

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790170

研究課題名(和文) 脳関門P糖タンパクの単分子輸送活性と発現量に基づく薬物脳移行性の病態変動の解明

研究課題名(英文) Elucidation of disease-related changes of drug brain distributions based on intrinsic efflux activity and absolute expression level of P-glycoprotein at the brain barrier

研究代表者

内田 康雄 (UCHIDA, YASUO)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70583590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：病態時の血液脳関門(BBB)のP糖蛋白の薬物排出機能を解明する基盤を構築する事を目的とした。P糖蛋白のタンパク質絶対発現量が変動する病態(てんかん)では、BBBのP糖蛋白機能は、強制発現細胞で測定される単分子輸送活性と単離した脳毛細血管における絶対発現量の統合によってin vitroから再構築できる事が証明された。単分子あたりの排出輸送機能が変動する病態(炎症酸化ストレス)では、カベオリン1のTyr14のリン酸化量がその変動を推定するマーカーのひとつであることを発見した。サルでも再構築を実証でき、病態時のヒトBBBのP糖蛋白機能をin vitroから解明するための新たな道を拓いた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a methodology to clarify drug efflux function of P-glycoprotein (P-gp) at the blood-brain barrier (BBB) in disease conditions. We experimentally demonstrated that, in the disease which the absolute protein expression level of P-gp changes (epilepsy), the in vivo function of P-gp at the BBB can be reconstructed from in vitro by integrating the efflux activity per one P-gp molecule measured in its overexpressing cell lines and the absolute expression level in isolated brain capillaries. We found that, in the disease condition which the efflux activity per one P-gp molecule changes (inflammatory oxidative stress), the phosphorylation level of caveolin1 Tyr14 is one of the biomarkers to estimate the change of the activity. We also demonstrated the reconstruction of P-gp function in monkeys as well as rodents, and opened the new way to clarify the efflux function of P-gp at the human BBB in diseases from in vitro system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：血液脳関門 病態 P糖タンパク 絶対発現量 単分子輸送活性 In vivo機能の再構築 Caveolin1 Pharmacoproteomics

### 1. 研究開始当初の背景

中枢疾患の医薬品開発では、前臨床試験を通過後ヒトの臨床試験において失敗する確率は92%と非常に高い。主要な原因の一つとして、候補化合物がヒト血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) を期待通りに通過せず、薬効を発揮するのに十分な脳内濃度に達しない、あるいは濃度が高すぎるため有害な作用が起きてしまうことが挙げられている。健常時と異なり疾患時ではBBBの物質輸送機能が変化することが示唆されていることから、患者のBBBの輸送機能の解明を目指す研究は医薬品開発において必須である。

しかし、これまでの多くの研究は、正常時を対象としていること、さらにはヒトではなくげっ歯類を対象とした解析にとどまっていた。この原因として、ヒト個体を対象とした研究が極めて制限されていることはいままでもないが、特に、動物とヒト、あるいは *in vitro* と *in vivo* の輸送機能の違いを定量的に解明する手法がきわめて未熟であったためである。

これに対して、我々の研究室は、独自に、BBBでの物質輸送に重要な役割を果たしている複数種類のトランスポーターの絶対発現量を液体クロマトグラフィー-接続型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて解明する手法 (Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP) を開発することによって、動物とヒトあるいは *in vitro* と *in vivo* の間の機能的ギャップを埋め合わせ、世界に先駆けて初めて、動物あるいは *in vitro* からヒト *in vivo* の輸送機能を外挿 (=再構築・予測) し解明することへの道を拓いた。

しかし、この手法の有用性・応用性は証明されていない。QTAPの輸送機能研究への応用性を示し、種々の機能的ギャップを解明する上で有用であることを示すことは非常に価値あることである。また、トランスポーターの絶対発現量の違いに基づいて、ギャップを補完し、*in vitro* あるいは実験動物からヒトの *in vivo* での輸送機能を再構築することが可能であること、さらに、前人未到の領域である“病態”のBBBのトランスポーターの輸送機能を解明する研究へ応用できることを証明することは、創薬研究において極めて重要である。本研究の特色は、世界に先駆けて、最先端プロテオミクスを用いて中枢疾患時のBBBの物質輸送機能を解明し、世界をリードし、より多くの世界の研究者・創薬企業との共同研究へ発展させるための基盤整備が実現する点である。

