

Ⅲ. 「飲む目薬」の開発：血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の薬物認識機構を応用したドラッグデリバリーシステム

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 教授 細谷 健一

【各班のまとめ】

背景・目的

加齢や生活習慣が危険因子である眼疾患として、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、緑内障、及び網膜色素変性症が挙げられる。急速な高齢化が進んでいる現代において、これら疾患の治療法開発は急務である。*In vitro* 薬理試験によって、これら眼疾患に対する薬理標的が徐々に提案されている。その一方で、現在加齢黄斑変性症に適応されている pegaptanib などは硝子体内に投与される薬物であり、末梢投与にて効果を示す薬物の開発は進んでいない。眼疾患の効果的な治療と罹患者の quality of life を共に満たすために最も解決すべき課題は「循環血液から網膜への物質移行を制限する血液網膜関門 (BRB) を突破するための戦略構築」である。この戦略構築によって、経口もしくは静脈内薬物投与によって眼疾患を内科的に治療することが可能となる。

本課題は、課題申請当初に見いだされた「BRB に存在する verapamil を選択的に認識する輸送機構」について、輸送分子の特徴と実体を解明し、さらに薬物認識プロファイルに基づく薬物誘導体化を実施による網膜移行性の向上、すなわち本機構を応用した網膜へのドラッグデリバリー法確立を達成目標としている。BRB には循環血液中に存在する物質を選択的に認識し、網膜へ促進的に輸送させる分子機構の存在が示されてきている¹⁾。我々は脳と網膜への物質移行性と化合物の脂溶性との相関を *in vivo* ラット総頸動脈単回投与法 (retinal uptake index (RUI)/brain uptake index (BUI) 法) にて検討した結果、有機カチオン性薬物である verapamil は、その脂溶性から予想される移行性の指標値と比較し、高い値を示す一方で、低い脳移行性を示した²⁾。本解析結果から、「**BRB は verapamil を選択的に認識する輸送機構**」を備えており、本機構に認識されるような薬物を網膜へ効率的に薬物を送達させることが可能と考えられた。この verapamil 認識型の血液網膜関門 novel カチオン輸送担体の薬物認識・輸送機構を明らかにするとともに、本機構を網膜疾患治療薬送達へと展開させる基盤を築くことが本課題における研究目的である。

研究成果の概要及び結論

本課題 3 年目において、本薬物輸送機構について網膜疾患治療への展開を視野に、カチオン性薬

物で網膜神経保護作用を有する薬物の透過性評価とそれを担う分子実体特定に着手した。また、一部の化合物について、BRBを介し網膜から循環血液中へ排出輸送されることが明らかにされていることから、BRBにおける有機カチオン性化合物排出輸送機構の有無を評価した。さらに、BRB積極的透過パスポート構造候補となる官能基導入の足掛かりとなるハロゲン置換基導入について、位置選択的ヨード化反応の条件検討を実施し、最適な反応条件の設定を完了させると共に、反応の官能基導入にあたる有用性を検証した。

細谷班は有機カチオン性 α_2 -agonistであるclonidineの循環血液中から網膜へのBRBを介した輸送機構を*in vivo*及び*in vitro*実験手法にて評価した。これまでの検討から、BRBを介した網膜へのカチオン性薬物移行について、verapamilとpropranololはそれぞれ異なるinner BRB輸送機構に認識され、輸送されていることが明らかとなった。Clonidineは高血圧薬であるが、網膜視神経障害を抑制することが報告されている。緑内障の進行には神経障害が関わることから、clonidineのBRB透過メカニズム解明は、効率的なclonidineの網膜への送達、そして緑内障治療法確立へ繋がると期待される。循環血液から網膜へのBRB透過を*in vivo*及び*in vitro*実験系を用いて評価したところ、(i)循環血液から網膜へのclonidine輸送はBRB輸送機構介在型であること、(ii)Inner BRBにおけるclonidine輸送は、これまで見出されたverapamil及びpropranolol輸送機構と類似性を有している、の2点が明らかとなった。現在、clonidineの緑内障治療に向けての投与方法・ドラッグデザインを視野に、BRBにおけるclonidine輸送を制御するため、分子実体特定とその制御機構解明に取り組んでいる。

赤沼班は抗炎症薬の網膜への送達を目標に計画していたが、カチオン性官能基を有する抗炎症薬はBRBに存在するnovelカチオン輸送担体の輸送基質となる可能性が低いと考えられた。有機カチオン性炎症関連物質としてhistamineなどが知られており、histamineは糖尿病モデルにて網膜内合成酵素活性上昇が報告されている。そこで、「カチオン性炎症関連物質のBRBカチオン輸送担体を介し、網膜から促進的に排出させることで網膜内炎症応答を低下させる」というBRBカチオン輸送担体を利用した間接的抗炎症作用が望めるかを検証した。初めにhistamineを基質とする輸送担体の機能評価プローブ化合物である1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)のBRB透過を解析したところ、MPP⁺はBRBを介し排出輸送されることが示され、その過程への有機カチオン輸送担体OCT3・PMATの関与が示唆された。Histamineはこれら輸送担体の基質と報告されている。そこで、histamineのBRB排出輸送を評価したところ、BRB非透過性化合物と比較し1.3倍消失速度定数が高値であったものの、有意ではなかった。従って、BRBには有機カチオン化合物の排出輸送機構を備えているものの、内因性炎症関連化合物の網膜からのクリアランスには大きく寄与しないことが示唆された。ただし、本研究にて初めて「BRBはカチオン性化合物排出機構を備えている」ことが実証され、この排出機構に認識させないような網膜疾患適用薬が最適なシーズであると考えられる。

久保班は昨年度から引き続き、網膜選択的薬物送達に繋がるnovelカチオン輸送担体の分子実体特

定に向けた機能解析を実施すると共に、inner BRB において発現が示された novel カチオン輸送担体候補分子に対する特異的ポリクローナル作成に着手した。SLC family について、inner BRB 及び outer BRB において発現する分子の発現細胞を構築し、各種プローブ薬物の輸送解析を実施したところ、2種類の分子について、非発現細胞と比較しカチオン性薬物である clonidine の輸送変化が示され、これら分子が BRB において有機カチオン性薬物輸送に寄与する可能性が示唆された。また、inner BRB において発現が示された SLC ファミリーでカチオン性化合物を輸送する SLC16A に属する分子2種類について、詳細な網膜における発現局在パターンの解明と選択的な網膜への薬物送達ツールへの展開を視野に、ポリクローナル抗体作成を試みた。経過として、エピトープタンパク質発現系を構築し、モルモット能動免疫を実施するにあたり、十分量のものが得られた。現在、本タンパク質を用い、モルモットに対し、免疫を行っている。

松谷班は、「イミダゾ [2,1-b] チアゾール」を有効なパスポート構造として設定し、本骨格の効率的導入を念頭に、導入反応の足掛かりとなるイミダゾ [2,1-b] チアゾール骨格に対する位置選択的ヨウ素化反応について精査し、本法を確立した (3 種類, ヨード体の最大収率89%)。また本ヨード体 3種類を用いた Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応について、単純有機ホウ素化合物 (Ar-B (OH)₂) をモデル化合物として検討を行ったところ、カップリング体を40-70%の収率で得ることに成功した。今後、本反応を応用することで網膜疾患治療薬の送達向上に繋がるかを、機能的解析にて検証していく予定である。

【参考文献】

- 1) Hosoya K, Tomi M, Tachikawa M. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Deliv.* 8, 1571-87 (2011)
- 2) Hosoya K, Yamamoto A, Akanuma S, Tachikawa M. Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. *Pharm. Res.* 27, 2715-24 (2010)

