

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16039

研究課題名（和文）sgRNAライブラリーを用いた血液脳関門輸送体の同定

研究課題名（英文）Identification of blood-brain barrier transporters using sgRNA library

研究代表者

荒川 大 (Arakawa, Hiroshi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：40709028

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）：本研究では、血液脳関門における薬物トランスポーターを同定することを目的とした。Kp,uu,brain値が1を超える薬物を文献調査から抽出し、これら薬物のhCMEC/D3細胞における温度依存的な取り込み試験を行い、トランスポーター介在輸送が期待される薬物を絞り込んだ。さらに、輸送体標的型siRNAライブラリーを用いたスクリーニング試験を行い、OCTN2がアリピプラゾールの脳移行に関与する取り込み輸送体であることが示された。推定された輸送体のみを検討を絞った従来の限定的な手法と比べ、本手法は未知の薬物輸送体を同定する手法として有用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

一部のカチオン性薬物の脳移行には、血液脳関門（BBB）に発現する取り込み型輸送体の関与が示唆されている。このようなBBB取り込み輸送体の同定により中枢疾患治療薬の研究開発を効率的に進めることができると期待される。未知のBBB輸送体を同定するには対象輸送体分子を限定しないより包括的なスクリーニングが有用である。推定された輸送体のみを検討を絞った従来の限定的な手法と比べ、本手法は未知の薬物輸送体を同定する手法として有用であることが示唆された。今後、BBBの薬物輸送体を同定することで、輸送体を利用した中枢疾患治療薬の開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed at identifying drug uptake transporter in blood-brain barrier (BBB) model hCMEC/D3 cells using a knockdown/knockout screening study targeting membrane transporters, including uncharacterized ones. The reported and estimated unbound brain to plasma concentration ratio values of 65 kinds of drugs were investigated, and 10 drugs, which exhibited higher Kp,uu,brain, were selected for following screenings. According to studies of siRNA knockdown screening in hCMEC/D3 cells, OCTN2 was identified as candidate transporter gene for aripiprazole. On the other hand, by the knockout screening with the consideration of the expression of extracted genes in human BBB, 10 genes were found as BBB uptake transporter candidates. In conclusion, knockdown and knockout screening are useful approaches for identifying BBB transporters.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 薬物トランスポーター 脳移行性 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

中枢作用薬の開発は、他疾患領域の薬物開発に比べると成功確率が著しく低い。その原因は、血液と脳脊髄液を隔てる血液脳関門 (BBB) の存在であり、活性物質が血液中から脳内への移行が少なく、薬効を得るため投与量を増やすと、末梢組織での副作用が引き起こされてしまうことにある。BBB の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、細胞間密着結合による非特異的な脳移行の抑制、高脂溶性で膜透過性が高い場合であっても MDR1 や BCRP などの排出型トランスポーターが汲み出しポンプとして働くことによる薬物移行の抑制が関門の分子の実体である。一方、脳内に必要な glucose などの栄養物は選択的な取り込みトランスポーターの働きによって脳内に容易に移行する。一方、pyrilamine など H1 受容体拮抗薬の中には中枢移行性が極めて高い誘導体があり、その BBB の透過にプロトン交換型トランスポーターの関与が示唆されているものの、現在取り込み型トランスポーター分子の実体は明らかにされていない (図 1)。また、中枢作用薬の臨床開発では、脳内薬物濃度が測定できないことが大きな問題となっている。そのため脳内薬物濃度の支配因子である BBB の薬物トランスポーターを明らかとすることにより、効率的な研究開発が期待される。

