

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590149

研究課題名(和文) 老化を基礎とする疾患の発症・進展の予防を目的とした薬物の脳内移行特性の解明と応用

研究課題名(英文) Characterization of drug penetration to the brain for preventing development of symptoms and progress of the aging disease

研究代表者

鈴木 豊史 (SUZUKI TOYOFUMI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20267115

研究成果の概要(和文)：本研究は、老化を基礎とする疾患の発症や進展の予防を目的として、いくつかの薬物の脳内移行性を特徴付けた。(1) ウシ脳毛細血管内皮細胞へのクルクミンの浸透は、HPLC-UV 法において検出限界のため測定できなかった。(2) ウシ脳毛細血管内皮細胞へ^[3H]フルバスタチンの輸送には、担体介在機構が関与していることがわかった。(3) ラット脳毛細血管内皮細胞へ^[3H]アマンタジンの輸送には、何らかの有機カチオンに感受性のある輸送システムが関与していることがわかった。アマンタジンをラット大脳内微量注入 60 分後に約 50%が比較的緩やかに消失していることがわかった。(4) パーキンソン病態においてはレボドパのトランスポーター介在輸送効率がわずかながら減少することが示唆された。ヒト脳毛細血管内皮細胞ならびにマウス脳灌流技術を用いた実験から、(5) マジンドールの脳内取り込みに単純拡散機構と P-糖タンパク質の関与すること、(6) アマンタジンの血液脳関門輸送に P-糖タンパク質の影響がないことをそれぞれ明らかにした。(7) 74 歳以下と 75 歳以上の群、男性と女性の群、および薬物の総服用量が 8 g 以上 (8-96 g) の群で、スルファメトキサゾールトリメトプリム配合剤 (SMX-TMP 合剤) 投与後に血清クレアチニン (SCr) の有意な上昇が認められた ($P < 0.05$)。8 g 以上 (平均 29.8 g) の総服用量の群で 18.4%の SCr の有意な上昇が認められた ($P = 0.002$) が、7 g 以下 (平均 5.3 g) の群ではわずか 4.5%の上昇であった。これらの結果より、投与期間の総服用量が約 30 g (トリメトプリムとして約 2.4 g) のとき、SCr は 20%程度まで上昇する傾向が明らかになり、本剤投与後の SCr の上昇には、年齢や性別の因子よりも総服用量が主に影響を及ぼすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study characterized penetration of several drugs to the brain for preventing development of symptoms and progress of the aging disease. (1) Curcumin permeation into bovine brain microvascular endothelial cells could not determine with limitation of detection in HPLC-UV method. (2) Transport of ^[3H]fluvastatin into bovine brain microvascular endothelial cells was involved in the carrier-mediated mechanism. (3) Transport of ^[3H]amantadine into rat brain microvascular endothelial cells was involved in the organic cation-sensitive transport system. About 50% of amantadine decreased comparatively slowly in 60 minutes after the microinject in a rat cerebrum. (4) It was suggested that the transporter intervention transport efficiency of levodopa decreases slightly in Parkinson's disease. (5) Participation of a simple diffusion mechanism and P-glycoprotein in the transport of mazindol at the blood-brain barrier, and (6) no influences of P-glycoprotein at the blood-brain barrier transport of amantadine, were demonstrated from experiments using human brain microvascular endothelium cells or the brain perfusion technique. (7) Serum creatinine (SCr) increased significantly following sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP) combination product use in patients ≤ 74 years of age and ≥ 75 years of age, in both males and females, and in patients with a total dose of ≥ 8 g (8 to 96 g) ($P < 0.05$). The group with a total dose of ≥ 8 g (mean 29.8 g) had a significant SCr increase of 18.4% ($P = 0.002$), while the increase in the ≤ 7 g (mean 5.3 g) group was only 4.5%. The data showed that SCr increased by

about 20% when the total dose taken over the treatment period was around 30 g (about 2.4 g as TMP) and indicated that total dose contributes more than age and sex to the post-treatment increase in SCr.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アルツハイマー病，パーキンソン病，脳内移行性，アンチエイジング