Ⅲ－１ 血液網膜関門 novel カチオン輸送担体特性に基づいた 投与法の確立とドラッグデザイン

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 教授 細谷 健一

【研究の背景と目的】

本研究計画の最終到達目標は verapamil を認識する novel カチオン輸送機構の特徴を応用し、緑内障などの網膜疾患に対する治療薬を送達することである。これまでの研究成果から、有機カチオン性薬物である verapamil と propranolol に関して、血液網膜関門（BRB）を介した循環血液中から網膜への移行には inner BRB に存在する分子実体未知（novel）カチオン輸送担体の関与が示唆された^{1,2)}。加えて、ラット inner BRB モデルである TR-iBRB2 細胞を用い、verapamil や propranolol 輸送阻害を指標に各種化合物の認識性を評価したところ、神経保護作用を有する有機カチオン性薬物が本トランスポーターに認識される可能性が示唆された。緑内障時には網膜神経細胞死が認められるため、神経保護作用の網膜への効率的送達法を確立することは、本疾患に対する薬物療法を実施するにあたり、極めて重要である。

これら神経保護薬の中で、inner BRB 輸送機構解明候補として、高血圧治療薬である clonidine に着目した。Clonidine は、腹腔内投与によって光障害に対し保護作用を示すことや、網膜視神経障害を抑制することが報告されており、網膜神経保護の上で有望な薬と考えられる。一方、上述のように循環器系疾患に clonidine は現在適応されている。そのため、網膜疾患に clonidine を適用させるにあたって、「網膜へ選択的に移行させる」方法の確立が必須となる。この網膜への選択的移行を実現する上で、inner BRB に存在する novel カチオン輸送担体は網膜移行過程における重要なツールであると考えられる。

本研究では、BRB の clonidine 透過特性を詳細に解明することを目的とした。*In vivo* BRB 透過は総頸動脈単回投与法（retinal uptake index 法）にて評価し、加えて inner BRB における clonidine 輸送特性、特に novel カチオン輸送担体の clonidine 輸送への関与は、TR-iBRB2 細胞を用いて評価した。

【実験手法】

(A) Retinal uptake index 法

ラット（雄性、Wistar 系統、6 週齢）にペントバルビタールを腹腔内投与した（50 mg/kg）。トレーサー溶液（1-5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ [^3H]clonidine and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ [^{14}C]n-butanol in Ringer-HEPES buffer (pH

7.4)) を総頸動脈へ瞬時に200 μ L 投与し、15秒後断頭し、速やかに網膜及び脳を採取した。採取した組織は2 N NaOH にて可溶化後、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、液体シンチレーションカウンター (AccuFLEX LSC-7400, Aloka) にて放射活性を測定した。Retinal uptake index (RUI, %) は Eq. 1 から算出した。

$$\text{RUI or BUI (\%)} = \frac{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in the retina or brain}}{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in injectate}} \times 100 \quad \dots [\text{Eq. 1}]$$

(B) TR-iBRB2 細胞の培養

In vitro inner BRB モデル細胞として、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2) 細胞を用いた。TR-iBRB2 細胞は立ち上げてから少なくとも2回継代し、細胞形態および増殖速度に大きな変化がないことを確認後、実験に用いた。

(C) TR-iBRB2 細胞における ^3H clonidine 輸送解析

Collagen I-coated 24-well plate に TR-iBRB2 細胞を 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、33°Cの加湿された5% CO₂/95% air インキュベーターにて48時間培養した。細胞が confluent 状態になっていることを確認し、取り込み解析に用いた。

トレーサー溶液は、 ^3H clonidine (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を0.5 μ Ci/mL となるように extracellular fluid (ECF) buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM D-glucose, 1.4 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) に溶解させたものを用いた。細胞を培養させた24-well plate を37°Cに維持し、培養用 medium を除去した。ECF buffer (37°C) にて細胞を3回洗浄し、トレーサー溶液を200 μ L 加えた。指定時間経過後、トレーサー溶液を除き、氷冷 ECF buffer で3回細胞を洗浄した。NaOH 水溶液 (1 N) を400 μ L 加え、室温で12時間処理することで細胞を可溶化させ、1 N HCl を400 μ L 加え中和させた。この中和液の一部を Monofluor (National Diagnostics Inc.) へ移し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。また、bovine serum albumin を標準とし、DC Protein assay kit (BIO-RAD) を用い、可溶化液中のタンパク質量を測定した。

細胞内への ^3H 薬物取り込み輸送は cell/medium ratio で表した (Eq. 2)。

$$\text{Cell/medium ratio (\mu L/mg protein)} = \frac{[^3\text{H}] \text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}] \text{Compound concentration in the medium (dpm/\mu L)}} \quad \dots [\text{Eq. 2}]$$

^3H 薬物の TR-iBRB2 細胞への輸送に対する最大取り込み速度 (V_{max} , nmol/(min•mg protein)) 及び Michaelis-Menten 定数 (K_m , μ M) は、基質濃度 ($[S]$, μ M) に対する薬物輸送速度 (v) のプロットから、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用いて解析した。

【結果・考察】

A. *In vivo* BRB を介した³H]clonidine 網膜移行特性

In vivo 環境下における³H]clonidine の BRB 透過様式を解析した。³H]Clonidine の RUI 値は非標識 clonidine や pyrilamine, propranolol にて、40 mM 共存下、薬物非共存条件下（コントロール）と比較し50%以上低下した。また、verapamil (3 mM) や nicotine (40 mM) の共存にて、³H]clonidine の RUI 値はコントロールと比較し約30%低下した。一方、既知有機カチオン輸送担体の基質である tetraethylammonium (TEA, 40 mM) や有機アニオン輸送担体基質である *p*-aminohippurate (PAH, 40 mM) や probenecid (40 mM) にて、³H]clonidine の RUI 値は変化しなかった。以上の点から、clonidine は *in vivo* BRB を介し循環血液中から網膜へ輸送されること、そしてその過程には既知有機カチオン輸送担体ではなく、verapamil や pyrilamine, propranolol 感受性の輸送機構が関与することが示唆された。

B. *In vitro* inner BRB モデル細胞における³H]clonidine 輸送特性

TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送は、時間依存性、温度依存性および濃度依存性 ($K_m = 286 \mu\text{M}$) を示した。また、その輸送活性は細胞外 pH と正の相関、及び細胞内 pH と負の相関を示したことから、inner BRB における clonidine 輸送機構は H^+ との対向輸送型であることが示唆された。さらに、その輸送は取り込み実験 buffer 中 Na^+ の choline 置換や K^+ 置換条件下にて変化しなかったことから、本輸送機構は「 Na^+ 非依存性」および「膜電位非依存性」であることが示唆された。以上の解析結果を総合すると、inner BRB における clonidine 輸送は担体介在型であり、その機構は Na^+ 及び膜電位非依存性の H^+ /organic cation antiporter であることが示唆された。

これまでに、 H^+ /organic cation antiporter の特性を示す輸送担体は BRB に存在する novel カチオン輸送機構以外に、一部の既報有機カチオン輸送担体もまた同様の性質を示すことが知られている。そこで、inner BRB における clonidine 輸送に寄与する分子を特定するため、各種化合物による阻害効果を検証した。その結果、propranolol や pyrilamine, verapamil などの有機カチオン性薬物群で阻害される一方、既報有機カチオン輸送担体基質である、TEA や 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+), choline, L-carnitine, cimetidine, serotonin, putrescine にて阻害されなかった。さらに、有機アニオン輸送担体基質である PAH や diclofenac, acetylsalicylic acid にて阻害されなかった。これらの特性は、TR-iBRB2 細胞への verapamil, pyrilamine, 及び propranolol 輸送実験時にて得られた結果と類似しており、TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送機構について、verapamil や pyrilamine, propranolol の輸送機構との同一性が考えられた。この同一性を、TR-iBRB2 細胞への clonidine 輸送に対する verapamil, pyrilamine, 及び propranolol による阻害様式の解析にて検証を試みたところ、verapamil は、TR-iBRB2細胞における clonidine 輸送に対し、競合阻害の様式 ($K_i = 90 \mu\text{M}$) を示した。一方、この clonidine 輸送に対し、

pyrilamine と propranolol は競合阻害しなかった。以上の結果から、clonidine と verapamil の inner BRB における輸送機構は同一である可能性が示された。