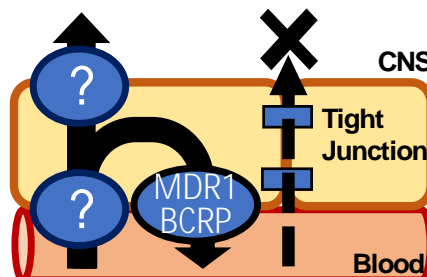


図1 BBBに発現する薬物輸送体を利用した薬物デリバリー

本研究課題設定にあたり申請者は、薬物の脳内への蓄積にトランスポーターの関与を調べるため、種々の薬物の分子量と脳移行性を評価する指標として非結合型薬物の血漿中と脳内濃度の比 ($K_{p,uu}$) を調査した (表 1 に抜粋)。 $K_{p,uu}$ 値の概念として、取り込み型トランスポーターを介した能動輸送で BBB を透過する薬物は、本値が 1 を超える。なお、膜透過性は高いが MDR1 による汲み出しが見かけの脳移行性を抑制する場合もあるため、MDR1 の有無での比較も行った。報告のある 83 種の薬物の $K_{p,uu}$ 値を調査した結果、digoxin、verapamil や loperamide といった 11 種類の薬物は、MDR1 タンパク質を欠損させた mdr1a/1b ノックアウト動物では $K_{p,uu}$ 値が 2 を超えるが、野生型動物では $K_{p,uu}$ 値が 1 以下となった。この調査結果は、通常は MDR1 など排出型トランスポーターによってマスクされてしまうが、薬物を脳内へ取り込むトランスポーターが存在していることを示唆している。特に、中枢疾患治療薬として用いられる aripiprazole は、野生型の $K_{p,uu}$ 値が 1 程度であるのに対し、mdr1a/1b/bcrp ノックアウト動物では本値が 4 程度と算出された。これは、薬物が排出型トランスポーターの基質となる場合であっても、取り込み型トランスポーターの基質となることにより、中枢作用薬として十分量の薬物が脳へ移行できることを示す。さらに申請者は、不死化脳毛細血管内皮 hCMEC/D3 細胞を用いた取り込み試験より、実験動物で脳内への取り込みトランスポーターの介在が示唆された化合物のうち、13 種に取り込みトランスポーターが介在する予備的結果を得た。以上の背景から、本研究では「BBB において薬物取り込みに働くトランスポーターの実体は何か」という学術的問いのもと、独自に構築したトランスポーター標的型 sgRNA ライブラリーを用いて薬物の BBB 透過に働くトランスポーター分子の同定を行う。

表 1 実験動物 (マウスなど) における薬物の脳移行性

薬物	分子量	logP	野生型 $K_{p,uu}$	mdr1a/1b KO $K_{p,uu}$
aripiprazole	448	4.5	1.33	3.87*
gefitinib	447	4.02	0.1	7.10
digoxin	781	1.04	0.515	10.4
vinblastine	811	4.22	1.32	10.5
loperamide	477	4.44	0.206	6.47

KO: ノックアウト
*mdr1a/1b/bcrp KOラットの $K_{p,uu}$ 値及びマウスの組織結合率から算出

2. 研究の目的

BBB トランスポーターを利用した中枢疾患治療薬の新規研究開発戦略を提唱することを最終目的とし、1) 独自に構築したトランスポーター標的型 sgRNA および siRNA のライブラリーを用いることで、血液脳関門における薬物トランスポーターを同定し、2) その *in vivo* における薬物の脳内移行への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) aripiprazole の BBB 取り込みにおける OCTN2 の役割

BBB 透過にトランスポーターが介在する薬物を絞り込むため、 $K_{p,uu,brain}$ 値を文献調査した。214 種のトランスポーターを標的とした siRNA を BBB モデル hCMEC/D3 細胞に処置し、検討対象薬物の取り込み変化を調べた。また、候補トランスポーターの薬物輸送活性を評価するため、トランスポーター候補タンパク質を過剰発現させた *Xenopus oocyte* への薬物取り込み試験を行った。

(2) 中分子化合物の BBB 取り込みトランスポーターの探索

hCMEC/D3 細胞を用い、21 種の化合物の 37 度および 4 度における薬物取り込みを行った。また、別のプレートに播種した hCMEC/D3 細胞を用い、薬物の曝露 72 時間後に WST-8 アッセイにより細胞毒性を評価した。sgRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行うため、レンチウイルスに組み込まれた sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させた。その後、8 種の薬物 (crizotinib, cyclosporine A, digoxin, imatinib, loperamide, mitoxantrone, paclitaxel 及び vincristine) をそれぞれ曝露し、一定時間後にゲノム DNA を回収した。次世代シーケンサーでゲノム DNA に含まれる sgRNA の配列を読み込み、BBB 取り込みトランスポーター候補遺伝子を抽出した。また、候補トランスポーターの薬物輸送活性を評価するため、トランスポーター候補タンパク質を過剰発現させた *Xenopus* oocyte への薬物取り込み試験を行った。