1. 研究開始当初の背景

加齢による変化はヒトの身体全体に生じ、脳細胞の減少、水晶体の弾力性損失、皮膚の弾力低下、動脈硬化の進行、心臓病の進行ならびに発症、骨折などの多岐にわたる。老化を基礎とする疾患の発症・進展を遅延させる候補化合物の動態特性を明らかにし、創薬につなげることは急務な課題である。

本研究は、老化を基礎とする疾患に対して有効性が期待できる化合物や薬物の脳内移行性を解明することで、治療効果への可能性を実証する。

2. 研究の目的

本研究は、老化を基礎とする疾患の発症・進展の予防を目的にその候補物質の脳内移行性、ならびに老化を基礎とする疾患時における薬物の脳内移行の変化について、解明を試み、中枢神経疾患の発症・伸展を抑制する応用性を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) クルクミンの脳内移行性について、ウシ脳毛細血管内皮細胞 (BBMC) を用いて検討した。常法に従い、RPMI1640 液体培地で細胞を3日間培養した後、クルクミン含有細胞外溶液ならびに培養液を使用して1分間~24時間の BBMC へのクルクミンの取り込み実験を行った。反応を停止後、細胞内クルクミン濃度は HPLC-UV 法で定量した。

(2) フルバスタチンの脳内取り込み輸送について、BBMC を用いて検討した。常法に従い、常法に従い、RPMI1640 液体培地で細胞を3日間培養した後、³Hフルバスタチン含有細胞

外溶液を用いて、細胞内取り込み実験を行った。反応を停止後、細胞内³Hフルバスタチンの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。

(3) アマンタジンの脳内取り込み輸送について、BBMC を用いて検討した。常法に従い、常法に従い、RPMI1640 液体培地で細胞を3日間培養した後、³Hアマンタジン含有細胞外溶液を用いて、細胞内取り込み実験を行った。反応を停止後、細胞内³Hアマンタジンの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。アマンタジンの脳からの排出輸送について、ラットを用いた Brain Efflux index 法で実験を行った。

(4) C57BL マウスに 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) を腹腔内投与し、7日後に線条体中 DA ならびに DA 関連代謝物の濃度を HPLC-ECD 法により定量した。また、動作緩慢および無動・固縮行動などの薬理的評価により病態モデルの確認を行った。レボドパの脳内取り込み輸送は、in situ マウス脳灌流法を用いて評価した。

(5) マジンドールの脳内移行性について、ヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMEC) ならびにラット脳毛細血管内皮細胞を用いて検討した。常法に従い、RPMI1640 液体培地で細胞を3日間培養した後、³Hマジンドール含有細胞外溶液を用いて、細胞内取り込み実験を行った。反応を停止後、細胞内³Hマジンドールの放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。

(6) アマンタジンの脳内取り込み輸送について、ラット毛細血管内皮細胞を用いて P-糖タンパク質の影響について検討した。常法に従い、RPMI1640 液体培地で細胞を 3 日間培養した後、 ^3H アマンタジン含有細胞外溶液を用いて、P-糖タンパク質阻害剤の存在下での細胞内保持量を ^3H アマンタジンの放射活性から液体シンチレーションカウンターで測定した。

(7) 臨床で副作用が発現しやすいスルファメトキサゾールトリメトプリム配合剤 (ST 合剤) について、正常な腎機能を有する日本人患者 (49 例) において薬物投与後の臨床検査値をモニタリングし、レトロスペクティブな解析を実施した。