【結論および展望】

本研究結果から、網膜神経保護が期待される clonidine について、inner BRB に存在する verapamil 認識型有機カチオン輸送担体に認識され、網膜へ促進的に輸送されることが示唆された。ただし、網膜以外の組織に対しても移行性を示すことを予備的検証結果から明らかにしている。さらなる網膜への移行性向上に取り組み、循環器薬理作用を示さず、かつ網膜に対し神経保護効果を示すような、安全な薬物の開発の上での本輸送機構の重要性を実証する予定である。

【参考文献】

- 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. *J. Pharm. Sci.*, **102**, 3332-42 (2013)
- 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. *Pharm. Res.* **30**, 847-56 (2013)

Ⅲ－２ 抗炎症薬の循環血液から網膜への novel カチオン輸送担体を利用した効率的な送達法

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 助教 赤 沼 伸 乙

【研究の背景と目的】

本研究では、失明を伴う眼疾患の悪化に関係する炎症応答を抑制するための薬物を網膜へ送達する方法論構築を目的としている。第2年目の解析にて、「novel カチオン輸送担体は一般的な抗炎症薬を認識しない」ことが明らかとなった。そこで、今年度は「網膜内にて、神経毒性・炎症を示すような内因性化合物の効率的なクリアランスを達成するため、BRB を応用する」基礎的検証を実施した。

蓄積することで神経障害など、網膜障害を誘発する有機カチオン化合物として、外因性化合物 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) や内因性化合物 histamine が挙げられる。これらは既報の有機カチオン輸送担体 (OCT や OCTN, MATE, PMAT) の基質であることが報告されている。近年、BRB は網膜からの化合物クリアランスに寄与すること¹⁾、そして inner BRB には少なくとも OCTN2 の発現・機能が報告されていることから²⁾、BRB は MPP⁺ や histamine の網膜内動態に関与する可能性が高い。そこで、第3年目は BRB における MPP⁺ 及び histamine の輸送特性を解明することを目的とし、特に既知有機カチオン輸送担体群の寄与について詳細に評価した。

【実験手法】

(A) Retinal uptake index 法

ラット (雄性, Wistar 系統, 6 週齢) にペントバルビタールを腹腔内投与した (50 mg/kg)。トレーサー溶液 (1-5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ [³H]MPP⁺ and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{injectate}$ [¹⁴C]*n*-butanol in Ringer-HEPES buffer (pH 7.4)) を総頸動脈へ瞬時に 200 μL 投与し、15 秒後断頭し、速やかに網膜及び脳を採取した。採取した組織は 2 N NaOH にて可溶化後、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。Retinal uptake index (RUI, %) は Eq. 1 から算出した。

$$\text{RUI or BUI (\%)} = \frac{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in the retina or brain}}{[^3\text{H}]/[^{14}\text{C}] \text{ radioactivity ratio in injectate}} \times 100 \quad \dots [\text{Eq. 1}]$$

(B) *In vivo* microdialysis 法³⁾

Microdialysis probe (TEP-50; Eicom) の入り口側に Ringer-HEPES buffer で満たしたディスポーザブ

ルシリンジ (Terumo, Kyoto) を polyethylene tube (SP19; ID, 0.35 mm; OD, 1.05 mm; Natsume) を介して接続し, probe の出口側は20 cm の polyethylene tube (SP10; ID, 0.28 mm; OD, 0.61 mm; Natsume) を装着した。シリンジを Infusion pump model 11 (Harvard apparatus, Holyston) にセットし, 流速 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ であらかじめ灌流をスタートさせ, probe 及び polyethylene tube 内部を buffer で満たした。被験化合物 ($[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 及び $[^3\text{H}]\text{histamine}$) と BRB 非透過性 bulk flow マーカー ($[^{14}\text{C}]\text{D-mannitol}$) を $[^3\text{H}]:[^{14}\text{C}] = 10 (2 \mu\text{Ci}) : 1 (0.2 \mu\text{Ci})$ となるように溶解した。8 週齢ラットを pentobarbital sodium 腹腔内投与 (50 mg/kg) にて麻酔し, ラット脳定位固定装置 (SR-5R; Narishige, Tokyo, Japan) に固定した。眼瞼閉鎖反射を消失させるため xylocaine を眼部周囲に点滴することで局部麻酔を施し, 上瞼を開かせた状態で固定した。角膜と強膜の境目から約 1 mm 強膜側に22Gの針で穴を開け, 眼球から流出する眼房水を十分に拭き取った。先ほど開けた穴から, 被験薬物溶液をマイクロシリンジ (Hamilton, Nevada) を用い, 強膜から約 3 mm 深い位置に 1 μL 投与した。投与30秒後にマイクロシリンジをゆっくりと抜き取り, 素早く microdialysis probe の先端を強膜から約 3 mm の深さまで挿入し, 外科用アロンアルファ (Daiichi-sankyo) にて接着させた。Probe 挿入時を 0 分とし, 指定時間間隔にて180分間, 透析液のサンプリングを実施した。サンプリング終了後, 投与液及び重量を測定した透析液に monofluor を加え, よく攪拌した後, 液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; ALOKA, Tokyo, Japan) にて ^3H 及び ^{14}C の放射活性を測定した。得られた放射活性と透析液重量の商から, 透析液中化合物濃度 (Cd; dpm/mL) を算出し, 投与量 (Dose; dpm) にて規格化した透析液中濃度 (Cp; % of dose/mL) は以下の [Eq. 2] から算出した。

$$C_p (\% \text{ of dose/mL}) = \frac{Cd (\text{dpm/mL})}{\text{Dose (dpm)}} \times 100 \quad [\text{Eq. 2}]$$

一般に C_p の経時的变化は線形 2-コンパートメントモデルで表現され, その消失 (端末) 相における消失速度定数が硝子体/網膜からの消失を評価にあたり適していることが報告されている。そこで, 各タイムポイントにおける C_p のデータについて, それぞれの経過時間 (t ; min) に対し C_p をプロットすると共に, 以下の Eq. (4) にフィットさせた。

$$C_p = C_1 \times \exp(\lambda_1 \times t) + C_2 \times \exp(\lambda_2 \times t) \quad [\text{Eq. 3}]$$

ここで, C_1 と C_2 はそれぞれ分布相と消失相における初期濃度 (% of dose/mL) を, λ_1 と λ_2 はそれぞれ分布相と消失相における消失速度定数 (min^{-1}) を表している。

(C) TR-iBRB2 細胞及び初代培養ラット RPE 細胞を用いたMPP⁺取り込み解析

TR-iBRB2 細胞及び初代培養網膜色素上皮 (RPE) 細胞を24-well plate に播種し⁴⁾, well 内にて confluent に達した段階で取り込み実験に供した。トレーサー溶液は, $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ (PerkinElmer Life &

Analytical Sciences) を0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ となるように extracellular fluid (ECF) buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM D-glucose, 1.4 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) に溶解させたものを用いた。細胞を培養させた24-well plate を37°Cに維持し、培養用 medium を除去した。ECF buffer (37°C) にて細胞を3回洗浄し、トレーサー溶液を200 μL 加えた。指定時間経過後、トレーサー溶液を除き、氷冷 ECF buffer で3回細胞を洗浄した。NaOH 水溶液 (1 N) を400 μL 加え、室温で12時間処理することで細胞を可溶化させ、1 N HCl を400 μL 加え中和させた。この中和液の一部を Monofluor (National Diagnostics Inc.) へ移し、液体シンチレーションカウンター (LSC-5200; Aloka) にて放射活性を測定した。また、bovine serum albumin を標準とし、DC Protein assay kit (BIO-RAD) を用い、可溶化液中のタンパク質量を測定した。

