

Evaluation of the blood-brain barrier based on the functional analysis of transporters using newly developed techniques

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tamai, Ikumi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049468

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 International License.



血液脳関門の機能的実体解明に基づいた
薬物中枢移行性評価法の確立

(課題番号 12557229)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 玉井 郁巳

(金沢大学薬学部)

金沢大学附属図書館



8011-05271-3

KAKEN
2001
29

血液脳関門の機能的実体解明に基づいた 薬物中枢移行性評価法の確立

(課題番号 12557229)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 玉井 郁巳

(金沢大学薬学部)

著 者 寄 贈

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

課題番号 12557229

研究課題 血液脳関門の機能的実体解明に基づいた
薬物中枢移行性評価法の確立

研究組織 研究代表者：
玉井郁巳 (金沢大学薬学部 助教授)

研究分担者：
辻 彰 (金沢大学薬学部 教授)
崔 吉道 (金沢大学大学院自然科学研究科 助手)

研究経費	平成 12 年度	4,100 千円
	平成 13 年度	4,400 千円
	計	8,500 千円

はじめに

血液脳関門を境界とした脳内は体循環系とは隔絶された環境を維持しているが、中枢機能発揮・維持に必要な物質の積極的な体循環系からの摂取、生体異物の侵入遮断、及び脳内不要代謝産物などの体循環系中への排除は、全て血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞による厳密な制御下にある。本研究では、中枢機能維持のために、体循環系と脳の間で栄養物質、神経伝達物質、薬物を含む生体異物の物質交換を制御するなどダイナミックインターフェースとして作用する血液脳関門機能の実体解明に基づいた、薬物の中枢移行性制御機構の解析と、*in vitro* 血液脳関門評価系の樹立を試みた。

中枢機能維持のために血液脳関門には栄養物取り込みと異物解毒に働くトランスポーターが備わっている。本研究では栄養物取り込み機構として中性アミノ酸ならびにカルニチン／アセチルカルニチン取り込みに働くトランスポーターの実体解析を行った。中性アミノ酸の中でも比較的分子量が高く脂溶性のロイシンやフェニルアラニン輸送に働くトランスポーターとしてLAT1 およびLAT2 の存在が末梢組織で報告されている。以前より血液脳関門にも同様な機能を有するアミノ酸トランスポーターの存在が示唆されていたが、本研究では両トランスポーター分子が脳毛細血管内皮細胞に備わっていることを明らかにした。さらに、両トランスポーターは4F2hc タンパクとヘテロダイマーを形成して働くことが知られているが、LAT1 およびLAT2 分子と同様に4F2hc も本細胞に発現することが見いだされた。これらトランスポーターはパーキンソン治療薬のL-DOPA輸送にも働くことから、ドラッグデリバリーの観点からも重要なトランスポーターの存在を明らかにできた。

また、アルツハイマー病や慢性疲労症候群においては脳内カルニチン／アセチルカルニチン量の低下が知られており、アセチルカルニチンは脳内でのアセチル基供給によるアルツハイマー病治療薬としての期待もされている。即ちアセチルカルニチンを全身投与後に脳内に移行するがそのメカニズムは不明であった。本研究では研究代表者等が世界に先駆けて分子の実体を明らかにしたカルニチントランスポーターOCTN2 が血液脳関門にも発現し、アセチルカルニチンの血液中から脳内への移行に働くことを明らかにできた。これら生理的物質の脳内移行に働く血液脳関門ト

ランスポーターの実体を機能発現とともに明らかにしたのは世界的にも初めてである。また、本成果は血液脳関門に発現する新たなトランスポーター分子種の同定研究成果であり、ダイナミックインターフェースとしての血液脳関門機能の多様性を示すものである。

一方、脳外への異物排出に働くメカニズムについても新たな知見を得た。キノロン系抗菌薬やH1アンタゴニストの多くは痙攣や眠気などの中枢性副作用を示すことが知られているが、最近開発された同効薬の中にはそのような副作用が非常に少ない誘導体がある。本研究ではそのような薬物については脳移行性が低下しているためと考え、そのメカニズム解析を行った。キノロン系抗菌薬としてグレパフロキサシンを、H1アンタゴニストとしてエバスチンおよびその代謝活性体カレバスチンの脳移行機構を評価した。その結果、グレパフロキサシンについては、比較的脂溶性が高いことから多くの末梢組織への移行性が高いが、中枢移行性は極めて低く、それは血液脳関門に存在し、内皮細胞内から血液中に不要物を排出するP-糖タンパク質の作用に因ることを明らかにした。さらに、実体は不明であるがP-糖タンパク質以外にもDIDS感受性のアニオン交換輸送系の存在が示され、複数の排出型トランスポーターの存在によって脳内移行性が極めて低く保たれることが明らかとなった。

