

## 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1日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890066

研究課題名（和文） 組織関門における新規インフラックス分子実体の同定と薬効・毒性予測への展開

研究課題名（英文） Study of novel influx transporters at the blood-tissue barrier

## 研究代表者

久保 義行 (KUBO YOSHIYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・講師

研究者番号：20377427

研究成果の概要（和文）：有機カチオン性薬物（ $^3\text{H}$  verapamilなど）に関して、*in vivo*解析および*in vitro*解析を実施した。その結果、内側血液網膜関門には、担体介在型の $^3\text{H}$  verapamilや $^3\text{H}$  propranolol、 $^3\text{H}$  pyrilamine取り込み輸送システムが存在することが示唆された。分子実体の探索では、内側血液網膜関門に発現する複数のオーファントランスポーター分子の存在が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：*In vivo* and *in vitro* analyses were performed to study transport mechanisms for cationic drugs, such as  $^3\text{H}$  verapamil, at the blood-retinal barrier (BRB). The results obtained suggested the involvement of carrier-mediated transport system in the influx transport of cationic drugs across the inner BRB. Furthermore, orphan transporters were identified as candidate molecules responsible for drug transport at the inner BRB.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：血液網膜関門・トランスポーター・薬物送達・オーファン分子

## 1. 研究開始当初の背景

薬物体内動態の重要過程である薬物生体膜透過において、トランスポーターの寄与が示唆され、薬物や栄養物の吸収・分布・排泄に影響を及ぼす新要因として考えられるようになった。インフラックストランスポーターは、薬物・栄養物の細胞内取り込み機能を有するトランスポーター分子である。特に、脳や網膜に形成される血液-組織関門において、インフラックストランスポーターが発現

することや、糖やアミノ酸など栄養物輸送機構研究によって、インフラックストランスポーターが低分子の組織関門透過性に寄与することが示唆されている。しかし、組織関門に発現する分子種、機能、役割に関する詳細な知見は依然限定されており、血液-組織関門における薬物インフラックス分子メカニズムは、精力的研究を要する状況であった。

## 2. 研究の目的

網膜は視覚を担う神経組織であり、糖尿病網膜症などは患者のQOLを低下させることから、優れた網膜疾患薬の開発が重要となる。循環血液中から網膜への物質移行は血液網膜関門 (BRB) が制御しており、血液網膜関門における取り込み輸送系の同定と分子機構の解明は、網膜での毒性発症機構やその回避戦略の開発、網膜疾患治療薬の開発において有用な知見となる。近年、種々の有機カチオン性薬物に関して、糖尿病網膜症治療や加齢黄斑変性症治療などにおける有用性が示唆されており、本研究では、BRB を介した網膜への有機カチオン性薬物取り込み輸送機構を検証した。

### 3. 研究の方法

*In vivo*解析は、Wistarラット (♂)において実施した。放射標識有機カチオン性薬物 ( $^3\text{H}$ )verapamilや( $^3\text{H}$ )propranolol) に関して、integration plot法やretinal uptake index (RUI)法などを実施し、有機カチオン性薬物の血液網膜関門透過性を評価した。

*In vitro*解析では、inner BRBの*in vitro*モデル細胞株である条件的不活化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2 細胞) を用いて、( $^3\text{H}$ )verapamilや( $^3\text{H}$ )propranolol、( $^3\text{H}$ )pyrilamineなどの取り込み輸送解析を実施した。さらに、同様の輸送解析系において、TR-iBRB2 細胞による有機カチオン性薬物輸送特性 (温度依存性、濃度依存性、pH依存性、膜電位依存性など)を解析した。*In vitro*取り込み輸送解析で得られたデータは、cell / medium (C/M) ratio ( $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein)として算定した。また、濃度依存性解析では、Michaelis-Menten式を基調として $K_m$ 値などを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血液網膜関門透過性の*in vivo*解析

薬物の組織関門透過性におけるインフラックストランスポーターの取り込み機能を検証・解明するため、ラットにおける*in vivo*解析を実施した。Integration plot解析を実施した結果、有機カチオン性薬物である( $^3\text{H}$ )verapamilのBRB透過クリアランスは、 $614 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g retina})$ と算定され、この値は、非透過性マーカーである( $^3\text{H}$ )D-mannitol ( $0.626 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g retina})$ )に比して高い値であった。さらに、RUI法においては、( $^3\text{H}$ )verapamilや( $^3\text{H}$ )propranololのRUI値として、それぞれ 507%および 1284%が得られた (図1)。