細胞内への ^3H 薬物取り込み輸送は cell/medium ratio で表した (Eq. 4)。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) = \frac{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the medium (dpm}/\mu\text{L)}} \quad \dots[\text{Eq. 4}]$$

^3H 化合物の細胞への輸送に対する最大取り込み速度 (V_{max} , nmol/(min \cdot mg protein)) 及び Michaelis-Menten 定数 (K_m , μM) は、基質濃度 ($[\text{S}]$, μM) に対する薬物輸送速度 (v) のプロットから、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用いて解析した。

【結果・考察】

A. *In vivo* BRB を介した MPP^+ 及び histamine 輸送特性

既報の有機カチオン輸送担体が BRB において発現し、循環血液から網膜への化合物移行に関与するかを検証するため、retinal uptake index (RUI) 法を実施した。 ^3H] MPP^+ 単独投与時の RUI 値は11.9 \pm 2.4%であった。非標識50 mM MPP^+ 共存下における ^3H] MPP^+ の RUI 値は16.5 \pm 2.8%であり、 ^3H] MPP^+ 単独投与時の RUI 値と比較し有意な差は無かった。本結果から、循環血液からBRBを介した網膜への輸送に輸送担体は寄与しないことが示唆された。

網膜から循環血液中への排出過程に BRB が関与するかを検証するため、microdialysis 法を実施した。初めに MPP^+ の硝子体/網膜からの消失への BRB の関与をmicrodialysis 法にて評価したところ、 ^3H] MPP^+ 、及び BRB 難透過であり bulk flow による消失マーカーの ^{14}C] D-mannitol の透析液中濃度推移は、見かけ上二相性を示し、その末端相における各化合物の傾きに異なる傾向が示された。末端相での傾き、即ち消失速度定数 (λ_2) を算出した結果、 ^3H] MPP^+ の λ_2 値は $16.3 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、 ^{14}C] D-mannitol の λ_2 値 ($10.5 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) と比較し1.6倍有意に高値であった。 MPP^+ と D-mannitol の λ_2 値についての差は、BRB を介した消失機構の存在を示唆する。一方、 ^3H] histamine の λ_2 値は $12.5 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、 ^{14}C] D-mannitol の λ_2 値 ($9.84 \times 10^{-3} \pm 2.90 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) と比較し、1.3倍高値ではあったものの、有意ではなかった。従って、 MPP^+ の方が histamine と比較し

BRB を介した排出輸送の活性が高いと判断された。言い換えれば、histamine の網膜内からのクリアランスについて、BRB を介した排出過程の寄与は小さいと判断される。

B. *In vitro* BRB モデル細胞における MPP⁺ 輸送特性

炎症物質 histamine の BRB を介した促進的排出輸送は観察されなかった。しかし、網膜への有機カチオン性薬物送達を実現する上で、「BRB を介し排出輸送される化合物の特徴」を明らかにすることは高い重要性を有すると判断された。そこで、MPP⁺ をプローブ化合物として、inner BRB 及び outer BRB の *in vitro* モデル細胞を用い、両関門において MPP⁺ 輸送に寄与する分子実体解明に着手した。

Inner BRB モデルとして用いた TR-iBRB2 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは時間依存性や濃度依存性 ($K_m = 59 \mu\text{M}$) を示したことから、inner BRB における担体介在型 MPP⁺ 輸送機構の存在が示唆された。この MPP⁺ 輸送は、既報有機カチオン輸送担体を広く認識する阻害剤である amantadine 及び quinidine によってそれぞれ65%及び35%有意に阻害された。また、その取り込みは、OCT と PMAT を共に阻害する dopamine 及び decynium-22によってそれぞれ50%及び44%阻害され、OCT 及び PMAT の基質と報告されている nicotine 共存にて42%有意に阻害された。さらに、OCT と PMAT に加え MATE1 を阻害する serotonin は、初代培養ラット RPE 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みを40%有意に阻害した。しかし、その [³H]MPP⁺ 取り込みを TEA は、OCT1-2 と OCTN1-2, MATE1 を強力に阻害する 0.1 mM, 1 mM 及び 2 mM 共存条件下にて、15-30%阻害したものの、その阻害は統計学的有意ではなかった。また、histamine, corticosterone 及び estradiol は、OCT1-3 を阻害する条件下にて、その [³H]MPP⁺ 取り込みを阻害しなかった。さらに、OCT1-2 を阻害する choline や、OCTN1-2 を阻害する L-carnitine, MATE1 を阻害する cimetidine は、 [³H]MPP⁺ 取り込みを阻害しなかった。有機アニオン輸送担体典型的基質である PAH 共存によっても、その取り込みは変化しなかった。OCT と OCTN の基質・阻害剤については、TR-iBRB2 細胞への MPP⁺ 輸送に対する阻害・非阻害のプロファイルが混在しており、MATE 阻害剤では阻害されていないことから、OCT と OCTN, MATE が本 MPP⁺ 輸送に関与する可能性は低いと判断される。この消去法的考えに基づくと、TR-iBRB2 細胞における MPP⁺ 取り込みに PMAT が関与すると考えられた。

Outer BRB モデルとして用いた初代培養ラット RPE 細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは時間依存性や濃度依存性 ($K_m = 64 \mu\text{M}$) を示したことから、outer BRB における担体介在型 MPP⁺ 輸送機構の存在が示唆された。初代培養ラット RPE 細胞への MPP⁺ 輸送を担う分子の特定を目的に、各種有機カチオン輸送担体の基質・阻害剤共存による輸送阻害効果を検証した。本細胞への [³H]MPP⁺ 取り込みは非標識 MPP⁺ の共存にて78%阻害され、既報有機カチオン輸送担体を広く認識する阻害剤である amantadine 及び quinidine によってそれぞれ65%及び35%有意に阻害された。また、その取り込みは、OCT と PMAT を共に阻害する dopamine 及び decynium-22によってそれぞれ50%及び44%阻害され、

OCT 及び PMAT の基質と報告されている nicotine 共存にて42%有意に阻害された。さらに、OCT と PMAT に加え MATE1 を阻害する serotonin は、初代培養ラット RPE 細胞への $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを40%有意に阻害した。しかし、その $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを TEA は、OCT1-2 と OCTN1-2, MATE1 を強力に阻害する0.1 mM, 1 mM 及び 2 mM 共存条件下にて、15-30%阻害したものの、その阻害は統計学的有意ではなかった。また、histamine, corticosterone 及び estradiol は、OCT1-3 を阻害する条件下にて、その $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを阻害しなかった。さらに、OCT1-2を阻害する choline や、OCTN1-2 を阻害する L-carnitine, MATE1 を阻害する cimetidine は、 $[^3\text{H}]\text{MPP}^+$ 取り込みを阻害しなかった。有機アニオン輸送担体典型的基質である PAH 共存によっても、その取り込みは変化しなかった。本阻害実験の結果は以下の3点にまとめられる。

- (i) 複数種の有機カチオン輸送機構を阻害するが、特にOCTとPMAT両方を協力的に阻害する化合物 (Amantadine や dopamine, decynium-22, nicotine, serotonin, quinidine) は、初代培養 RPE 細胞における MPP^+ 取り込みの阻害が観察される。
- (ii) OCT1-2 と MATE を阻害する条件下 (TEA による阻害) では有意な MPP^+ 輸送阻害が観察されない。
- (iii) OCT のみ、OCTN のみ、そして MATE のみを阻害する条件下 (Histamine, cimetidine, estradiol, corticosterone, choline, 及び L-carnitine) では有意な MPP^+ 輸送阻害が観察されない。