一方、H1アンタゴニストについては、エバスチンも含め多くの誘導体はカチオン型であり、その場合には有機カチオントランスポーターによって脳内移行することが示された。しかし、エバスチンの場合は経口投与後速やかに両性イオン型のカレバスチンに代謝されるため、脳内取り込みに働くトランスポーターへの親和性が極めて低くなることがわかった。さらに、グレパフロキサシンの場合と同様に、P-糖タンパク質がエバスチンならびにカレバスチンとも脳内から汲み出していることも明らかになった。このように、取り込み活性の低下と排出輸送系の存在によりエバスチンは中枢性副作用の小さなH1アンタゴニストとして位置づけられるものと考えられた。

一方、血液脳関門は内皮細胞間の密着結合により物理的バリアーとして働くが、そのin vitro再構築系の確立は極めて難しい。そのため適切な脳移行評価系がなく、

脳移行の程度を迅速に評価できる *in vitro* 実験系の確立が待たれている。本研究では、脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの共培養による、血液脳関門評価系の樹立も試みた。即ち、多量の内皮細胞の入手が可能なブタ脳より脳毛細血管内皮初代培養細胞を得ると同時に、ラット脳よりアストロサイトを調製し、多孔性フィルターを介して両細胞を共培養した。その結果、上述の P-糖タンパク質やモノカルボン酸輸送活性の増大が見られると同時に、細胞間密着結合性の改善も見られた。従って、従来用いられてきた内皮細胞の単培養系に比べその血液脳関門機能評価に優れていることが示されたが、密着結合性は元来の血液脳関門に比べ不十分であり、さらなる改良の必要性が考えられた。

以上、本研究では血液脳関門機能を、そこに備わる新たなトランスポーターの分子の実体の同定と機能解析により明らかにすると同時に、新たな血液脳関門機能評価系の樹立を試みた。これら研究成果はダイナミックインターフェースとしての血液脳関門機能の理解に極めて有用な情報となるものである。今後、評価系の改善を行うと同時に、本組織に備わるトランスポーター分子のさらなる同定を行うことにより、血液脳関門機能の観点から中枢機能維持機構を解明していく必要がある。

本科学研究費によって上述の研究を展開できたことに感謝申し上げます。また、以上の成果を、発表を行った学術論文・学会発表を用いて以下に示した。

平成 14 年 3 月
金沢大学薬学部
助教授
玉井郁巳

研究発表

学会誌（総説を含む）

- 1) Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier of rats using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies.
Kido, Y., Tamai, I., Okamoto, M., Suzuki, F. and Tsuji, A.,
Pharm. Res., **17**: 55-62 (2000).
- 2) Blood-brain barrier transport of H1-antagonist ebastine and its metabolite carebastine.
Tamai, I., Kido, Y., Yamashita, J., Sai, Y., and Tsuji, A.
J. Drug Targeting, **8**: 383-393 (2000).
- 3) Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain owing to multiple efflux transporters at the blood-brain barrier.
Tamai, I., Yamashita, J., Kido, Y., Ohnari, A., Sai, Y., Shima, Y., Naruhashi, K., Koizumi, S., Tsuji, A.,
J. Pharmacol. Exp. Ther., **295**: 146-152 (2000).
- 4) Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier.
Tamai, I. and Tsuji, A.
J. Pharm. Sci., **89**, 1371-1388 (2000).
- 5) 血液脳関門の排出系、
木戸康人、崔 吉道、玉井郁巳、辻 彰、
生体の科学、**52**, 571-576 (2001).
- 6) 神経疾患の薬物療法—現状と将来— 血液脳関門と神経疾患治療薬、
玉井郁巳、辻 彰、
Clin. Neurosci., **19**, 21-23 (2001) .
- 7) Functional Relevance of Carnitine Transporter OCTN2 to Brain Distribution of L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine across the Blood-Brain Barrier
Kido, Y., Tamai, I., Ohnari, A., Sai, Y., Kagami, T., Nezu, J., Nikaido, H., Hashimoto, N., Asano, M., and Tsuji, A.
J. Neurochem., **79**:959-969 (2001).
- 8) Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporter LAT1 at the blood-brain barrier using rat cultured cells.
Kido, Y., Tamai, I., Uchino, H., Suzuki, F., Sai, Y., and Tsuji, A.
J. Pharm. Pharmacol. **53**, 497-503 (2001).
- 9) Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes.
Kido, Y., Tamai, I., Nakanishi, T., Kagami, T., Hirose, I., Sai, Y., and Tsuji, A.
Drug Metabol. Pharmacokin., **17**: 34-41 (2002).