4. 研究成果

(1) アミロイド β が脳内で凝集するとともにアルツハイマー病が進行していくことは知られている。クルクミンは、アルツハイマー病のマウス脳においてこのアミロイド β の蓄積を抑制し、アミロイド斑を減少させることが示されている。そのため、老化を基礎とする疾患の進展を遅延させる可能性を有する物質としてクルクミンが注目されている。そこで、クルクミンの 50-250 μM の濃度を含む細胞外溶液や培養液を用いて、1 分~24 時間の間に BBMC へのクルクミンの取り込み量を測定した。その結果、細胞を溶解後に測定した細胞内クルクミン量はいずれの取り込み時間においても、HPLC-UV 法で検出されず、曝露したいずれの濃度において検出限界以下であった。このことから、循環血液に吸収されたクルクミンが脳内に移行する量は極めて微量である可能性が示唆された。放射性標識体を用いた検討が必要となったが、放射性標識されたクルクミンはすでに発売中止となっていたため、実験の継続を断念することになった。

(2) スタチン系薬物は近年の大規模臨床試験の結果から、心筋梗塞や脳血管障害の発症のリスクを低下させる効果が明らかにされ、注目を集めている。さらに、アルツハイマー病に対して、発症遅延の効果があることが示唆されている。フルバスタチンは脂溶性が高く、分子量も比較的大きくないことから、アニオン性のフルバスタチンが脳内へどのような輸送機構により移行するのか検討することで、抗炎症作用も有するフルバスタチンの老化防止も期待できると考えた。 ^3H フルバスタチンの BBMC への取り込みは、取り込み時間の経過にともない増加したが、低温で輸送が低下した。また、非標識体の濃度増加に伴い、取り込み速度が飽和することがわかった。 ^3H フルバスタチンの細胞内取り込み

輸送は、50 μM のシンバスタチンやプラバスタチンの存在により 60%阻害され、OATP の基質による阻害効果が認められた。フルバスタチンは適度な脂溶性を有し、血液中にはラクトン形とアシッド形が存在する。したがって、シンバスタチンと同様にモノカルボン酸トランスポーターによる担体介在機構によって、血液脳関門輸送されることが示唆されるが、現在引き続き検討中である。スタチン系のなかでもフルバスタチンは、抗酸化作用が強いのが特徴である。老化促進には活性酸素やフリーラジカルによる組織の酸化が関与している。したがって、フルバスタチンの脳内移行性を明らかにすることは、老化進展の抑制に貢献するかもしれない。

(3) 人は老化にともないパーキンソン病を発症するリスクが高まることは知られている。パーキンソン病治療薬であるアマンタジンは A 型インフルエンザの治療や脳代謝改善薬として脳血管障害慢性期の意欲低下・自発性低下に有用であることが知られている。一方で、アマンタジンは、交通事故などによる外傷性脳損傷後の意識障害患者の機能的障害の回復を早め、認知症などに対する改善作用も有する。したがって、老化の進展予防の視点からアマンタジンの血液脳関門輸送について、BBMC を用いて評価した。 ^3H アマンタジンの BBMC への取り込みは、取り込み時間の経過にともない増加したが、低温で輸送が抑制された。また、非標識体の薬物濃度の増加に伴い、取り込み速度が飽和することがわかった。有機カチオン輸送系 (OCTs) の基質のなかで 1mM の 1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP⁺) と TEA だけが ^3H アマンタジンの輸送を約 50%阻害した。さらに、アマンタジンの構造類似体である 1-(1-アダマンチル)エチルアミン (リマンタジン) による阻害効果も認められた。これに対して、 ^3H アマンタジンの細胞内取り込み輸送は、プロベネシド、 μ -アミノ馬尿酸、プラバスタチン、ペニシリン、タウロコール酸のような有機アニオントランスポーターの典型的な基質によって、阻害効果は認められなかった。また、酸性アミノ酸のグルタミン酸、中性アミノ酸のグルタミン、フェニルアラニン、ロイシン、塩基性アミノ酸のヒスチジン、リジン、アルギニンのような内因性アミノ酸は、アマンタジンの取り込みを阻害しなかった。したがって、何らかの有機カチオントランスポーターによる担体介在機構によって、血液脳関門輸送されることが示唆される。現在、マウス脳灌流法を用いて引き続き in vivo で検討しているところである。