これらの点を総合すると、OCT3 と PMAT を共に認識する化合物で阻害が示されている。従って、本結果から outer BRB における MPP^+ 輸送には OCT3 と PMAT が共に寄与していることが示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、炎症関連物質 histamine の網膜からのクリアランスにBRBは大きく寄与しないことから、BRB を網膜からの histamine クリアランスに応用することは困難であることが明らかとなった。一方、BRB は MPP^+ 排出機能を備えていることが実験的に示され、*in vitro* 解析から、inner BRB では PMAT が、そして outer BRB では OCT3 及び PMAT がその排出輸送に関与することが示唆された。これまで細谷班にて、カチオン性薬物の循環血液中から網膜へ促進的に移行させるためのクライテリアを作成されている。本クライテリアに、「今回見出された BRB 排出輸送寄与分子である OCT3 及び PMAT に認識させない」という点を加えることによって、さらなる効率的な網膜へのカチオン性薬物送達実現が可能になると期待される。

【参考文献】

- 1) Akanuma S, Soutome T, Hisada E, Tachikawa M, Kubo Y, Hosoya K. Na^+ -independent nucleoside transporters regulate adenosine and hypoxanthine levels in Müller cells and the inner blood-retinal barrier.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 54, 1469-77 (2013)

- 2) Tachikawa M, Takeda Y, Tomi M, Hosoya K. Involvement of OCTN2 in the transport of acetyl-L-carnitine across the inner blood-retinal barrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 430-6 (2010)
- 3) Katayama K, Ohshima Y, Tomi M, Hosoya K. Application of microdialysis to evaluate the efflux transport of estradiol 17-beta glucuronide across the rat blood-retinal barrier. *J. Neurosci. Method*, 156, 249-56 (2006)
- 4) Usui T, Kubo Y, Akanuma S, Hosoya K. B-alanine and l-histidine transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement in L-carnosine supply. *Exp. Eye Res.*, 113, 135-42 (2013)

Ⅲ－3 Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と 遺伝子デリバリー法確立

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 准教授 久保 義 行

【研究の背景と目的】

血液網膜関門（BRB）に発現する verapamil 認識性 novel カチオン性薬物輸送機構の分子実体の解明は、新規薬物送達技術を開発する上で極めて重要である。有機カチオン性薬物の組織関門透過は、主に solute carrier (SLC) ファミリーに属するインフラックストランスポーターによって担われると考えられている。しかし、これまでの当研究室における発現解析と輸送解析の結果から、BRB の有機カチオン性薬物透過機構に、未知の BRB 透過輸送担体分子が関与することが強く示唆される。

BRB は内側血液網膜関門（inner BRB; 網膜毛細血管内皮細胞を実体とする）及び外側血液網膜関門（outer BRB; 網膜色素上皮 (RPE) 細胞を実体とする）にて構成されている。昨年度までの研究にて、カチオン性輸送担体に共通するモチーフ配列を有するものの、輸送基質やその認識性がこれまでに明確にされていない、SLC ファミリーと細菌類カチオントランスポーターホモログ、マラリア原虫カチオントランスポーターホモログについて、inner BRB 及び outer BRB における発現の検証を実施した。さらに、発現が示された分子について、過剰発現細胞を構築し、その分子の化合物認識性を検証してきた。今年度は、novel カチオン輸送担体分子実体同定を目的に、その基質輸送機能をさらに検証した。そして、将来的には抗体標識リポソーム（イムノリポソーム）を用いた網膜への遺伝子デリバリー法へ展開させることを視野に、inner BRB 発現型 novel カチオン輸送担体に対するポリクローナル抗体作成に着手した。

【実験手法】

(A) アフリカツメガエル卵母細胞発現系による標的分子の基質輸送機能解析

標的遺伝子 open reading frame を complementary RNA (cRNA) 合成に最適化された pGEM-HE plasmid のマルチクローニングサイトへ組み込んだ。cRNA は RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いて合成した。雌性アフリカツメガエル (Kato-S-Science) から卵巣を摘出し、collagenase A (Roche) 処理後、濾胞細胞を除去することで oocyte を得た。Oocyte は SOS buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) を用いて培養した。培養 1 日後に標的分子 cRNA をマイクロインジェクター (Narishige) にて 50 ng/23 nL 注入し、4 日間さらに

培養することで、oocyte へ標的分子タンパク質を発現させた。

ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) に [³H]verapamil (American Radiolabeled Inc.) などの各種放射性標識薬物・化合物を 0.1-0.2 μCi/200 μL となるように溶解させ、tracer buffer とした。ND96 へ oocyte を移し、20°C で 20 分プレインキュベーションし、tracer buffer 中でインキュベーションすることで (20°C) 取り込み実験を行った。指定時間経過後、oocyte を 4°C ND96 で 4 回洗浄し、5% sodium dodecyl sulfate にて可溶化させた。可溶化液に 3 mL Monofluor (National Diagnostics Inc.) を加え攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (LSC6101, Aloka) にて放射活性を測定した。

Oocyte への薬物輸送活性は、oocyte/medium ratio で表した (Eq. 1)。

$$\text{Oocyte/medium ratio } (\mu\text{L/oocyte}) = \frac{\text{Radioactivity per oocyte (dpm/oocyte)}}{\text{Radioactivity in the medium (dpm}/\mu\text{L)}} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

実験データは平均値±標準誤差 (Mean±S.E.M.) で表した。比較検定には 2 群間の比較の場合には、unpaired Student's *t*-test を用いて有意差を検定した。3 群間以上の場合には one-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Dunnett's Test もしくは Tukey's Multiple Comparisons Test によって多重比較を行った。

(B) Novel カチオン輸送担体候補分子に対するポリクローナル抗体作出

TR-iBRB2 細胞 total RNA をソースとし complementary DNA (cDNA) を合成し、本 cDNA を鋳型とした polymerase chain reaction (PCR) にて、標的分子に対し特異的な塩基配列 (約 100 bp) を増幅した。本増幅配列を pGEM-Teasy plasmid (Promega) へ組み込んだ後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、増幅産物の配列を確認した。増幅産物に問題がないことが確認された後、本 vector からリコンビナントタンパク質発現用 plasmid である pGEX-4T2 (GE healthcare) へ、増幅配列を制限酵素処理、次いで ligation 反応することで移し換えた。pGEX-4T2 に目的産物が問題なく組み込まれているか、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって確認の後、本 plasmid を導入した大腸菌 (BL21) を培養、そして isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) にて目的リコンビナントタンパク質発現を誘導した。導入した大腸菌を破碎、次いで Glutathione Sepharose 4B (GE healthcare) を用いた精製にて、目的タンパク質を回収した。

【結果・考察】

A. 目的タンパク質発現細胞を用いた化合物輸送評価

昨年までの解析にて見出した分子について詳細な解析を実施するため (Table 1)、現在ほ乳類細胞発現系の構築を行っている。新たな novel カチオン輸送担体候補分子として、inner BRB において発