#### (2) 血液-網膜関門透過性の*in vivo*におけるインフラックストランスポーター寄与解析

*In vivo*阻害解析において、verapamilや

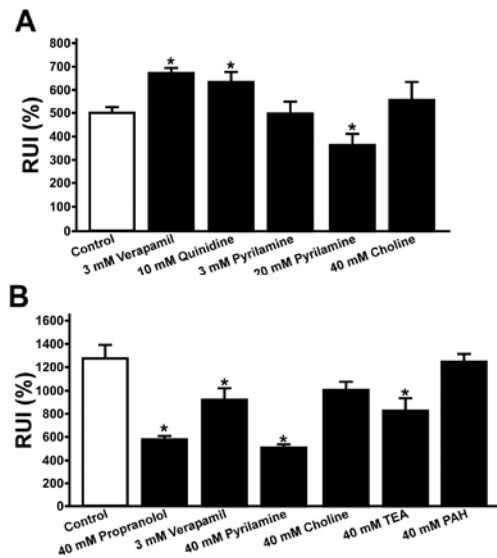
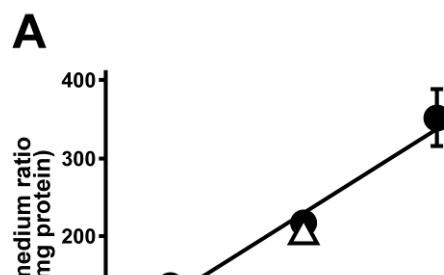


図1 ( $^3\text{H}$ )verapamil (A) および ( $^3\text{H}$ )propranolol (B) に関する *in vivo* 阻害解析。

pyrilamine、quinidineなどの有機カチオン性薬物が ( $^3\text{H}$ )verapamilのRUI値を有意に変動させた。 ( $^3\text{H}$ )verapamilのRUI値はpyrilamine存在下において低下し、verapamilやquinidine存在下において上昇した (図1A)。Verapamilやquinidineは薬物排出トランスポーターであるP-gp (ABCB1)の基質であることから、これら薬物によるRUI値の上昇はP-gp機能の阻害が原因と考えられた。また、propranololやverapamil、pyrilamineなどの有機カチオン性薬物存在下において、( $^3\text{H}$ )propranololのRUI値は有意な低下を示した (図1B)。以上の*in vivo*解析結果から、( $^3\text{H}$ )verapamilや( $^3\text{H}$ )propranololなどの有機カチオン性薬物インフラックス輸送機構がBRBに存在することが示唆された。

#### (3) 培養細胞を用いた薬物取り込み機能*in vitro*解析

*In vitro*解析では、BRBにおいて有機カチオン性薬物の輸送に寄与するインフラックス輸送系の存在が示唆されたことから、その輸送特性をより詳細に検証する目的で、培養モデル細胞を用いた取り込み輸送解析を実施した。BRBには、inner BRBとouter BRBが存在し、網膜への物質供給の3分の2をinner BRBが担うことから、inner BRBモデル細胞株である条件的不活化ラット網膜毛細血管内皮細胞 (TR-iBRB2 細胞) を用いて *in vitro* 輸送解析を実施した。解析の結果、TR-iBRB2細胞による ( $^3\text{H}$ )verapamil取り込みは時間依存的に増大するとともに、温度依存性や濃度依存性 ( $K_m = 61.9 \mu\text{M}$ 、 $K_d = 5.93 \mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$ ) が示された (図2)。また、同様に、( $^3\text{H}$ )propranolol取り込みは時間依存的に増大し、温度依存性や濃度依存



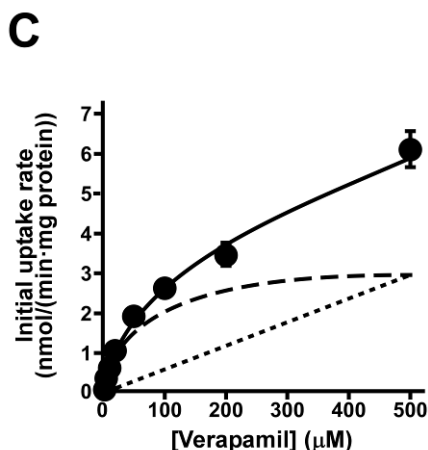
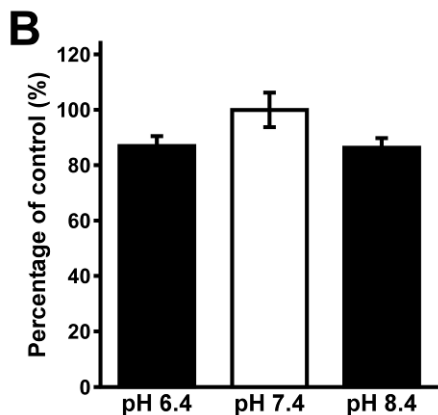