4. 研究成果

(1) aripiprazole の BBB 取り込みにおける OCTN2 の役割

薬物の脳移行性の指標である $K_{p,uu,brain}$ 値および薬物の分子量を調査し、 $K_{p,uu,brain}$ 値が 1 を超える薬物が 20 種見出された。 $K_{p,uu,brain}$ 値が 1 を超える薬物は BBB を能動輸送で透過し、取り込みトランスポーターの介在が期待される。これら薬物の hCMEC/D3 細胞における温度依存的な取り込み試験を行い、37 度と比較し 4 度において取り込みの低下がみられた薬物 10 種を絞り込んだ。見出されたこれらの薬物を用いてトランスポーター標的 siRNA ライブラリーを用いた取り込みスクリーニング試験を行った。その結果、aripiprazole 取り込みに対し、複数の siRNA が 25% 以上の取り込み低下を示した (図 2)。抽出された遺伝子のうち、hCMEC/D3 細胞における発現量および siRNA によるノックダウン効果を考慮し、2 種の遺伝子に絞り込んだ。候補遺伝子を過剰発現させた *Xenopus* oocyte を用いて薬物の輸送活性を評価した結果、OCTN2 (*SLC22A5*) が aripiprazole の輸送活性を示した。さらに aripiprazole の hCMEC/D3 細胞への取り込みは OCTN2 阻害剤であるカチオン性薬物の emetine および quinidine により阻害され、OCTN2 が aripiprazole の脳移行に関わる取り込みトランスポーターであることが示唆された¹⁾。

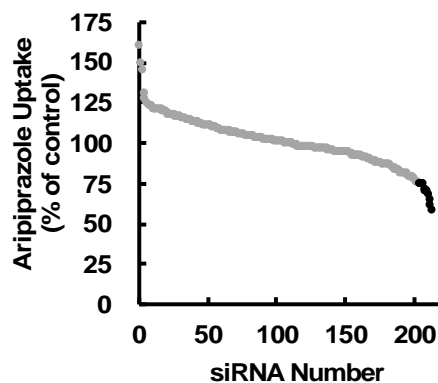


図2 siRNAライブラリーを用いた hCMEC/D3細胞へのaripiprazole取り込みトランスポーターのスクリーニング

(2) 中分子化合物の BBB 取り込みトランスポーターの探索

分子量が 400 以上と比較的大きい化合物の BBB 取り込みにトランスポーターが関与する可能性を調べるため、hCMEC/D3 細胞 への 21 種の化合物の取り込みを調べた。その結果 16 種の化合物取り込みに温度依存性が観察された。また、そのうち 8 種の薬物 (crizotinib, cyclosporine A, digoxin, imatinib, loperamide, mitoxantrone, paclitaxel 及び vincristine) は hCMEC/D3 細胞に対して細胞毒性を示し、sgRNA スクリーニングに適用できることが示された。そこで、sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させ、これら薬物を用いたスクリーニング試験を行った。その結果、digoxin の排出に働く MDR1 が抽出され、本法の妥当性が示された。また、薬物の取り込み活性が期待できる solute carrier family および major facilitative superfamily として、14 種の遺伝子が抽出された。現在見出された遺伝子のうち 2 種の発現系において輸送活性が確認され、マウスを用いた *in vivo* 薬物動態実験により、見出されたトランスポーターの脳移行性における寄与を調べている。

引用文献

1) Kadoguchi M, Arakawa H, Honda R, Hotta K, Shirasaka Y, Tamai I. Characterization of aripiprazole uptake transporter in the blood-brain barrier model hCMEC/D3 cells by targeted siRNA screening. *Pharm Res*, *in press*.

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 Kadoguchi M, Arakawa H, Honda R, Hotta K, Shirasaka Y, Tamai I	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of aripiprazole uptake transporter in the blood-brain barrier model hCMEC/D3 cells by targeted siRNA screening.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-022-03223-z	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角口萌乃、荒川大、玉井郁巳
2. 発表標題 siRNAスクリーニング法を用いたpyrilamineの血液脳関門薬物輸送体の探索
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

〔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
研究協力者	玉井 郁巳 (Tamai Ikumi) (20155237)	金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授 (13301)	

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