Table 1 昨年度までに見出した血液網膜関門 novel カチオン輸送担体候補分子

Family	Molecule	Character
SLC family	Slc12a8	● 2 級アミン指向性。
	Molecule A	● 2 級アミンと脂肪族 4 級アンモニウム指向性。
	Molecule B	● 1-2 級アミンと4級アンモニウム指向性。
	Molecule C	● 2-3 級アミン指向性。
	Molecule D	● 芳香族 4 級アンモニウム指向性。
EstT	Molecule a	● 2 級アミンと芳香族4級アンモニウム指向性。 ● 3 級アミン認識性は低い。
	Molecule b	● 芳香族 4 級アンモニウム指向性。
	Molecule c	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性低い。
	Molecule d	● 1-2 級アミンと 4 級アンモニウム指向性。 ● アニオン性化合物指向性。
	Molecule e	● 4 級アンモニウム指向性。
	Molecule f	● 3 級アミン指向性。 ● 芳香族 4 級アンモニウム指向性。
	Molecule g	● 1-2 級アミンと芳香族 4 級アンモニウム指向性を有する。 ● 3 級アミン指向性は低い。
	Molecule h	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性は低い。
	Molecule i	● 1 級アミン指向性。 ● 3 級アミン認識性は低い。 (3 級アミンが複数あると認識するという可能性はある)

現する SLC family の molecule E, F, G の open reading frame (ORF) を単離し、アフリカツメガエル卵母細胞発現系構築を試みた。Molecule E について、カチオン性化合物である clonidine や nicotine 認識性が示され、この分子が新たな novel カチオン輸送担体候補分子として見出された。また、molecule F および G についてもカチオン性薬物認識性が可能性として示された。現在、上述の分子について詳細な輸送特性解明のため、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における分子発現条件の至適化と、ほ乳類細胞発現系構築に取り組んでいる。

B. 抗体作出に向けたリコンビナントタンパク質作成

Inner BRB における発現が示唆された分子について、分子の発現・局在の精査と将来的な網膜への遺伝子デリバリー適応型イムノリポソーム構築を目的とし、現在、特異的抗体作出に着手している。Inner BRB 発現分子の中で、2 種類について、リコンビナントタンパク質の作成に成功した。具体的には、1 つ目の分子は抗原部位として N 末端側で 3 種類、C 末端側で 1 種類のエピトープタンパク質作製に成功し、C 末端側のタンパク質はモルモットとウサギを免疫動物として、N 末端側のタンパク質はモルモットのみを免疫動物として、能動免疫を実施している。2 つ目の分子は N 末端側で 2 種類、C 末端側で 2 種類のエピトープタンパク質作製に成功し、これらタンパク質はモルモットのみを免疫

動物として能動免疫を開始している。

【結論および展望】

今年度の研究成果として新たな血液網膜関門 novel カチオン輸送担体候補分子を見出した。現在、ほ乳類発現細胞を用いた詳細な輸送特性解明に取り組んでおり、inner BRB におけるカチオン性薬物輸送への寄与を詳細に評価する予定である。また、novel カチオン輸送担体候補分子について抗体作出に取り組んでおり、今年の春には抗体精製・評価が完了する予定である。今後、本抗体を用いたイムノリポソームが網膜への遺伝子デリバリーについて有用であるか検証を進める予定である。

Ⅲ－４ Novel カチオン輸送担体に対するパスポート構造を元にした，有機化学的薬物誘導体化

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬品製造学研究室 教授 松谷裕二

【研究の目的と背景】

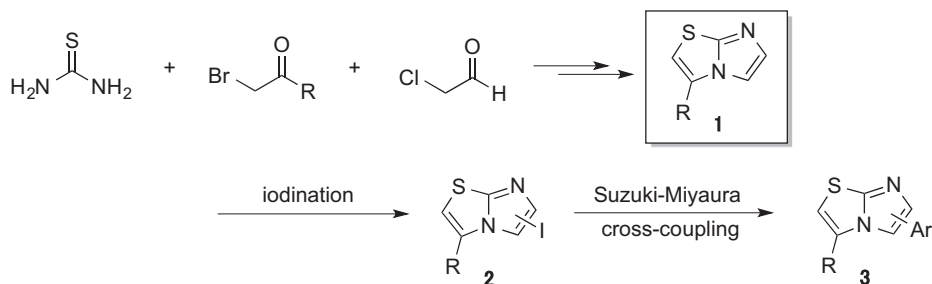
血液網膜関門を介したベラパミル輸送を阻害する薬物の特徴として，アミン含有薬物は阻害を示すものの，四級アンモニウム含有薬物では阻害されないことが挙げられる。本研究では「網膜への薬物送達を目的とした薬物・化合物の誘導体化」を最終目標として研究を遂行しており，それを可能とするパスポート構造を明らかにするためには，プローブとなる薬物に対し各種アミン含有構造を付加させ，その輸送活性を比較するのが最良の方法である。平成23年度は，「ジヒドロフラン融合型縮環系化合物」をモデル薬物として，アミン型官能基を薬物に効率良く導入するための方法論を確立し，また平成24年度は，シクロブテノンに対するジアゾメチレンアニオンの求核付加-連続的電子環状反応というドミノ型プロセスを用い，パスポート構造の候補となる1,2-ジアゼピン骨格の新規構築法を開拓してきた。本年度は，アミン構造を内蔵した含窒素複素環骨格である「イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール」を有効なパスポート構造として設定し，本骨格の効率的な化学合成法の確立を目指すこととした。その上で，本骨格をプローブ薬物に導入することを念頭に，「クロスカップリング法」に基づいた戦略について検討を行った。すなわち，クロスカップリングの足がかりとなるハロゲン置換基を導入するため，イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格に対する位置選択的なヨウ素化反応について精査し，さらにモデル基質を用いたクロスカップリング反応を実施して，有効性のデモンストレーションを行った。

【実験方法】

イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格 (1) は，既存のチアゾール環合成法等を参考として，チオ尿素と2種類の α -ハロケトン化合物との縮合反応により構築できるものと考えられる。本法に基づいて効率的合成を達成した後，本化合物に対し，ヨード化の条件検討を行う。本骨格には3カ所の反応点が存在するため，その位置選択性をコントロールできる手法の開拓を目指すものとする。また，合成されたヨード体 (2) をプローブ薬物に付加させるため，単純なモデル化合物を用いてクロスカップリングの検討を行う。カップリングパートナーとしては，毒性の観点から重金属を含まないホウ素化合物を選択して Suzuki-Miyaura カップリングの検討を行い，パスポート構造導入にあたってのヨード体

(2) の有用性を検証する (Scheme 1)。

Scheme 1



(イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格合成の実施例)

2-Amino-thiazole-4-carboxylic acid ethyl ester hydrobromide (4)

Thiourea (9.75 g, 128 mmol) の MeCN (300 mL) 溶液に 0°C で Ethyl bromopyruvate (25.0 g, 128 mmol) を加え、室温にて18時間攪拌した。反応終了後、Et₂O を加えて室温にて2日間攪拌した。その後、析出した結晶を吸引ろ過にて集めた。白色の固体 (28.3 g, 112 mmol, 87%) として(4)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.08 (1H, s), 5.13 (2H, brs), 3.46 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 1.38 (3H, t, *J* = 7.1 Hz).

Imidazo[2,1-*b*]thiazole-3-carboxylic acid ethyl ester (5)

チアゾール体 (4) (5 g, 20 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に Ar 雰囲気下、炭酸カルシウム (4 g, 40 mmol) を加え、室温で1.5時間攪拌した。その後、臭化ナトリウム (2.7 g, 26 mmol), Chloroacetaldehyde (5 mL, 30 mmol) を順次加え、50°Cにて22時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を留去し、CH₂Cl₂ で希釈し、水、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層を MgSO₄ で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : AcOEt = 1 : 1) で分離し、褐色の油状物質 (1.25 g, 6.37 mmol, 32%) として (5) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ8.00 (1H, s), 7.74 (1H, s), 7.34 (1H, s), 4.40 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 1.37 (3H, t, *J* = 7.1 Hz).

