

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、加齢性黄斑変性症などの治療薬を送達することである。申請者は初年度までの研究成果から、血液網膜関門 (BRB) を介した循環血液中から網膜への verapamil 移行性は脳と比較し非常に高く、その過程には既報の有機カチオントランスポーターである OCT や OCTN, MATE, PMAT とは異なる輸送機構が関与する可能性を見いだしている。一方、この輸送は古典的 H₁ アンタゴニストである pyrilamine や β-ブロッカーである propranolol によって阻害されていた。Pyrilamine について、血液脳関門 (BBB) における pyrilamine を基質とする分子実体不明の未知トランスポーターの存在が示されている (参考文献 #1)。Propranolol は脳への移行性が高い薬物であり、既報のトランスポーターでは説明の付かない pyrilamine の他に鎮痛剤 naloxone の脳移行を阻害することが報告されている (参考文献 #2)。従って、BRB に存在する verapamil トランスポーターの特性を明らかにする上で、pyrilamine と propranolol 輸送機構との比較することは重要である。本年度は、BRB を介した pyrilamine と propranolol の輸送特性を詳細に解析し、verapamil 輸送特性との同一性と相違性を評価した。

【実験手法】

(A) 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。

(B) TR-iBRB2 細胞における [³H]pyrilamine および [³H]propranolol 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 の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]pyrilamine もしくは [³H]propranolol (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 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. 1)。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L}/\text{mg protein}) = \frac{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the cell (dpm/mg protein)}}{[^3\text{H}]\text{Compound concentration in the medium (dpm}/\mu\text{L})} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

^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} , $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$) 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。

(C) 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 propranolol 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 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 (AccuFLEX LSC-7400, Aloka) にて放射活性を測定した。Retinal uptake index (RUI, %) および brain uptake index (BUI, %) は Eq. 1 から算出した。

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

(D) データ解析

実験データは平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm 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。

【結果・考察】

A. TR-iBRB2 細胞における $[^3\text{H}]$ pyrilamine 輸送と本細胞への $[^3\text{H}]$ verapamil 輸送との比較

TR-iBRB2 細胞における $[^3\text{H}]$ pyrilamine 取り込み輸送は少なくとも1分まで直線性を示した。その取り込み輸送は 4°C において約50%，非標識 pyrilamine 共存下 ($500\ \mu\text{M}$) において58%それぞれ低下した。TR-iBRB2 細胞への pyrilamine 輸送の濃度依存性を検証した結果，高親和性 ($K_{m,1} = 20.2 \pm 4.4\ \text{M}$; $J_{\max,1} = 0.837 \pm 0.179\ \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$) と低親和性 ($K_{m,2} = 252 \pm 6\ \mu\text{M}$; $J_{\max,2} = 22.3 \pm 0.8\ \text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$) の2相を示した。以上の結果から，inner BRB における pyrilamine 輸送は担体介在型であり，その機構は高親和性と低親和性の2種類であることが示唆された。BBB における pyrilamine 輸送について，BBB モデル細胞である条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB13 細胞) への pyrilamine 輸送の K_m 値は $28\ \mu\text{M}$ と報告されており (参考文献 #1)，TR-iBRB2 細胞における高親和性 pyrilamine 輸送の K_m 値と近似している。TR-iBRB2 細胞には BBB に存在する pyrilamine 輸送機構の他にもう一つの低親和性輸送機構が存在することが示唆された。

TR-iBRB2 細胞への pyrilamine と verapamil の輸送特性について比較した。細胞外 pH 依存性を評価した結果，pH 7.4条件下における取り込みと比較し，pH 6.4条件下では両薬物共に変動しなかったものの，pH 8.4条件下において $[^3\text{H}]$ pyrilamine の輸送は有意に上昇した (Fig. 1)。各種薬物・化合物共存下 ($500\ \mu\text{M}$) において TR-iBRB2 細胞への $[^3\text{H}]$ pyrilamine 取り込み輸送を評価した結果，OCTN2 の基質である L-carnitine は $[^3\text{H}]$ verapamil 輸送を阻害したものの， $[^3\text{H}]$ pyrilamine 輸送は阻害しなかった (Fig. 2)。一方，その他の薬物・化合物について阻害スペクトルは類似していた。Pyrilamine と verapamil

