 発現膜ベシクルへの $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 取り込みに対する cefmetazole の濃度依存的な阻害効果

(3) MRP4 を阻害する薬物の脳実質内前投与による $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 排出阻害効果

各種 MRP4 を阻害する薬物を用い、in vivo マウス BBB を介した $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 排出への阻害効果を mouse BEI 法にて解析した。5 mM の薬物を $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ 投与前に 10 μL 投与した条件において、cefmetazole、cefazolin、cefotaxime、ceftriaxone、indomethacin 及び ketoprofen は

BBB を介した ^3H PGE₂ 排出を有意に阻害した。以上のことから、MRP4 に対し親和性が高い薬物が脳内に高濃度にて存在することで BBB を介した ^3H PGE₂ 排出を阻害することが示唆された。

(4) MRP4 を高親和的に阻害する薬物の静脈内単回投与が BBB を介した ^3H PGE₂ 排出に与える効果

抗生物質及び NSAIDs は共に静脈内から投与される薬物であり、これらの薬物が静脈内投与されることで BBB を介した ^3H PGE₂ 排出を阻害するか明らかにすることは重要である。 ^3H PGE₂ 投与 15 分前に cefmetazole を静脈内投与した結果、脳から BBB を介した ^3H PGE₂ 排出は投与量依存的に阻害され、その IC₅₀ 値は 120 mg/kg であった (Fig. 3)。

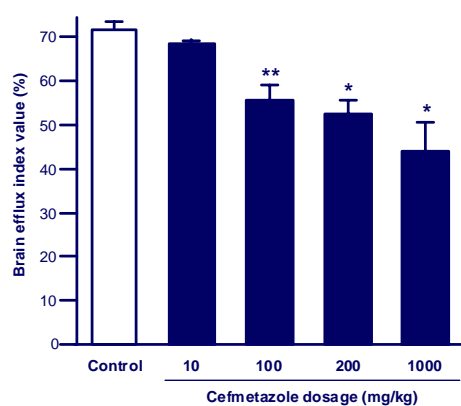


Fig. 3 マウス脳から BBB を介した ^3H PGE₂ 排出に与える cefmetazole の静脈内投与量依存的な排出阻害効果。 ** $p < 0.05$ and * $p < 0.01$, significantly different from control.

また、他の薬物について 200 mg/kg 条件にて同様に静脈内投与後に BBB を介した ^3H PGE₂ 排出を評価した結果、cefazolin において有意な阻害効果が認められたものの、ceftriaxone を初めとした薬物について阻害効果は認められなかった (Fig. 4)。

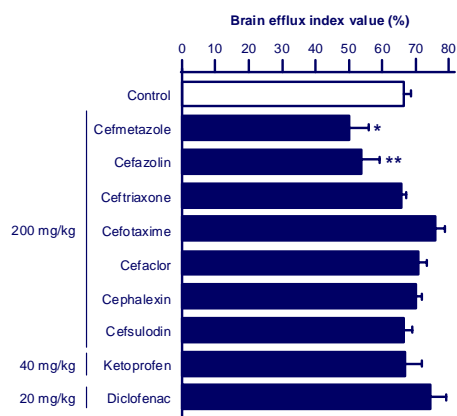


Fig. 4 マウス脳から BBB を介した ^3H PGE₂ 排出に与える薬物の静脈内投与による排出阻害効果。 ** $p < 0.05$ and * $p < 0.01$, significantly different from control.

Cefmetazole と cefazolin に共通するトランスポータープロファイルとして、「MRP4 を強く阻害し、かつ Oatp1a4 の基質となる」ことである。MRP4 が発現する BBB の血液側膜には Oatp1a4 が発現しており、薬物の脳への移行に関与することが報告されている。従って、cefmetazole と cefazolin は Oatp1a4 を介して循環血液中から脳毛細血管内皮細胞に取り込まれ、MRP4 を介した PGE₂ 輸送を細胞内から阻害するという、薬物による PGE₂ 輸送阻害モデルが考えられた。

結論として、申請者は BBB を介し PGE₂ が排出されることを初めて明らかにした。この PGE₂ の排出経路は脳における PGE₂ 不活性化機構として機能する可能性が考えられる。また、MRP4 を強く阻害する薬物は in vivo BBB を介した脳から BBB を介した PGE₂ 排出を阻害することが明らかとなった。特に Oatp1a4 の基質であり、MRP4 を強く阻害する cefmetazole 及び cefazolin は静脈内単回投与にて PGE₂ 排出を阻害した。本知見から、「MRP4 を介した PGE₂ 輸送を強く阻害しない薬物を用いる」ことで、BBB を介した PGE₂ 排出を阻害しない、即ちそれは脳に PGE₂ が蓄積することで発生する異常発熱等の副作用を軽減に繋がる可能性が見出された。

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 1 件)

① Akanuma S. (他 5 名、1 番目)、Involvement of multidrug resistance-associated protein 4 in efflux transport of prostaglandin E₂ across mouse blood-brain barrier and its inhibition by intravenous administration of cephalosporins., 査読有、*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 333 巻、2010、912-919

[学会発表] (計 2 件)

① 赤沼 伸乙、Inhibition of prostaglandin E₂ elimination via blood-brain barrier by cephalosporins interacting with multidrug resistance-associated protein 4、日本薬物動態学会 第 24 回年会、平成 21 年 11 月 27 日、京都市

② 赤沼 伸乙、MRP4 機能阻害薬物投与によるマウス脳から血液脳関門を介した PGE₂ 排出輸送の阻害、日本薬学会 第 130 年会、平成 22 年 3 月 28 日、岡山市

[図書] (計 0 件)

ありません。

[産業財産権]

○出願状況（計0件）
ありません。

○取得状況（計0件）
ありません。

[その他]

ホームページ等
ありません。

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤沼 伸乙 (Shin-ichi Akanuma)
富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)・
助教

研究者番号：30467089

(2)研究分担者

ありません。

(3)連携研究者

ありません。