### 2. 研究の目的

病態変動を解析するためには、対象トランスポーターの絶対発現量の変化を精度よく正確に測定し、正常時との違いの有無や違いの程度を明確に決めることができることが必須である。あらゆる異なるタンパク質試料

(異なる系統のマウス・ラットの脳毛細血管、ノックアウトマウスの脳毛細血管、など) に対して、当研究室で確立した QTAP 技術を適用し、測定技術の最適化を図ることを目的とした。

P-glycoprotein (P-gp/mdr1a/MDR1) は、BBBにおける薬物輸送も最も支配しているトランスポーターである。QTAP解析で明らかになる、*in vitro* と *in vivo* の P-gp の絶対発現量の違いを使って、*in vitro* の P-gp の強制発現細胞から、*in vivo* の BBB での P-gp の輸送機能を再構築できることを実証することを目的とした。

てんかんは、BBBのP-gpの発現量が変動する疾患である。上述で実証する再構築の手法を使って、てんかんモデルマウスにおけるP-gpの輸送機能の変化を *in vitro* から再構築でき解明できることを証明することを目的とした。

さらに、炎症酸化ストレス条件下では、発現量変化なしにBBBのP-gpの輸送活性が低下することが知られている。このようなケースに対しても *in vitro* から *in vivo* の輸送活性を再構築できるように、本課題では、過酸化水素暴露条件下におけるP-gpの単分子あたりの輸送活性の変動機構を解明し、再構築に重要なバイオマーカーを同定することを目的とした。

また、ヒトへの応用の基盤を整備するため、ヒト脳毛細血管におけるトランスポーターの蛋白質発現量を解明すること、また、ヒトに近いカニクイザルを用いて上述の *in vitro* からの *in vivo* BBBのP-gp輸送機能の再構築がヒトに近い動物でも可能であり、ヒトへの応用が十分可能であることを証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウス (ddY, FVB, C57BL/6j, P-gp/bcrp knockout)、ラット (Wistar, SD)、マーモセット、カニクイザル、ヒトの脳から glass beads column 法あるいは nylon mesh 法を用いて脳毛細血管を単離し、7M グアニジン塩酸溶液を用いて可溶化・変性し、ジチオトレイトール (DTT) による還元、ヨードアセトアミド (IAA) によるアルキル化を行い、メタノールクロロホルム沈殿法によってタンパク質画分を抽出し、プロテアーゼ消化によってペプチド試料を調製し、安定同位体標識ペプチドを添加後、LC-MS/MSを用いて対象タンパク質に特異的なペプチド断片を定量することによって対象タンパク質 (トランスポーター) の絶対発現量を算出した。プロテアーゼによる異なる消化条件や異なる質量分析条件を検討した。

てんかんモデルとして、ペンチレンテトラゾール (PTZ) を 30 mg/kg/day で 5 週間腹腔内に投与してキンドリング状態を獲得したマウス、および自然発症てんかんモデルである EL マウスを用いた。抗てんかん薬治療モ

デルとして、フェニトイン (PHT) を 50 mg/kg/day で 5 週間腹腔内に投与したマウスを作製し、使用した。また、炎症酸化ストレスモデルとして、3 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与したマウスを使用した。

P-gp を強制発現させた LLC-PK1 細胞の単層膜を用いて P-gp 基質の経細胞輸送解析を実施し、各基質に対する P-gp の輸送活性を求めた。この輸送活性に対して、この細胞および単離脳毛細血管における P-gp の絶対発現量を統合することによって、in vivo の BBB における P-gp の輸送機能を再構築し、実測値と比較することによって再構築の精度を評価した。

リン酸化プロテオミクス解析では、上述の方法によってペプチド試料を調製後、HAMMOC 法によってリン酸化ペプチドを濃縮・精製し、必要に応じてフッ化水素酸による脱リン酸化処理を行い、測定用の試料とした。