アマンタジンの脳から血液脳関門を関した消失は、 ^3H アマンタジンの約 50%がラット大脳内微量注入後 60 分に比較的緩やかに

消失していることがわかった。その消失は典型的な有機アニオントランスポーターの基質により抑制されなかった。これに対して、有機カチオントランスポーターの基質のなかで 20mM の MPP^+ だけがアマタジンの脳からの排出を有意に阻害した。これらのことから、アマタジンの血液脳関門輸送には MPP^+ に感受性のある有機カチオントランスポーターの一部が取り込みや排出に働いている可能性が明らかになった。 MPP^+ はパーキンソン病関連神経毒として、神経伝達物質再取り込み機構により細胞膜上のドーパミントランスポーターを介して神経終末に取り込まれ、ドーパミン神経を選択的に細胞死させる。またアマタジンは OCT2 の基質薬物として尿細管分泌されることが知られている。したがって、アマタジンの血液脳関門での OCTs 介在輸送機構を明らかにすることは、外傷性脳障害やパーキンソン病のような病態時にその輸送がどのような変動を示すかを把握することができ、疾患の進展予防のための有効な薬物治療に応用につながる知見となると考えられた。

(4) パーキンソン病 (PD) は、脳の黒質線条体などの神経細胞が傷害され主に運動機能や知的機能などが損なわれる。特に高齢者に多く発症する病気であるとともに、活性酸素が関与する老化に関連する病態である。そこで、PD 治療薬の 1 つであるレボドパの L 型中性アミノ酸トランスポーターを介した脳内取り込み輸送に及ぼす PD の影響を明らかにすることを試みた。MPTP 処置により、線条体中ドーパミンならびにドーパミン関連代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸およびホモバニリン酸の濃度は、それぞれ 82, 75 および 66% 減少し、それに起因して、PD 症状に特徴的な行動である動作緩慢ならびに無動・固縮が観察された。放射性標識されたレボドパの血液脳関門透過固有クリアランスは、PD 群で有意に低下した。放射性標識されたレボドパの脳内取り込みを速度論的に解析したところ、ミカエリス定数はコントロール群と PD 群との間に変化が認められなかったものの、PD 群における最大輸送速度は 15% 程度低下した。これらの結果より、PD 発症時においては LAT1 によるレボドパの輸送効率がわずかながら減少することが示唆された。

(5) 糖尿病をはじめとした生活習慣病を有するヒトでは、体内での糖化が亢進しているために老化が進んでいるとも言われている。肥満は糖尿病、脂質異常症、高血圧だけでなく、ほかにも数多くの疾患を発症させると考えられており、これらの生活習慣病の上流にある重要な病態とされる。老化の進展予防の

視点から、とくに最終糖化産物の蓄積を防止する目的で、肥満治療薬であるマジンドールの脳内移行特性を解析した。In vitro ヒト毛細血管内皮細胞ならびにラット脳毛細血管内皮細胞、in vivo マウス脳灌流を用いた実験から、マジンドールの脳内取り込みに単純拡散機構と P-糖タンパク質の関与が明らかになった。したがって、P-糖タンパク質を基質とする他の薬剤との併用する場合、薬物相互作用の観点からマジンドールの中性副作用が生じる危険性があると示唆された。

(6) アマタジンは、交通事故などによる外傷性脳損傷後の意識障害患者の機能的障害の回復を早め、パーキンソン症候群、認知症などに対する改善作用を有する。老化の進展予防の視点からアマタジンの脳内移行特性を解析した。In vitro ラット毛細血管内皮細胞ならびに in vivo マウス脳灌流法を用いた実験から、アマタジンの脳内輸送に異物排出ポンプである P-糖タンパク質が関与していないことを明らかにした。