Imidazo[2,1-*b*]thiazol-3-yl-methanol (9)

エステル体 (5) (1.242 g, 6.34 mmol) の CH₂Cl₂ (1.5 mL) 溶液に Ar 雰囲気下、0°Cにて DIBAL (15.3 mL, 15.9 mmol) を加え、0°Cにて30分攪拌した。反応終了後、0°Cにて Et₂O (50 mL), MeOH (50 mL) を順次加え、室温で1時間攪拌した。その後、反応溶液をセライト濾過し、有機層を MgSO₄ で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 10 : 1) で分離し、薄黄色の固体 (892 mg, 5.78 mmol, 91%) として(9)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.70 (1H, s), 7.25 (1H, s), 6.99 (1H, s), 4.77 (2H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-*d*₄): δ151.02, 134.51, 133.67, 113.49, 110.67, 57.53; IR (KBr): 3185 cm⁻¹ (OH); MS (EI) *m/z* 154

(M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₆H₆N₂OS: 154.0189 (M⁺), found: 154.0201; m.p. 123-124°C (CHCl₃-Methanol).

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-imidazo[2,1-*b*]thiazole (10)

アルコール体 (9) (1.05 g, 6.81 mmol) の DMF (20 mL) 溶液に Ar 雰囲気下, 0°Cにて NEt₃ (1.9 mL, 13.62 mmol), *tert*-butyldimethethylsilyl chloride (2.05 g, 13.62 mmol) を順次加え, Ar 下, 室温にて15分 攪拌した。反応終了後, 反応溶液に飽和重曹水を加え, CH₂Cl₂ で抽出し, 得られた有機層を MgSO₄ で乾燥, ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane: Acetone = 3 : 1) で分離し, 淡黄色の固体 (1.67 g, 6.23 mmol, 92%) として (10) を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.49 (1H, s), 7.35 (1H, s), 6.64 (1H, s), 4.75 (2H, s), 0.91 (9H, s), 0.10 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ149.65, 134.63, 134.36, 131.09, 108.25, 58.45, 25.66, 18.15, -5.47; IR (KBr): 1471 cm⁻¹ (C=C); MS (EI) *m/z* 268 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₂H₂₀N₂OSSi: 268.1053 (M⁺), found: 268.1066; m.p. 55-56°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

(イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格のヨード化の実施例)

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-5-iodo-imidazo[2,1-*b*]thiazol (11)

TBS エーテル体 (10) (800 mg, 2.98 mmol) の CH₂Cl₂ (4.8 mL) 溶液に Ar 雰囲気下, 5°Cにて炭酸水素ナトリウム (650 mg, 7.74 mmol) の水溶液 (23 mL) を加え, ヨウ素 (1.06 g, 4.2 mmol) の CH₂Cl₂ (25 mL) 溶液をゆっくり添加したのち, 5°Cにて 3 時間攪拌後, 室温に戻し, さらに15時間攪拌した。反応終了後, 反応溶液が無色になるまで10% Na₂S₂O₃ 水溶液を加え, CH₂Cl₂で抽出した。得られた有機層を水で洗浄後, MgSO₄ で乾燥, ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : Acetone = 3 : 1) で分離し, 淡黄色の固体 (1.05 g, 2.66 mmol, 89%) として (11)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ7.27 (1H, s), 6.76 (1H, s), 5.07 (2H, s), 0.95 (9H, s), 0.14 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ152.97, 142.64, 142.36, 133.08, 109.25, 59.11, 25.77, 18.28, -5.38; IR (KBr): 1474 cm⁻¹ (C=C), 1429 cm⁻¹ (C=C); MS (EI) *m/z* 394 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₂H₁₉IN₂OSSi: 394.0013 (M⁺), found: 394.0032; m.p. 121-122°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

(Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応の実施例)

3-(*tert*-Butyl-dimethyl-silyloxymethyl)-5-(3-nitro-phenyl)-imidazo[2,1-*b*]thiazole (14)

ヨード体 (11) (50 mg, 0.13 mmol) の benzene (450 μL) 溶液に Ar 雰囲気下, Tetrakis (triphenylphosphine) palladium (15 mg, 0.013 mmol), 炭酸ナトリウム (27 mg, 0.25 mmol) の水溶液 (128 μL), 3-Nitrophenyl boronic acid (23 mg, 0.14 mmol), EtOH (170 μL) を順次加え, 80°Cにて17時間攪拌後, 室温に戻し, 3-Nitrophenyl boronicacid (23 mg, 0.14 mmol), Tetrakis (triphenylphosphine) palladium (4 mg, 0.003 mmol)

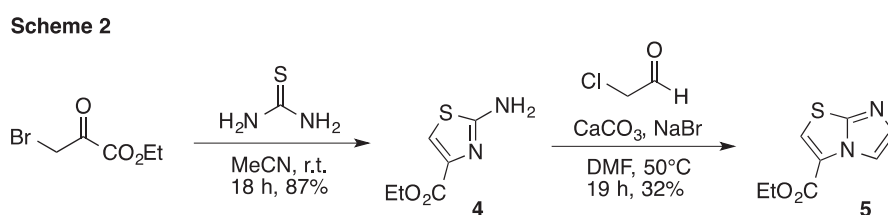
をさらに添加し、再度80°Cにて5時間攪拌した。反応終了後、反応溶液に水を加え、CH₂Cl₂で抽出した。得られた有機層をMgSO₄で乾燥、ろ過後溶媒を減圧下留去した。この残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: Ether = 4:1) で分離し、黄色の固体 (25 mg, 0.064 mmol, 50%) として(14)を得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ8.29 (1H, s), 8.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.81 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.61 (1H, dd, *J* = 7.7 Hz, 8.0 Hz), 7.32 (1H, s), 6.78 (1H, s), 4.47 (2H, s), 0.74 (9H, s), -0.10 (6H, s); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ147.86, 135.30, 134.58, 132.68, 131.70, 129.11, 125.88, 124.21, 124.03, 123.00, 110.26, 58.60, 25.24, 18.08, -5.64; IR (KBr): 1522 cm⁻¹ (NO₂); MS (EI) *m/z* 394 (M⁺); HRMS (EI) Calcd for C₁₈H₂₃N₃O₃SSi: 389.1221 (M⁺), found: 389.1229; m.p. 107-110°C (hexane : Acetone = 3 : 1).

【結果・考察】

<イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格合成法の検討>

まずは、本研究でパスポート構造と設定したイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格の構築法について検討を行った。その概略を Scheme 2 に示す。



チオ尿素とブロモピルビン酸エチルを、MeCN 溶媒中にて室温で攪拌したところ、縮合環化反応が円滑に進行し、良好な収率にてチアゾール誘導体(4)を得ることに成功した。次に、化合物4とクロロアセトアルデヒドから、イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格(5)への変換を試みた。種々条件検討の結果、DMF 溶媒中にて炭酸カルシウムと臭化ナトリウム存在下、50°Cに加熱することでイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール誘導体(5)を合成することができた。収率には未だ改善の余地が残されるものの、目的としたイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を構築することに成功した。

<イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格のヨウ素化の検討>

イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格(5)に対して、クロスカップリングの足がかりとなるハロゲン導入の検討を行った。ハロゲンとしては、最も反応性が高いとされるヨウ素を選択した。芳香環をヨウ素化する場合、代表的な方法の1つとして、リチオ化を経由する方法が挙げられる。そこでまず、リチオ化補助機能のある官能基 (directed-metallating group: DMG) を有する基質として、アミド体(6)の調製を行った。本化合物は、エステル5をアルカリ加水分解して得られるカルボン酸を、ジエチル