図2 TR-iBRB 細胞における<sup>3</sup>H]verapamil 取り込み輸送解析. (A) 時間依存性解析, 取り込み温度 37°C (●), 取り込み温度 4°C (○), (B) pH 依存性解析, (C) 濃度依存性解析.

性 ( $K_m = 237 \mu M$ ) を示すとともに、pH依存性を示した。これら解析結果から、何らかのインフラックストランスポーターが inner BRBの<sup>3</sup>H]verapamil および<sup>3</sup>H]propranolol インフラックス輸送系の分子の実体として機能していることが示唆された。加えて、有機カチオン性薬物である pyrilamineが *in vivo* 解析において<sup>3</sup>H]verapamil および<sup>3</sup>H]propranololのBRB透過性に有意な阻害効果を示したことから、<sup>3</sup>H]pyrilamineに関しても同様の解析を実施した。その結果、

<sup>3</sup>H]verapamilや<sup>3</sup>H]propranololと同様に、TR-iBRB2細胞は時間依存的な<sup>3</sup>H]pyrilamine取り込みの増大や温度依存性、濃度依存性 ( $K_{m1} = 20.2 \mu M$ ,  $K_{m2} = 252 \mu M$ )、pH依存性を示した。特に、濃度依存性解析の結果から、inner BRBの<sup>3</sup>H]pyrilamineインフラックス輸送系が複数のインフラックストランスポーターによって担われることが示唆された。また、<sup>3</sup>H]verapamilおよび<sup>3</sup>H]propranolol、<sup>3</sup>H]pyrilamineインフラックス輸送系のpH依存性を比較した結果、<sup>3</sup>H]verapamilインフラックス輸送系がpH非依存性である一方、<sup>3</sup>H]propranololと<sup>3</sup>H]pyrilamineインフラックス輸送系はpH依存性であった。以上から、これらインフラックス輸送系の分子実体が単一ではなく、異なる複数のインフラックストランスポーターであることが示唆された。

Inhibitors	Relative Uptake (%)	
	<sup>3</sup> H]Verapamil	
Control	100	± 3
1 mM Quinidine	17.2	± 0.5*
1 mM Propranolol	9.45	± 0.21*
1 mM Pylamine	31.3	± 1.2*
1 mM Verapamil	19.6	± 1.4*
1 mM Amantadine	45.6	± 1.3*
1 mM Imipramine	9.65	± 0.09*
1 mM Desipramine	7.20	± 0.26*
1 mM Memantine	27.9	± 2.9*
1 mM Timolol	44.5	± 4.5*
1 mM Mecamylamine	41.8	± 1.8*
1 mM Clonidine	63.3	± 3.5*
0.5 mM Brimonidine	65.0	± 3.6*
1 mM Choline	101	± 14
1 mM MPP <sup>+</sup>	105	± 9
1 mM TEA	119	± 5
1 mM L-Carnitine	76.9	± 12.8*
1 mM Cimetidine	94.3	± 3.0
1 mM PAH	133	± 4

表1 <sup>3</sup>H]Verapamil 取り込みを *in vitro* 阻害プロファイル. MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenylpyridinium; TEA, tetraethylammonium; PAH, *p*-aminohippuric acid.

#### (4) *In vitro*阻害プロファイル解析

*In vivo*および*in vitro*解析において示唆された有機カチオン性薬物インフラックス輸送系の基質認識性を明らかとする目的で、*in vitro*輸送阻害解析を実施した (表1)。<sup>3</sup>H]verapamil および<sup>3</sup>H]propranolol、<sup>3</sup>H]pyrilamineインフラックス輸送系はquinidineやpropranolol, pyrilamineなどの有機カチオン性薬物によって有意に阻害された一方、典型的有機カチオン化合物 (tetraethylammonium, cimetidineなど) や有機アニオン化合物 (*p*-aminohippuric acid) によっては阻害されなかった。このことから、inner BRBに存在する有機カチオン性薬物インフラックス輸送系は既知ではなく、未知の

