

### 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

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症，緑内障などの眼疾患は加齢が危険因子である。高齢化が進んでいる現代において，これら疾患の治療法確立は急務である。*In vitro* 薬理試験によって，これら眼疾患に対する創薬シーズは見いだされてきているものの，末梢投与にて効果を示す薬物の開発はほとんど進んでおらず，眼球内投与などが適応されている。眼球内への薬物投与は患者への負担が大きいことから，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は末梢投与による投与戦略構築が必須である。末梢投与された薬物の網膜への移行は，両コンパートメントを隔てる血液網膜関門（BRB）によって制限されていることから，BRBを介した循環血液から網膜への突破法確立は，末梢投与による眼疾患治療戦略構築に繋がる。

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，そして本分子の薬物認識特性解明を目的としている。そして，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。本課題二年目においては本カチオン輸送機構の特性を精査すると共に薬物認識特性を評価した。さらに，本輸送機構の候補分子となりうるオーファントランスポーターのBRBにおける発現を解析すると共に，open reading frame（翻訳領域）をクローニングし，薬物等の輸送機能を評価した。また，効率的な薬物誘導体化を実施するため，塩基性官能基修飾法について検討した。

##### 初年度の研究成果および結論

細谷班は内側血液網膜関門（inner BRB）において verapamil 輸送に関与する「分子実体が明らかにされていない輸送担体」について，初年度に得られた成果を元として，機能的評価を実施した。循環血液と脳を隔てる関門である血液脳関門（BBB）において，古典的 H<sub>1</sub> アンタゴニストである pyrilamine のインフラックス輸送に関与する機構の存在が報告されている（参考文献#1）。そこで，本輸送機構との同一性を inner BRB モデル細胞株である条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株（TR-iBRB2

細胞)を用いて評価した。また, verapamil 輸送に対し強力な阻害効果が示された propranolol についても TR-iBRB2 細胞における輸送を解析し, verapamil 輸送との同一性を検証した。輸送解析の結果, verapamil の輸送特性は pyrilamine や propranolol とは異なることが示され, 内側血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送機構は血液脳関門に存在する pyrilamine 輸送機構とは異なる, 全く新しい機構であることが示唆された。なお, 本成果の一部は Pharmaceutical Research に投稿し, 2013年に掲載の予定である(参考文献#2)。

赤沼班は verapamil 及び propranolol をプローブ薬物とし, 抗炎症薬などの血液網膜関門 novel 輸送機構認識性を評価した。その結果, 内側血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送機構はカチオン性官能基を有する抗炎症薬は認識しないことが示唆された。一方, その他薬物の認識傾向を評価したところ, 非イオン帯電性官能基(1-3級アミン)を有する化合物について, 水-オクタノール分配係数(Log D)値と認識性の指標(阻害率)との相関が示され, 薬物誘導体化に向けての指標が得られた。

久保班は初年度から継続して血液網膜関門 verapamil 認識型輸送担体の分子実体解明を実施している。BRBは網膜毛細血管内皮細胞を実体とする inner BRB と網膜色素上皮(RPE)細胞を実体とする外側血液網膜関門(outer BRB)の2つで構成されている。Outer BRBにおいても verapamil 認識性輸送担体の存在が示唆されていることから, ラット初代培養 RPE 細胞における mRNA 発現解析を実施し, 候補分子の幅を広げた。その結果, 候補分子として inner BRB と outer BRB 両方に, または片方に発現する solute carrier (SLC) トランスポーターとして6分子を, 細菌類ホモログ分子として8分子を新たに候補分子として選定した。初年度に決定した分子を含め, 計14分子について ORF を単離し, 候補分子 Xenopus Laevis 卵母細胞発現系を構築した。本卵母細胞発現系における verapamil 輸送機能を評価した結果, verapamil 輸送機能を有したのは7分子であった。これらの分子は BRB において verapamil インフラックス輸送に関与する可能性があり, その寄与を今後明らかにする予定である。

松谷班はパスポート構造として 1,2-ジアゼピン誘導体について, 一般性の高い新合成法の確立を実施した。ヨードベンゼン誘導体を出発物質とし, 原料化合物となる, 各種置換シクロブテノン誘導体の合成を行い, 良好な収率で得ることに成功した。本化合物のなかで 3-(4-tolyl)cyclobutenone を原料として 1,2-ジアゼピン環形成反応について条件検討を行った結果, 収率として最大85%を達成したが, エノール型ジアゼピンとイミン型ジアゼピンの生成比は82:18であった。なお, エノール型ジアゼピンとイミン型ジアゼピンの生成比が 1:1 となる反応について最大収率は73%であった。上記検討にて見出された最適条件にて, 各種置換シクロブテノンを原料として反応の一般性を検証した結果, エノール型ジアゼピンの生成比が高い割合であるものの, 様々な置換誘導体の収率は59-84%と概ね良好であった。以上の検討を基に, エノール型ジアゼピンのみを高収率で得る方法, そしてエノール型ジアゼピンをイミン型ジアゼピンへ異性化させる条件についても検証した。その結果, 反応条件の最適化に成功し, それぞれを単一生成物として得ることが可能となった。

以上のように、血液網膜関門 novel カチオン性薬物輸送担体について、その化合物認識特性が明らかとなり、分子実体の探索および機能評価の戦略に一定の目処が立った。さらに、環状アミン化合物として中枢神経系への移行性が高い、1,2-ジアゼピン誘導体合成について、生成比等の調節が可能な方法を確認した。抗血管新生薬や抗炎症薬など網膜への移行性が熱望される薬物について、novel カチオン性薬物輸送担体認識性が非常に低いことも明らかになったことから、今後は網膜移行性を向上させるための誘導体化戦略を構築すると共に、分子実体の同定とその重要性の解明に着手する予定である。

#### 【参考文献】

1. Okura T, Hattori A, Takano Y, Sato T, Hammarlund-Udenaes M, Terasaki T, Deguchi Y; Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone., *Drug Metab. Dispos.*, 36, 2005-13 (2008)
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.*, *in press*.