#### 4. 研究成果

(1) プロテオミクス技術の各種 BBB 関連試料への適用と最適化

当研究室で確立した QTAP 技術をマウス (ddY, FVB, C57BL/6j, P-gp ノックアウト、Bcrp ノックアウト、ダブルノックアウト)、ラット (Wistar, SD)、マーモセット、カニクイザルの脳から単離した脳毛細血管やヒト脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) に適用し、定量精度を評価した (論文、)。サルではげっ歯類に比べて P-gp 基質の脳移行性が高いことが報告されており BBB での P-gp の活性が低いことが示唆されていたが、本検討によって、確かに、P-gp のタンパク質発現量がカニクイザルではマウスやラットなどのげっ歯類に比べて約 3 倍小さいことが示された。P-gp あるいは Bcrp のノックアウトマウスでは、最近の研究で BBB において互いの発現は一方のノックアウトによって誘導される現象は起きていないことが示唆されていたが、確かに QTAP 技術による測定の結果、発現誘導が生じていないことを示すことができた。以上のことから、病態時に起こりうる発現変動の有無をある程度精度よく定量できる系であることを確認することができた。

プロテアーゼの処理条件も検討し、従来の trypsin のみの処理に加えて、リジルエンドペプチダーゼ (LysC) および ProteaseMax を加えることによって、効率よく消化できることを明らかにした (論文)。質量分析装置に関して、三連四重極型装置 (QTRAP5500) においてバックグラウンドノイズに埋もれてしまい検出できなかった peak (分子) に関しては、分解能および定量性能がともに高い TripleTOF5600 を用いることで検出・定量できることを示した (論文)。

また、ヒト脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) を試料として、プロテオミクスおよび

リン酸化プロテオミクスの手法の最適化を図った。リン酸化ペプチドの濃縮には HAMMOC 法を採用し、非リン酸化ペプチドを 99.9% 以上除去できること、リン酸化ペプチド濃縮・精製による S/N 比 (感度) の上昇が 34 倍であることを示した。また、それに続くフッ化水素酸による脱リン酸化処理 (効率 > 94%) によって、LC-MS/MS での検出感度をさらに 1.2-6.4 倍向上できることを示した。Caveolin1 のリン酸化ペプチドを HAMMOC 法で濃縮精製し、LC-QTRAP5500 の SRM モードで定量した結果、20 attomole/ug protein まで高感度に定量できることが示された。従来の非リン酸化ペプチドを対象とした測定では、500-1000 attomole/ug protein 程度の感度であるため、最低でも従来の 10 倍以上は高感度にリン酸化ペプチドを定量できる測定系を確立でき、caveolin1 の場合、約 0.1% のリン酸化率まで定量が可能となった。

(2) BBB の P-gp の in vivo 輸送機能の in vitro からの再構築

Mouse P-gp (mdr1a) 安定発現 LLC-PK1 (L-mdr1a) および親株 LLC-PK1 細胞を用いて 11 化合物の mdr1a 輸送基質の経細胞輸送速度を計測し、両細胞の経細胞輸送速度の比率を算出することによって mdr1a 輸送活性を求めた。また、QTAP 技術 (LC-MS/MS) を用いて L-mdr1a 細胞における mdr1a タンパク質絶対発現量は 15 fmol/ug protein であることを明らかにした。各基質の mdr1a 輸送活性値を 15 fmol/ug protein で除することによって mdr1a 単分子あたりの輸送活性を解明し、この単分子輸送活性値とマウス脳毛細血管における mdr1a 発現量 (14 fmol/ug protein) を統合することによって、in vivo の BBB の mdr1a の輸送活性を表す Kp brain ratio (定義; wild-type mouse と mdr1a knockout mouse の脳内対血漿中濃度比の比率) を再構築した。その結果、すべての化合物において Kp brain ratio の再構築値は、 $\pm 2.7$  倍の範囲内で実測値と一致した。従って、発現量情報に基づいて in vitro 系から in vivo の BBB の P-gp 輸送機能を再構築できることがマウスをモデルとして証明された (論文、)。

(3) てんかんにおける in vivo 機能再構築

てんかんモデルマウスである EL マウス及び PTZ 誘発てんかんマウスから脳毛細血管を単離し、QTAP 技術によって P-gp の絶対発現量を測定した。正常マウスと比べて、有意に、P-gp のタンパク質発現量の増加が認められた。マウス P-gp (mdr1a) 発現 LLC-PK1 細胞および親株 LLC-PK1 細胞のそれぞれの単層膜において、P-gp 基質である verapamil の Apical-to-Basal 輸送速度に対する Basal-to-Apical 輸送速度の比率を計測し、発現細胞のその比率を親株の比率で除することによって P-gp の輸送活性を求めた。こ