インフラックストランスポーターによって担われていることが示唆された。さらに、これら有機カチオン性薬物インフラックス輸送系は三環系抗うつ薬 (imipramine など) や  $\beta$  受容体遮断薬 (timolol など)、memantine によって阻害された。これら薬物は、脳や網膜などにおける神経保護作用が報告されていることから、inner BRB に存在するこれらインフラックス輸送系を利用することによって、網膜疾患治療薬を効率的に網膜に送達できる可能性が示された。

#### (5) オーフアンインフラックストランスポーターの探索・同定

*In vivo* および *in vitro* 解析の結果、inner BRB において、有機カチオン性薬物インフラックス輸送系の存在が示唆された。さらに、その分子の実体は未知の有機カチオントランスポーター群であると示唆された。そこで、血液組織関門に発現し、verapamil などの有機カチオン性薬物の取り込みに寄与する未知のインフラックストランスポーター分子を同定するため、特異的ホモロジーサーチやハイドロパシー解析を実施するとともに、RT-PCR 法を用いて inner BRB (網膜毛細血管内皮細胞) および outer BRB (網膜色素上皮細胞) における転写産物発現解析を実施した。解析の結果、inner BRB に発現する 15 種のオーファントランスポーター遺伝子の存在が明らかとなった (図 3)。これら全ての完全長 cDNA クローニングを完了し、卵母細胞発現系ベクターならびに培養細胞発現系ベクターの構築を完了した。



図 3 TR-iBRB2 細胞におけるオーファントランスポーター転写産物。+ : 逆転写あり, - : 逆転写なし。

#### 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 4 件)

- ① Kubo Y, Shimizu Y, Kusagawa Y, Akanuma S, Hosoya K. Propranolol transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement of a novel organic cation transporter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 査読有. 2013. *in press*. doi:

10.1002/jps.23535.

- ② Kubo Y, Kusagawa Y, Tachikawa M, Akanuma S, Hosoya K. Involvement of a novel organic cation transporter in verapamil transport across the inner blood retinal barrier. *Pharmaceutical Research*. 査読有. 2013. 30:847-56. doi: 10.1007/s11095-012-0926-y.
- ③ 久保義行, 赤沼伸乙, 細谷健一. 血液網膜関門の機能特性を利用したドラッグデリバリー. *Drug Delivery System*. 査読無. 2012. 27:361-369.
- ④ Kubo Y, Fukui E, Akanuma S, Tachikawa M, Hosoya K. Application of membrane permeability evaluated in *in vitro* analyses to estimate blood-retinal barrier permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 査読有. 2012. 101:2596-605. doi: 10.1002/jps.23171.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 久保義行, 清水芳美, 草川友輔, 赤沼伸乙, 細谷健一. 内側血液網膜関門におけるpropranolol輸送機構解析. 日本薬学会第133年会 (2013年3月27日、横浜).
- ② 久保義行. 疾患治療薬送達に向けた薬物膜輸送システムの解明. 日本薬学会東海支部会特別講演会 (2012年12月14日、名古屋).
- ③ Kubo Y, Fukui E, Akanuma S, Tachikawa M, Hosoya K. Relationship between *in vitro* membrane permeability and *in vivo* blood-retinal barrier (BRB) permeability. 日本薬物動態学会第27年会 (2012年11月21日、東京).
- ④ 草川友輔, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一. 内側血液網膜関門におけるverapamilの輸送特性. 日本薬学会北陸支部第124回例会 (2012年11月18日、富山).
- ⑤ 久保義行, 赤沼伸乙, 立川正憲, 細谷健一. 血液網膜関門薬物輸送における *in vitro*-*in vivo* 相関性. 日本薬剤学会第27年会 (2012年05月26日、神戸).
- ⑥ 福井恵理, 久保義行, 赤沼伸乙, 立川正憲, 細谷健一. *In vitro* 解析法による薬物網膜移行性の評価. 日本薬学会第132年会 (2012年3月31日、札幌).

[図書] (計 1 件)

- ① Kubo Y, Hosoya K. Inner blood-retinal barrier transporters: relevance to diabetic retinopathy. *Ola, MS/' Diabetic Retinopathy'*. 査読有. 2012. InTech (Croatia). open access.

Publication  
(<http://www.intechopen.com/books/diabetic-retinopathy>).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 義行 (KUBO YOSHIYUKI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
講師  
研究者番号 : 20377427

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし