

論文の内容の要旨

論文題目 血液脳関門及び血液脳脊髄液関門における胆汁酸、有機アニオン
排出輸送系に関する研究

氏 名 北 澤 健 生

【序論】

中枢作用性ペプチドや抗痴呆効果を有する抱合型ステロイドには、脂溶性から予測される程、脳内移行性が良好でないものの存在が報告されている。これらの化合物の脳内動態を明らかにする上で、血液脳関門 (BBB) や血液脳脊髄液関門 (BCSFB) における排出輸送系に関する研究は重要である。既に我々は BBB にタウロコール酸 (TCA) 感受性の胆汁酸排出輸送系の存在を明らかにしている。胆汁酸輸送系は肝臓では一部のペプチドや薬物の抱合代謝物 (硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体) 等の有機アニオンをも基質とすることが知られている。これまで主に肝臓において胆汁酸を輸送する輸送担体として複数種の蛋白がクローニングされているが、これらの蛋白が BBB に発現し、*In vivo* においてペプチドや有機アニオンの脳からの排出に機能しているかについては、未だ不明である。一方、脳と血液を隔離するもう一つの関門である BCSFB にグルクロン酸抱合酵素が高発現していることが最近、明らかになった。しかし、抱合化を受けた薬物の排出を担う輸送担体が BCSFB に発現し、*In vivo* において有機アニオンの脳からの排出に機能しているかについては、未だ不明である。

【目的】

本研究では、アニオン性の BQ-123 (エンドセリン受容体拮抗薬)、カチオン性の Octreotide (ソマトスタチン類似体) の 2 つのペプチド性薬物と、硫酸抱合型エストロン

(E₁S)、グルクロン酸抱合型エストラジオール(E₂17βG)の2つのステロイドホルモンの抱合体のBBB及びBCSFBにおける排出輸送系の特性を明らかにすることを目的とした。

(1) Brain Efflux Index (BEI)法を用いて in vivo における BQ-123、Octreotide の脳からの排出過程を解析し、さらに RT-PCR 法を用いて各種胆汁酸輸送担体の BBB における発現を調べることで、ペプチドの脳排出における BBB 胆汁酸排出輸送系の関与を明らかにする。

(2) E₁S、E₂17βG のラット脳室内投与実験を行い、in vivo における脳脊髄液からの排出過程を解析する。その後、in vitro におけるラット単離脈絡叢への取り込み実験を行い、E₁S 及び E₂17βG 排出輸送機構を詳細に解析し、さらに、E₁S については条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB₃) を用いて、脈絡叢上皮細胞のみによる E₁S 排出輸送を解析することで、BCSFB における E₁S の排出機構を明らかにする。

(3) RT-PCR 及び Western blot を用いて E₂17βG を含むグルクロン酸抱合体を基質とする輸送担体 MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) の脈絡叢における発現を調べることで、E₂17βG の BCSFB での排出における MRP1 の関与を明らかにする。

以上の3点を目的とした。

【結果及び考察】

(1) BBB における BQ-123、Octreotide の排出輸送

BEI法による解析の結果、ラット大脳に直接投与した BQ-123 の脳内残存率は、同時投与した BBB 非透過性物質 Inulin のそれに比べて有意に経時的に減少し、半減期約 100 min で脳から排出することが明らかになった。この BQ-123 の BBB 排出は濃度依存的に阻害されたことから、BBB に BQ-123 を排出する担体輸送系の存在が示唆された。BQ-123 は肝臓においては TCA とともに胆汁酸輸送系の基質になることが知られている。そこで BQ-123 の BBB 排出における胆汁酸排出輸送系の関与を調べる為、BQ-123 と TCA の相互阻害実験を行った。TCA 及び BQ-123 の BBB 排出は相互に阻害された。しかし速度論的解析の結果、K_m 値と IC₅₀ 値が一致しなかったことから、BQ-123 と TCA の排出輸送系は全てが共通の輸送系を介しているとは結論できなかった。

一方、肝臓において胆汁酸輸送系の基質になることが知られている Octreotide は TCA の BBB 排出を阻害するものの、Octreotide 自身は見かけ上脳から排出されなかった。