れを P-gp の絶対発現量で除することで、verapamil の輸送に対する P-gp の単分子輸送活性を明らかにした。上記で解明された、てんかんモデルマウスの脳毛細血管における P-gp のタンパク質発現量および単分子輸送活性を統合することによって、BBB の P-gp 輸送活性を再構築した。この再構築された活性に、受動拡散による平衡状態を反映する血漿中と脳内の蛋白質非結合型分率 (verapamil) の比率を統合することによって、verapamil の脳内対血漿中濃度比 (Kp brain) を再構築した。定速静脈内投与法によって計測されたてんかんモデルマウスにおける Kp brain の実測値とほぼ一致した。抗てんかん薬治療モデルであるフェニトイン (PHT) 慢性投与マウスにおいても同様に再構築することに成功した。以上のことから、てんかん及びその薬物治療時における BBB の P-gp 輸送活性の上昇を発現量情報に基づいて *in vitro* から再構築できることが示された (論文投稿中)。

#### (4) 炎症酸化ストレス条件下における P-gp の単分子輸送活性の変動機構の解明

3 mg/kg LPS 投与により炎症酸化ストレスモデルマウスを作製し、P-gp 基質である verapamil の Kp brain を計測した結果、正常マウスに比べて有意に高い値を示し、BBB の P-gp の輸送活性が低下していることが示唆された。脳毛細血管を単離して QTAP 技術を用いて P-gp の絶対発現量を計測した結果、正常時とほぼ同程度であった。以上のことから、BBB の P-gp の輸送機能低下は、自身の単分子あたりの輸送機能の低下が原因であることが示唆された。

単分子輸送活性の変動メカニズムを解明するため、網羅的高感度リン酸化プロテオミクスの手法を用いて、過酸化水素暴露条件下のヒト脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) におけるリン酸化蛋白質のリン酸化量の変動を網羅的に解析した。その結果、最もリン酸化量の変動が顕著な分子として caveolin1 を同定した。LC-MS/MS の SRM mode を用いた、caveolin1 のリン酸化部位 Tyr6, Tyr14, Tyr25 及び Tyr42 に対する高感度定量系を用いて、各リン酸化部位を定量し、単分子輸送活性との関係を解析した結果、過酸化水素の暴露濃度を変えることで、Tyr14 のリン酸化量と単分子輸送活性が良好に相関した ( $R^2 > 0.91$ )。従って、P-gp の単分子輸送活性の変動機構の一つを同定し、caveolin1 の Tyr14 のリン酸化定量が P-gp の単分子輸送活性を知るためのバイオマーカーとなることが示唆された。

#### (5) ヒトへの応用へ向けて

QTAP 技術や再構築の手法を中枢疾患患者に応用することが最終的なゴールである。本課題では、その前段階として QTAP 技術をヒトの正常な脳毛細血管に適用した。また、ヒトに近いカニクイザルを用いて、マウスで実

証した再構築の理論がヒトに近い動物でも適用可能であることを証明することを目的とした。

先ず、16 歳から 77 歳のヒト大脳皮質 (7 人のドナー) から脳毛細血管を単離し、QTAP 技術を用いて、トランスポーターを含む 114 種類のタンパク質分子の絶対発現量を測定した。その結果、P-gp、BCRP、MRP4、ABCA2、ABCA8 などの ABC transporter や CAT1, LAT1, MCT1, EAAT1, GLUT1 などの SLC transporter のタンパク質発現が検出・定量された。マウスに比べて (14.1 fmol/ug protein)、ヒトの P-gp の発現量 (6.06 fmol/ug protein) は小さいことが示された。サルと同程度であった。げっ歯類と異なり、ヒトでは P-gp と同程度に BCRP が発現していることが明らかとなった。興味深いことに、有機アニオン性物質を輸送する OAT3, OATPs および MRP4 の発現量は、げっ歯類に比べて顕著に小さいことが示唆された。その他げっ歯類と比べて異なる点が多数存在した (論文、 )。本成果はヒト病態 BBB への応用へ向けた重要な第一歩となった。今後、ヒト病態への応用を目指す。

絶対発現量解析の結果から、カニクイザルはヒトに極めて近く多くの分子の発現量がヒトの 3 倍以内であることがわかった。特に P-gp については 1.5 倍以内であった。このヒトに近いサルにおいて、*in vitro* からの再構築の手法をバリデーションすることは極めて重要である。そこで、マウスと同様に、カニクイザル P-gp の安定発現 LLC-PK1 細胞において 6 種の P-gp 基質に対する輸送活性を計測し、その絶対発現量で除し、カニクイザルの脳毛細血管における P-gp の絶対発現量を統合することによって、*in vivo* の BBB の P-gp の輸送機能を再構築した。これに、血漿中及び脳内の蛋白質非結合型分率を統合し、実測可能である Kp brain を再構築した。実測の Kp brain と比較した結果、全 6 化合物について再構築値は実測の 3 倍以内で一致することが示された。従って、サルにおいても *in vitro* から発現量情報に基づいて *in vivo* の P-gp の輸送機能を十分に再構築できることが示唆された。以上のことから、本再構築理論は、ヒトへの応用性がきわめて高いと判断できる (論文投稿中)。

#### (6) まとめ

本研究課題を通じて、病態では BBB の P-gp の絶対発現量あるいは単分子輸送活性が変動する場合が存在することを解明した。病態時の *in vivo* の BBB の P-gp の輸送機能は、単分子輸送活性と単離した脳毛細血管における絶対発現量の統合によって再構築されるが、単分子輸送活性も変動する可能性があるため考慮が必要であることが明らかとなった。脳毛細血管の caveolin1 の Tyr14 のリン酸化定量は、単分子輸送活性を推定するうえで有用なバイオマーカーとなることがわか

った。これらの成果は、病態時の BBB のトランスポーターの輸送機能を解明するための新たな道を拓いた。ヒトやサルなどでも同様の再構築が可能であることが示唆される検討結果が得られたことから、ヒトの中核疾患時の BBB のトランスポーターの機能解明・機能予測のために、応用可能であることが期待される。In vitro から予測できる点は、創薬の初期段階への適用性が高く、近い将来、創薬において本課題で確立された手法が応用されることが期待される。

#### 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 19 件)

Y Uchida, M Tachikawa, S Ohtsuki, T Terasaki. Blood-Brain Barrier (BBB) Pharmacoproteomics: A New Research Field Opened Up by Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP). *IN Drug Delivery to the Brain - Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*, Margareta Hammarlund-Udenaes, Elizabeth de Lange and Robert Thorne (Ed.), Springer, New York, 査読無、pp 63-100 (2014). [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9105-7\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-9105-7_3)

Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Inoue T, Ohtsuki S, Terasaki T. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. *J Pharm Sci.* 査読有、102(9):3343-3355 (2013). doi:10.1002/jps.23575.

Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS.* 査読有、10(1):21 (2013). doi:10.1186/2045-8118-10-21.

内田康雄、立川正憲、寺崎哲也。定量的標的プロテオミクス(QTAP)に基づく血液脳関門機能の in vitro 再構築。 *細胞工学*, 査読無、32(9)、955-961 (2013)。 <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901467.html>

内田康雄、佐藤和貴、黒田広樹、星裕太郎、立川正憲、寺崎哲也。血液脳関門における定量的標的絶対プロテオミクス

解析。 *血管医学*, 査読無、14(4)、59-69 (2013)。

[http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J04\\_14\\_04](http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J04_14_04)

Agarwal S, Uchida Y, Mittapalli RK, Sane R, Terasaki T, Elmquist WF. Quantitative proteomics of transporter expression in brain capillary endothelial cells isolated from P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (Bcrp), and P-gp/Bcrp knockout mice. *Drug Metab Dispos.* 査読有、40(6):1164-1169 (2012). doi: 10.1124/dmd.112.044719. Ito K, Uchida Y, Ohtsuki S, Aizawa S, Kawakami H, Katsukura Y, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci.* 査読有、100(9):3939-3950 (2011). doi: 10.1002/jps.22487.

Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.* 査読有、117(2):333-345 (2011). doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07208.x.

Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, Jacob A, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, Terasaki T, Scherrmann JM. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm.* 査読有、8(4):1332-1341 (2011). doi: 10.1021/mp200129p.

Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, Terasaki T. Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of in vivo brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 査読有、339(2):579-588 (2011). doi: 10.1124/jpet.111.184200.

[学会発表](計 3 1 件)

内田康雄。定量的プロテオミクス技術を用いた血液脳関門における ABC トランスポーターの in vivo 輸送機能の再構築。熊本大学拠点形成研究 B 主催特別講演会、招待講演、2013 年 12 月 2 日、熊本大学

(熊本).

内田康雄. トランスポーターのタンパク質発現量を考慮した *in vitro* からの薬物脳移行性の予測. 第 36 回薬物動態談話会年会、招待講演、2013 年 11 月 7 日~2013 年 11 月 8 日、オークラアクトシティホテル浜松(浜松).

Uchida Y., Hoshi Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Terasaki T. Quantitative proteomics-based investigation of regulatory mechanism for P-glycoprotein efflux activity at the blood-brain barrier in central nervous system disease: epilepsy and inflammation. 日本薬物動態学会第 28 年会, 2013 年 10 月 9 日~2013 年 10 月 11 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区).

内田康雄、大槻純男、寺崎哲也. Pharmacoproteomics (PPx) に基づく血液脳関門 P-gp・BCRP の輸送機能の再構築. 日本薬剤学会第 28 年会, 2013 年 5 月 23 日~2013 年 5 月 25 日、ウインクあいち(名古屋). **最優秀発表賞受賞.**

Uchida Y., Ohtsuki S., Terasaki T. In vitro-to-in vivo reconstruction (IVIVR) of brain distribution for dual P-gp and BCRP substrates based on pharmacoproteomic (PPx) approach. 日本薬物動態学会第 27 年会, 2012 年 11 月 20 日~2012 年 11 月 22 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)、**Open Symposium 2 に選出.**

Uchida Y., Ito K., Ohtsuki S., Katsukura Y., Ikeda C., Suzuki T., Kamiie J., Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human, monkey and mouse blood-brain barrier transporters. Human Proteome Organization (HUPO) 11th Annual World Congress, 2012 年 9 月 9 日~2012 年 9 月 13 日、Boston, USA.

Uchida Y., Wakayama K., Ohtsuki S., Ohe T., Chiba M., Ishii Y., Terasaki T. Reconstruction of drug distribution in monkey brain based on absolute quantification of MDR1 expression at blood-brain barrier. Gordon Research Conference, Barriers of the CNS, 2012 年 6 月 17 日~2012 年 6 月 22 日、New London, USA.

Y Uchida, S Ohtsuki, T Terasaki. Quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) based reconstruction of drug resistance mechanism at blood-brain barrier in epileptic model. Network Medicine Winter Camp of GCOE 2012, 2012 年 2 月 4 日-2012 年 2 月 5 日、秋保(仙台).

Y Uchida, S Ohtsuki and T Terasaki. IN VITRO-TO-IN VIVO RE-CONSTRUCTION OF BBB DRUG TRANSPORT FUNCTION BASED ON QUANTITATIVE TARGETED ABSOLUTE PROTEOMICS IN A NATURAL MODEL OF EPILEPSY (EL MOUSE). 14th Symposium on Signal Transduction in the Blood Brain Barriers, 2011 年 9 月 7 日-2011 年 9 月 9 日、Istanbul, Turkey.

Uchida Y., Wakayama K., Ohtsuki S., Ohe T., Chiba M., Ishii Y., Terasaki T. Reconstruction of Drug Distribution in the Monkey Brain based on the BBB MDR1 Protein Quantification. 9th Cerebral Vascular Biology, International Meeting, 招待講演、2011 年 6 月 21 日-2011 年 6 月 24 日、Leiden, Netherland.

〔図書〕(計 1 件)

内田康雄、立川正憲、南江堂、薬剤学実験法必携マニュアル II 生物薬剤学、2014 年、312-324 ページ.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

薬物送達学分野研究室ホームページ:

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 康雄 (UCHIDA, YASUO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 70583590