学会・研究会発表

招待講演

- 1) 辻 彰、玉井郁巳、第 27 回日本トキシコロジー学会、“血液脳関門トランスポーターと中枢毒性” 横浜、2000 年 6 月。
- 2) 玉井郁巳、辻 彰、第 48 回日本化学療法学会西日本支部総会シンポジウム“排出タンパク質による薬剤耐性”、京都、2000 年 12 月。
- 3) 玉井郁巳、辻 彰、第 74 回日本薬理学会年会シンポジウム、血液脳関門における輸送機構と脳へのドラッグデリバリー、“血液脳関門排出輸送系による薬物の中枢性副作用回避”、横浜、2001 年 3 月 21-23 日。
- 4) 玉井 郁巳、辻 彰、トランスポーター研究によるドラッグデリバリー戦略の新展開、日本農芸化学会、京都、2001 年 3 月 24-27 日。
- 5) 玉井郁巳、日本薬学会第 121 年会シンポジウム、薬物輸送・排泄の分子機構、“吸収・排泄型トランスポーター群の分子認識・輸送の多様性と遺伝子多型”、札幌、2001 年 3 月 28-30 日。
- 6) 玉井郁巳、辻 彰、第 106 回日本解剖学会総会シンポジウム、膜輸送タンパク質から脳機能を探る、“血液脳関門における薬物トランスポーター” 高知県南国市、2001 年 4 月 2-4 日。
- 7) 玉井郁巳、福井県立大学大学院特別講義、“薬物動態とトランスポーター”、福井、2001 年 4 月 26 日。
- 8) 玉井郁巳、ドラッグフォーラムオオサカ、“薬物動態とトランスポーター”、2001 年 6 月 20 日、大阪。
- 9) I. Tamai, P-Glycoprotein-mediated interaction between amiodarone and its CPY3A4-metabolite in intestine, 第 19 回生物薬剤学研究会, 東京, 2001 年 6 月 8-9 日
- 10) 玉井郁巳、日本薬剤学会第 26 回製剤セミナー、“ペプチドトランスポーターを用いた薬物デリバリー”、木更津、2001 年 7 月 20 日。
- 11) 玉井郁巳、安全性評価研究会「奈川フォーラム」、“トランスポーターの生理機能と薬物動態”、奈川（長野県）、2001 年 9 月 1 日。

一般発表

- 1) Ohnari, A., Tamai, I., Kido, Y., Uchino, H., Sai, Y., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Expression and functional analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN family at the blood-brain barrier. The Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, San Francisco, USA, April, 16-20, 2000.
- 2) 大成亜希、木戸康人、加々美徹、崔 吉道、二階堂浩子、橋本憲佳、浅野雅秀、玉井郁巳、辻 彰、血液脳関門におけるカルニチン／有機カチオントランスポーターOCTN2の機能発現、第15回日本薬物動態学会年会、2000、10、福岡。
- 3) 木戸 康人、加々美徹、廣澤伊織、大成亜希、崔 吉道、玉井郁巳、辻 彰、脳毛細血管内皮細胞とアストロサイト共培養系を用いた血液脳関門輸送解析、第120年会日本薬学会、2001年3月28-30日、札幌。
- 4) 稲野彰洋、崔 吉道、二階堂浩子、橋本憲佳、浅野雅秀、玉井郁巳、辻 彰、マイクロダイアリシス法を用いた OCTN2 トランスポーターの血液脳関門にいける機能発現評価、第16回日本薬物動態学会、2001年10月17-19日、神戸。
- 5) 広澤伊織、木戸康人、崔 吉道、根津淳一、若山友彦、玉井郁巳、辻 彰、血液精巢関門における OCTN トランスポーターの発現とカルニチン輸送、日本薬剤学会第17年会、2002年3月28-31日、静岡。