

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する。抗炎症薬の網膜へのデリバリーを考える上で、血液網膜関門 verapamil 認識性 novel カチオン性薬物輸送担体の認識性及びその特徴を明らかにすることは重要である。炎症メディエーターであるプロスタグランジン合成を阻害する抗炎症薬として非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が挙げられ、一部の NSAIDs にはカチオン性構造が組み込まれている。これまでの研究から、血液網膜関門 (BRB) に存在する新規カチオン性薬物輸送担体はアミン構造を有する薬物を認識する可能性が示唆されたことから、本輸送担体は網膜への NSAIDs のデリバリー戦略構築において重要と考えられる。そこで、*in vivo* BRB の特性を良好に保持する TR-iBRB2 細胞をソース、カチオン性薬物輸送スクリーニングプローブとして [³H]verapamil と [³H]propranolol を用い、抗炎症薬の認識性を評価した。それに加え、昨年度から遂行している新規カチオン性薬物輸送担体の薬物認識について化合物構造を基とした特徴付けを [³H]propranolol をプローブ薬物として実施した。

【実験手法】

(A) BRB モデル細胞の培養

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]verapamil 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 μCi/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 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)。

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

化合物共存に伴う cell/medium ratio の変動は Eq. 2 の percentage of control にて表した (Eq. 2)。

$$\text{Percentage of control} = \frac{\text{Cell/medium ratio in the presence of inhibitor}}{\text{Cell/medium ratio in the absence of inhibitor}} \quad \dots[\text{Eq. 2}]$$

(C) データ解析

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。

【結果・考察】

A. TR-iBRB2 細胞における [³H]verapamil および [³H]propranolol 輸送への NSAIDs の効果

アミン構造を有する NSAIDs である diclofenac や celecoxib, meloxicam, mefenamic acid を用い、³H]verapamil や ³H]propranolol の TR-iBRB2 における輸送への効果を検証した。なお、アミン構造を有さない NSAIDs として acetylsalicylic acid を、NSAIDs ではないものの構造としてアミンを有し、NSAIDs と構造類似性を有する血管新生阻害薬として sorafenib と pazopanib を、用いた。TR-iBRB2 細胞への ³H]verapamil 輸送は acetylsalicylic acid や meloxicam, mefenamic acid, celecoxib, sorafenib, pazopanib 共存によって阻害されなかった (**Fig. 1A**)。また、その ³H]propranolol 輸送は diclofenac や acetylsalicylic acid, celecoxib, sorafenib, pazopanib によって有意に変動しなかった (**Fig. 1B**)。以上の結果から、inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体はこれらの薬物を認識しないことが示唆された。

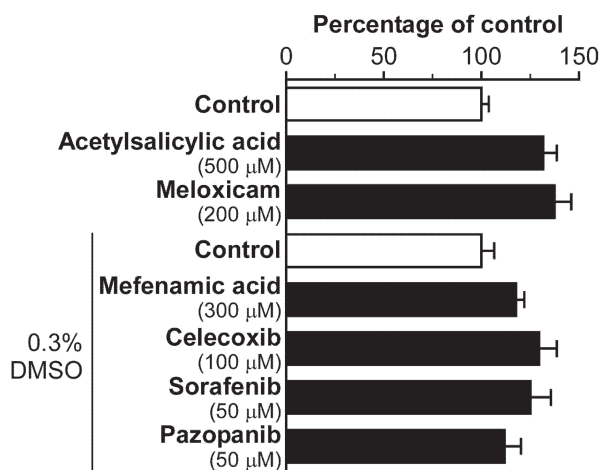
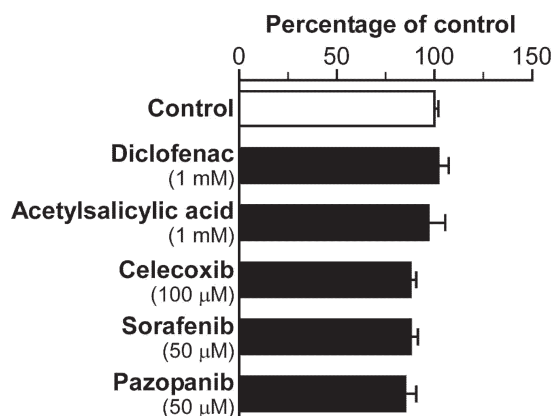
(A) [³H]Verapamil**(B) [³H]Propranolol**

Figure 1 Effect of several drugs on [³H]verapamil and [³H]propranolol uptake by TR-iBRB2 cells.

Uptake of [³H]verapamil (A) and [³H]propranolol (B) by TR-iBRB2 cells was performed in the absence (control) or presence of drugs at 37°C for 3 min. Each bar represents the mean ± S.E.M. (n=3-16).

B. [³H]Propranolol をプローブとした、TR-iBRB2 におけるアミン系薬物認識特性評価

上述のように、既報の抗炎症薬は inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体に対する認識性が低いことから、網膜への抗炎症薬デリバリーを実現するためには、薬物の誘導体化戦略を執る必要がある。そこで、薬物誘導体化を行う上での最終化合物の物性について特徴を決定することを目的とし、Inner BRB に存在する novel カチオン性薬物認識性薬物輸送担体について、アミン系薬物認識特性を評価した。カチオン性薬物や内因性カチオン性化合物を20種類選択し、TR-iBRB2 細胞への [³H]propranolol 輸送解析時に共存させ、阻害効果を検証した。4級アンモニウムを有する薬物や一部の3級アミン+2級アミンを共に有した薬物の8つを除き、12種類の薬物について阻害率と Ringer (pH 7.4)-オクタノール分配係数 (DC) の対数值との正の相関が示された ($p < 0.01$)。一方で、分子量や分子体積、水素結合数、分子極性表面積と DC との相関性は示されなかった。以上の結果から、inner BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送担体は、カチオン帯電性構造を有するのみで化合物 (基質) を認識するような単純な機構ではないことが示唆された。

【結論および展望】

本研究結果から、市販の抗炎症薬は BRB に存在する novel カチオン性薬物輸送機構に認識されないことが示唆された。さらに、この市販の抗炎症薬を novel カチオン性薬物輸送機構へ認識させるための戦略として、4級アンモニウムを含まない脂溶性アミン化合物誘導体化が方策の一つと考えられた。ただし、阻害率は必ずしも輸送基質としての親和性を反映していないことから、上述の構造的特徴を有する薬物が輸送基質となるか評価を行うと共に、誘導体化した薬物の輸送活性を *in vivo*・*in vitro* 両面から評価する予定である。