(7) スルファメトキサゾール (SMX) - トリメトプリム (TMP) 配合剤 (ST 合剤) の投与により急性腎障害の副作用や、腎機能障害に由来しない血清クレアチニン (SCr) の上昇が報告されている。In vitro ヒト腎上皮細胞において、トリメトプリムはヒト有機カチオントランスポーター (hOCT2) を介するクレアチニンの取り込みを有意に阻害することが報告されている。このことから、SCr 上昇の原因は、本剤中の SMX ではなく、TMP による尿細管でのクレアチニンの分泌阻害にあり、薬物による腎機能障害とは無関係であるようである。しかし、高齢における腎機能への影響が問題視されているにもかかわらず、わが国においては SCr の上昇の程度や、その患者の要因は必ずしも明確ではない。また、本剤の投与方法や投与量は、目的とする予防や治療、施設によっても様々であることから、これまで日本人患者における SCr の上昇の程度を遡及的に調査した報告は極めて少ない。

Fig. 1 に示すように、本剤の投与前後の比較から、年齢では 74 歳以下 (平均 63.7 歳, 0.606 ± 0.170 vs 0.654 ± 0.187 (投与前 vs 投与後, 平均値 \pm 標準偏差), $n=21$) と 75 歳以上 (平均 80.5 歳, 0.638 ± 0.192 vs 0.706 ± 0.224 , $n=28$) の群、性別では男性 (0.670 ± 0.175 vs 0.732 ± 0.189 , $n=24$) と女性 (0.581 ± 0.181 vs 0.638 ± 0.219 , $n=25$) の群、および投与期間の総服用量では 8 g 以上 (平均 29.8 g, 0.608 ± 0.188 vs 0.699 ± 0.215 , $n=25$) の群において SCr の有意な上昇が認められた ($P < 0.05$)。

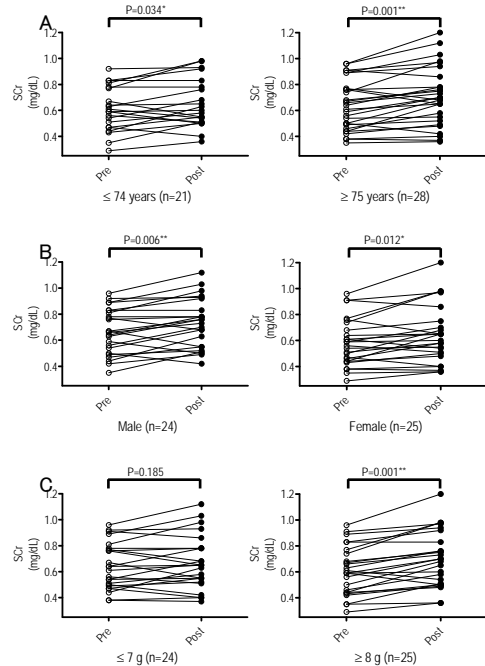


Fig. 1 正常な腎機能を有する日本人患者に ST 合剤を投与後の血清クレアチニン (SCr) に及ぼす年齢 (A)、性別 (B)、および総服用量 (C) の影響

SCr の上昇因子の独立性を探索するために、年齢、性別および投与期間の総服用量を独立変数として対象患者 49 例について多変量ロジスティック回帰分析を行った。すべての変数をカテゴリーとして解析した結果、本剤投与後の SCr 上昇に対するリスク因子として総服用量が見いだされ、そのオッズ比は 6.571 [95%信頼区間=1.735-24.882, $P=0.006$] であった。