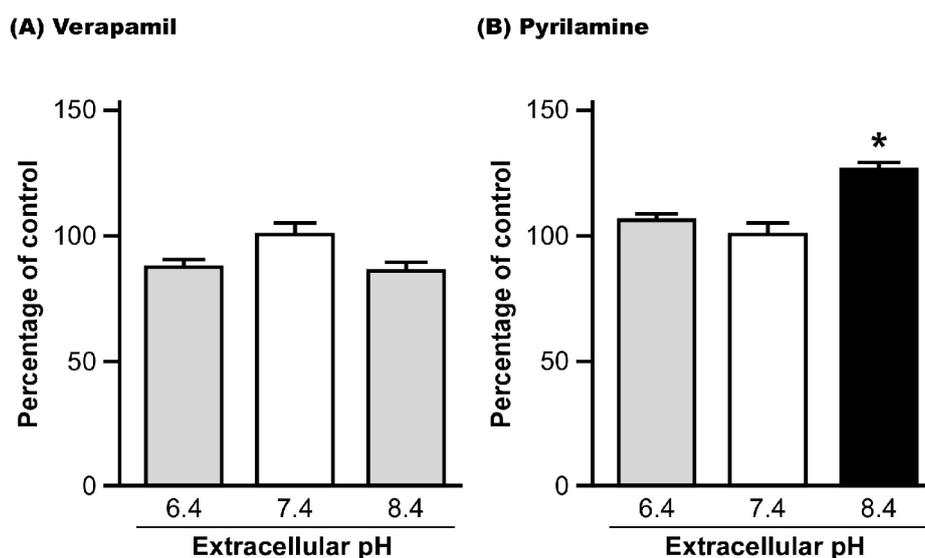


Figure 1 Effect of extracellular pH on uptake of $[^3\text{H}]$ verapamil (A) and $[^3\text{H}]$ pyrilamine (B) by TR-iBRB2 cells.

Extracellular pH-dependence of drugs' uptake was examined at 37°C for 3 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. ($n=3-6$). * $p<0.01$, significantly different from the uptake at extracellular pH 7.4.

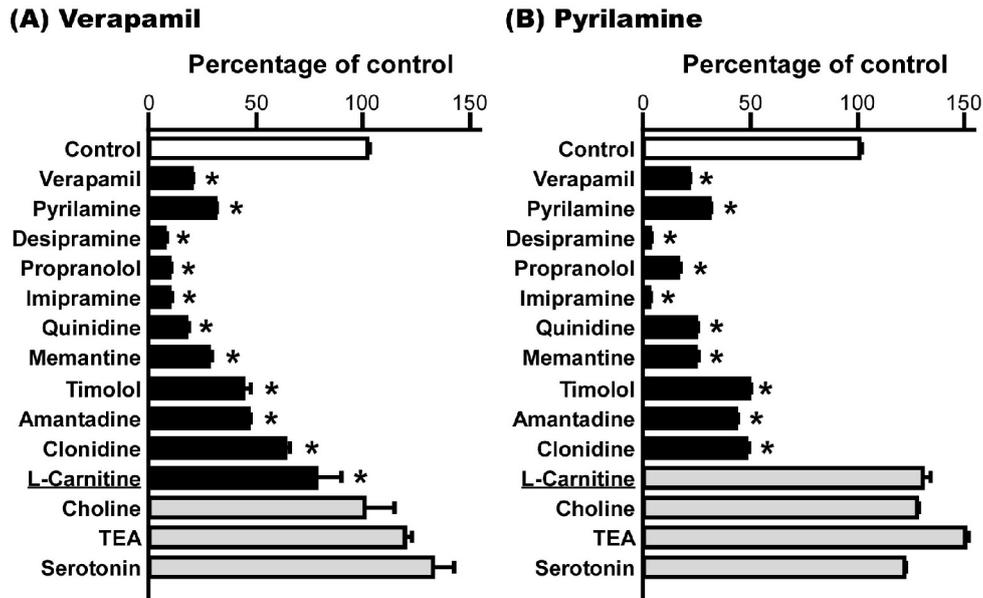


Figure 2 Effect of inhibitors on uptake of [³H]verapamil (A) and [³H]pyrilamine (B) by TR-iBRB2 cells. Uptake of these drugs was performed at 37°C for 3 min in the absence (control) or presence of inhibitors. Each bar represents the mean ± S.E.M. (n=3-6). **p*<0.01, significantly different from the control.