(2) BBB における各種胆汁酸輸送担体遺伝子の検出

BBB における TCA と BQ-123 の輸送担体の共有性を解析するには、BBB の脳実質

側膜及び血液側膜に存在する可能性が考えられる輸送担体そのものを解析する必要がある。そこで既に肝臓において TCA や BQ-123 を輸送する担体の BBB における発現を RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、oatp (organic anion transporting polypeptide)、mEH (microsomal epoxide hydrolase)、spgp/bsep (sister P-glycoprotein/bile salt export pump) のプライマーを用いた場合に、肝臓の poly A⁺ RNA (ポジティブコントロール) を用いた場合と同じ分子量の断片が増幅された。oatp のプライマーを用いた場合に増幅された断片を解析した結果、oatp2 と 99.2% の相同性を有することがわかった。oatp2 は TCA と BQ-123 の両方を輸送することが最近明らかになったことから、BQ-123 と TCA の BBB 排出には、少なくとも一部 oatp2 の関与が示唆された。

(3) BCSFB における E₁S の排出輸送系の解析

脳室内投与実験の結果、E₁S は半減期 3.9 分で CSF から消失し、bulk flow (CSF の流速) 以上の顕著な排出輸送が示唆された。BCSFB での E₁S 排出輸送系の特性を解析するため、単離脈絡叢への E₁S の取り込み実験を行った。その結果、輸送速度は飽和性を示し (K_m: 18.1 μM)、oatp1 の基質である胆汁酸やステロイドホルモンの硫酸抱合型デヒドロエピアンドロステロン (DHEAS)、そしてプロモスルホフタレイン (BSP) 等の有機アニオンで有意に阻害された。一方、oatp2 に特異的な基質であるジゴキシンや、oatp family とは別の有機アニオン輸送担体に属し、脳に多く発現することが報告されている OAT3 (organic anion transporter 3) の基質であるパラアミノ馬尿酸 (PAH)、そして腎臓に特異的に発現している有機アニオン輸送担体 OAT-K1 の基質であるメトトレキセート (MTX) によって E₁S の輸送速度は有意に阻害されなかった。また、単離脈絡叢への E₁S の取り込みは Na⁺ や Cl⁻ イオンの影響を受けなかった。さらにラット条件的不死化脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB₃) への E₁S の取り込み実験の結果から oatp3 の基質である甲状腺ホルモン (T₃, T₄) でも E₁S 輸送は阻害されなかった。

以上のことから、E₁S の脈絡叢への取り込み過程に、少なくとも一部 oatp1 の関与が示唆され、oatp2、oatp3、OAT3、OAT-K1 等の有機アニオン輸送担体や mEH、Ntcp (Na⁺ /TCA transporting polypeptide) 等の Na⁺ 依存性の胆汁酸輸送担体の関与の可能性は低いことが示唆された。

(4) BCSFB における E₂17βG の排出輸送系の解析

脳室内投与実験の結果、E₂17βG は半減期 4.2 分で CSF から消失し、bulk flow (CSF の流速) 以上の顕著な排出輸送が示唆された。BCSFB での E₂17βG 排出輸送系の特性を解析するため、単離脈絡叢への E₂17βG の取り込み実験を行った。その結果、輸送速度は飽和性を示し、その K_m 値 (3.43 μM) は oatp1 oocyte 発現系への E₂17βG の K_m (報告値約 3 μM) とほぼ一致した。E₂17βG の単離脈絡叢に対する取り込みは有

機アニオン輸送阻害剤であるプロベネシドで阻害されたが、OAT3 の阻害剤であるベンジルペニシリン(PCG)では阻害されなかった。

以上のことから、 $E_217\beta G$ の脈絡叢への取り込み過程に、少なくとも一部 *oatp1* の関与が示唆され、OAT3 の関与の可能性は低いことが示唆された。

(5)BCSFB におけるグルクロン酸抱合体の輸送担体遺伝子(MRP1)の検出

BCSFB における排出機構を解明するには、さらに脈絡叢から循環血液への排出過程に関する解析が必要である。MRP1 は $E_217\beta G$ を基質とし、これまで肺に最も高発現していることが報告されている輸送担体である。そこで BCSFB における $E_217\beta G$ 排出機構に MRP1 が関与している可能性を調べるため、脈絡叢における MRP1 の発現を解析した。半定量的 PCR の結果、脈絡叢には肺の 4~5 倍の MRP1 mRNA が検出された。さらに Western blot の結果から MRP1 は蛋白レベルでも脈絡叢に高発現していることが明らかになった。

【結論】

BBB と BCSFB には、ペプチド性薬物である BQ-123、そして E_1S 、 $E_217\beta G$ のステロイドホルモンの抱合体の有機アニオン化合物を脳内から循環血液中へ排出する TCA 感受性の担体輸送系が機能していることが示唆された。BBB における BQ-123 の排出には少なくとも一部、*oatp2* が関与していること、そして BCSFB における E_1S 、 $E_217\beta G$ の排出には少なくとも一部、*oatp1* 及び MRP1 が関与していることが示唆された。