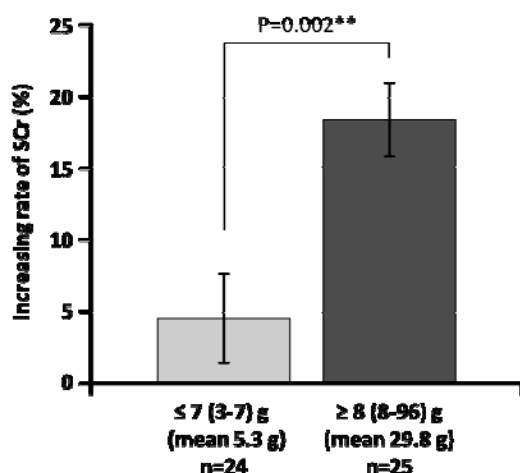


Fig. 2 正常な腎機能を有する日本人患者に ST 合剤を投与後の血清クレアチニン (SCr) 上昇率に及ぼす総服用量の影響

投与前の SCr をベースラインとして比較したところ、本剤投与後の SCr は 7 g 以下 (平均 5.3 g) の総服用量群でわずかな上昇 (4.5%) であったのに対して、ST 合剤総服用量がその投与期間で 8 g 以上 (平均 29.8 g) のとき、血清クレアチニン濃度は 20% 程度まで有意な上昇 ($P=0.002$) を示すことが臨床的に明らかになった (Fig. 2)。

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 3 件)

1. 宗村盛, 鈴木豊史, 高野賢児, 島田侯陸, 井上真由美, 川井龍美, 深水啓朗, 伴野和夫, スルファメトキサゾール/トリメトプリム配合剤の投与による血清クレアチニンの上昇とその要因: 正常な腎機能を有する日本人患者を対象とした遡及的解析, 薬学雑誌, 133, 587-595, 2013 (査読有).
DOI:10.1248/yakushi.12-00273
2. 鈴木豊史, 中枢神経系薬の創薬開発における血液脳関門透過の重要性, ファルマシア, 48, 761-766, 2012 (査読無).
URL:<http://ci.nii.ac.jp/naid/10030986531>
3. 鈴木豊史, オピオイド鎮痛薬の血液脳関門輸送, 薬学雑誌, 131, 1445-1451, 2011 (査読有).
DOI:10.1248/yakushi.131.1445

[学会発表] (計 4 件)

1. 鈴木豊史, 宗村盛, 高野賢児, 島田侯陸, 井上真由美, 川井龍美, 深水啓朗, 伴野和夫, スルファメトキサゾール/トリメトプリム配合剤の投与による血清クレアチニンの上昇とその要因 [29amF-359], 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜.
2. Takayuki Furuishi, Yukiko Kato, Toshiro Fukami, Toyofumi Suzuki, Haruhisa Ueda, Kazuo Tomono, Effect of 1,8-Cineole on the Percutaneous Absorption of Lomerizine Dihydrochloride [626], The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012 年 7 月 16 日, Québec City (Canada).
3. Toyofumi Suzuki, Yumiko Miyazaki, Aya Ohmuro, Masaki Watanabe, Takayuki Furuishi, Toshiro Fukami, Kazuo Tomono, Blood-Brain Barrier Transport of an Essential Amino Acid after Cerebral Ischemia Reperfusion Injury [P01-01], The XVth International Symposium of Brain Edema and Cellular Injury (Brain

Edema 2011), 2011年10月22日, 東京.

4. 鈴木豊史, 山本拓真, 大室 綾, 渡辺雅紀, 古石誉之, 深水啓朗, 伴野和夫, 血液脳関門におけるレボドパの取り込み輸送に及ぼすパーキンソン病態の影響 [29P-0333], 日本薬学会第131年会, 2011年3月29日, 静岡.

[図書] (計2件)

1. Toyofumi Suzuki, Yumiko Miyazaki, Aya Ohmuro, Masaki Watanabe, Takayuki Furuishi, Toshiro Fukami, Kazuo Tomono, Springer, Brain Edema XV (Acta Neurochirurgica Supplement 118), 2013, 297-302.
2. Toshiro Fukami, Toyofumi Suzuki, Ayyalusamy Ramamoorthy and Kazuo Tomono, Science Publishers, Nanomedicine and the Cardiovascular System, 2011, 263-283.

[その他]

ホームページ等

薬が脳に到達するメカニズムに挑戦

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page.jsp?id=1390>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 豊史 (TOYOFUMI SUZUKI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20267115

(2) 研究分担者

深水 啓朗 (TOSHIRO FUKAMI)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20366628