アミンとの脱水縮合に付すことにより、容易に合成することができた (Scheme 3)。

次いで、アミド体 **6** に対するリチオ化とヨウ素化の条件検討を行った。それらの結果を、Table 1 にまとめる。THF 溶媒中 DMPU 存在下、基質に -78°C で *s*-BuLi を作用させ、その後 I_2 と反応させた (entry 1-6)。試薬の当量関係や添加の順番を変えると、ヨウ素化される位置の選択性が逆転するという、興味深い現象が見られた (entry 1 vs 3)。ヨウ素化剤として NIS を用いたり、溶媒として DME を用いた場合、異性体 **8** の生成が顕著に軽減した (entry 7-10)。最も良好な結果を与えたのは entry 8 の条件で、この場合、異性体 **7** のみを 41% (BRSM: 45%) の収率で位置選択的に生成することが明らかとなった。

Scheme 3

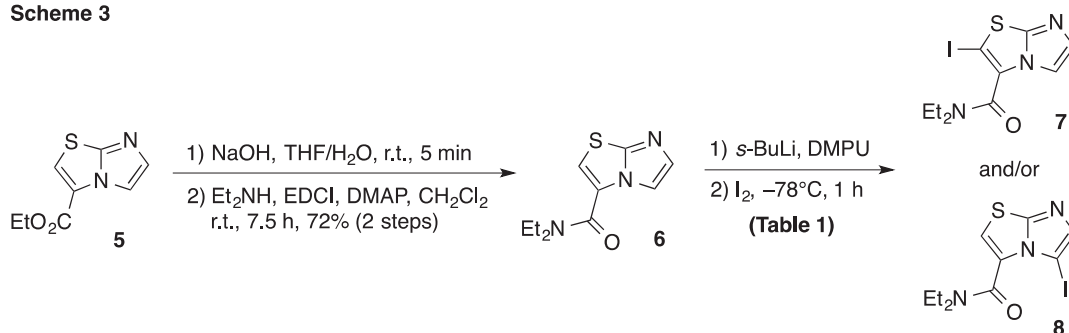


Table 1

entry	procedure	solvent	E^+	equiv.		time 1)	yield (%)		
				<i>s</i> -BuLi	DMPU		7	8	recovery
1	A	THF	I_2	1	6	1 h	41	4	-
2	A	THF	I_2	1	6	0.5 h	15	30	19
3	B	THF	I_2	1.2	6	1 h	-	41	45
4	A※	THF	I_2	1.2	6	1 h	25	15	37
5	A※	THF	I_2	1.2	6	1 h	18	18	21
6	A	THF	I_2	1.2	2.8	1 h	26	20	23
7	A	THF	NIS	1.2	2.8	1 h	28	7	40
8	C	THF	I_2	2.5	6	1 h	41	-	36
9	C	DME	I_2	1.2	-	1 h	16	-	49
10	C	DME	I_2	2.5	-	1 h	35	-	25

A: **6**, DMPUのTHF溶液に *s*-BuLiを添加。

B: DMPU/THFに *s*-BuLi, **6**のTHF溶液を順次添加。

C: Aに従い操作し、クエンチを 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液で行った。

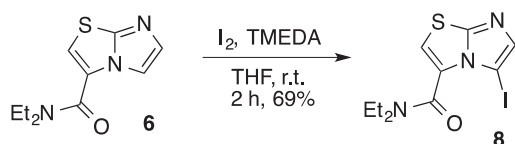
*: entry4では *s*-BuLiをゆっくり添加、 entry5では *s*-BuLiをすばやく添加

一方、異性体 **8** を選択的に得るためには、entry 3 の条件にて反応を行うことで、ほぼ同等の結果を得られることになるが、リチオ化を経ない単純な芳香族求電子置換反応 (SNAr) によるヨウ素化により、更に有効な結果が得られることも種々の文献情報から推察された。そこで、基質 **6** に対して THF 溶媒中 TMEDA 存在下にヨウ素と反応させたところ、予想通り 69% という良好な収率で位置選択的にヨード体 **8** を生成することを見出した (Scheme 4)。

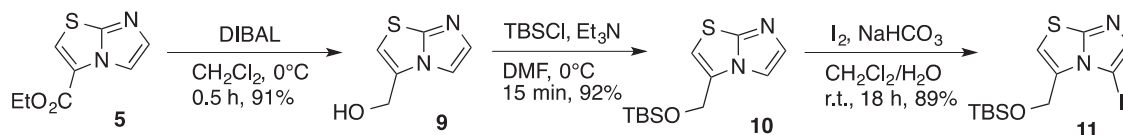
このように、リチオ化を経由しない SNAr ヨード化が効率よく進行することが分かったので、基質

となるイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格には、アミドやエステルといった DMG は必ずしも必要ではないと考えることができる。そこで、エステル体 **5** を DIBAL で還元してアルコール体 **9** とし、ついで TBS 保護した基質 **10** を合成した。本化合物の SNAr ヨード化を試みたところ、塩基として炭酸水素ナトリウムを用いる条件下で 89% という高収率で反応が進行し、位置選択的なヨード体 **11** を得ることに成功した (Scheme 5)。

Scheme 4



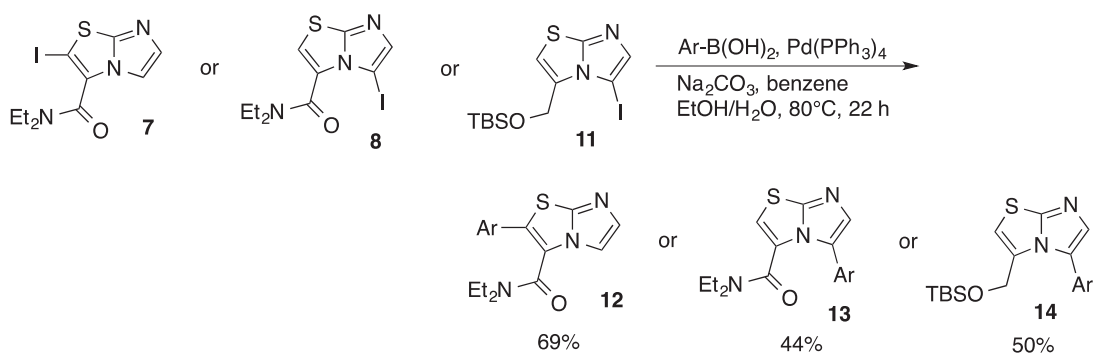
Scheme 5



<ヨード体に対する Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応の検討>

上述の通り、3種のヨード体を位置選択的に合成することに成功したので、これらの化合物が、プローブ薬物にパスポート構造 (イミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格) を付加するための有用なツールとなるかを検証することにした。単純な有機ホウ素化合物 (Ar-B(OH)₂) をプローブ薬物のモデルとして用い、3種のヨード体 (**7**, **8**, **11**) それぞれに対して、標準的な Suzuki-Miyaura カップリング条件にて検討を行った。すなわち、ヨード体とホウ素化合物を有機溶媒-水系にて Pd 触媒と炭酸ナトリウム存在下、80°C で 1 晩反応させたところ、カップリング反応が進行して、それぞれ対応するカップリング体を 40-70% 程度の収率で生成することが明らかとなった (Scheme 6)。

Scheme 6



【今後の予定・次年度への展開】

上述の通り、本年度はパスポート構造として含窒素複素環であるイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を想定し、本骨格の効率的構築法を確立した。また、プローブ薬物へと本骨格を付加する方法として、位置選択的ヨード化反応の条件設定を完了させ、さらにこれらのヨード体を用いて、クロスカップリング法により実際にイミダゾ [2,1-*b*] チアゾール骨格を導入できることを証明した。今後は、網膜への薬物送達を可能とするパスポート構造を特定し、網膜輸送性に優れた薬物を創出するため、硝子体内投与でのみしか現在成功していない VEGF を標的とし、本受容体阻害剤などにパスポート構造を付加した誘導体合成を行い、輸送活性を比較検討していく予定である。