との輸送機構の同一性をさらに検証するため、verapamil 共存下における pyrilamine 輸送の濃度依存性解析と pyrilamine 共存下における verapamil 輸送の濃度依存性解析にて評価した。本結果から、TR-iBRB2 細胞への verapamil 輸送を pyrilamine は競合的に阻害するものの、TR-iBRB2 細胞への pyrilamine 輸送を verapamil は競合的に阻害しないことが示された。以上の結果から、inner BRB における pyrilamine 輸送機構は verapamil の輸送機構とは異なることが示唆された。

TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送についても比較検討を実施した。[³H]Propranolol の外部 pH 変動の影響を解析した結果、pH 7.4条件下と比較し、pH 6.4条件下において変動せず、pH 8.4条件下において有意に上昇した。また、500 μM L-carnitine 共存による阻害効果は示されず、それ以外の薬物について効果は verapamil および pyrilamine と同様であった。これらの結果は TR-iBRB2 細胞における [³H]propranolol 輸送が本細胞への pyrilamine 輸送と類似していることを示唆している。TR-iBRB2 細胞への propranolol 輸送について、verapamil と pyrilamine 輸送との同一性を検証した。Verapamil (200 μM) 共存下における濃度依存的な propranolol 輸送を Lineweaver-Burk plot した結果、非共存下における結果と y 軸上で交差せず、verapamil は propranolol 輸送を競合的には阻害しないことが示唆された。一方で、pyrilamine (200 μM) 共存下における濃度依存的な propranolol 輸送を Lineweaver-Burk plot した結果、非共存下における結果と y 軸上で交差し、その *K_i* 値は356 μM と算出された。本 *K_i* 値は TR-iBRB2 細胞における pyrilamine 輸送の低親和性輸送の *K_m* 値 (252 μM) と近似した。以上の結果を総合すると、inner BRB における propranolol 輸送は pyrilamine 輸送の低親和性輸送機構と同一ではあるものの、verapamil の輸送機構とは異なると考えられた。

B. *In vivo* BRB を介した [³H]propranolol 網膜移行特性と [³H]verapamil の移行性との比較

In vivo 環境下における [³H]propranolol の BRB 透過様式を解析し、 [³H]verapamil の BRB 透過様式と比較した。 [³H]Propranolol の RUI 値は非標識 propranolol (40 mM) および pyrilamine (40 mM) 共存下にて薬物非共存条件下 (コントロール) と比較し50%以上低下した。また、 verapamil (3 mM) 共存にて、 [³H]propranolol の RUI 値はコントロールと比較し27%低下した。一方、 choline (40 mM) 共存下とコントロールとの間に有意な変化は示されなかった。この阻害プロファイルは [³H]verapamil の RUI 法による実験結果と、 verapamil (3 mM) の効果を除き、類似していた。従って、 *in vivo* BRB を介した [³H]propranolol 輸送について、薬物感受性は BRB における verapamil 輸送と類似していることが示唆された。

[³H]Propranolol のBRB インフラックス輸送について、典型的な有機カチオン/アニオントランスポーター阻害剤の効果を検証した。OCT および OCTN の基質である tetraethylammonium (TEA) 共存 (40 mM) にて [³H]propranolol の RUI 値は、 コントロールと比較し35%低下し、 OAT 基質である p-aminohippurate 共存 (40 mM) にて阻害効果は示されなかった。Inner BRB モデルである TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送は TEA では阻害されなかったものの、 outer BRB には TEA 感受性の輸送機構である OCT3 (SLC22A3) の発現が報告されている (参考文献 #3)。従って、 BRB を介した propranolol 輸送には inner BRB の分子だけではなく、 outer BRB に存在する OCT3 が関与する可能性が考えられた。

以上の結果を総合すると、 *in vivo* BRB を介した propranolol 輸送への inner BRB に存在する pyrilamine 感受性輸送機構、そして outer BRB に存在する OCT3 の関与が示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、 inner BRB において存在するカチオン性薬物輸送機構として、以下の3種類の存在が導き出された。

1. Verapamil を基質とし、pyrilamine を阻害剤とする (基質ではない) 輸送担体。
2. Pyrilamine と propranolol を基質とし、verapamil を基質としない輸送担体。
3. Pyrilamine を基質とするものの、verapamil と propranolol を基質としない。

この3種類の分子機構について、それぞれの認識特性に基づく網膜 (と脳) への移行性については課題として残されたものの、少なくともこれらの機構に認識される薬物は BRB 透過性が非常に高いと考えられる。また、輸送基質のパスポート構造決定には至っていないものの、後述の赤沼班の研究成果からも脂溶性の高いアミン系薬物が基質である可能性が高く、今後はそのモデル薬物・化合物について BRB 透過性を詳細に評価する予定である。

【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. Suzuki T, Ohmuro A, Miyata M, Furuishi T, Hidaka S, Kugawa F, Fukami T, Tomono K; Involvement of an influx transporter in the blood-brain barrier transport of naloxone. *Biopharm. Drug Dispos.*, 31, 243-52 (2010)
3. Rajan PD, Kekuda R, Chancy CD, Huang W, Ganapathy V, Smith SB; Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Curr. Eye Res.*, 20, 195-204 (2000)