

審査の結果の要旨

氏名 北澤 健生

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。既に修士課程の研究により BBB にタウロコール酸 (TCA) などの胆汁酸を排出輸送する機構の存在することを、速度論的手法により明らかにしている。一方、これまでの研究により、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等の有機アニオン化合物をも基質とすることが知られている。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で pentapeptide)、カチオン性の Octreotide (ソマトスタチン類似体で octapeptide) 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 (E217bG) 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. BBB における BQ-123、Octreotide の排出輸送

Brain Efflux Index (BEI) 法を用いてラットにおける BQ-123 及び Octreotide の BBB 排出速度を測定した。BQ-123 をラット大脳に直接投与後の脳内残存量の時間推移を解析した結果、半減期約 100 min で排出された。さらに TCA 及び BQ-123 の BBB 排出は相互に障害が観察された。速度論的解析の結果、Km 値と Ki 値が一致しなかったことから、BQ-123 と TCA の BBB 排出は少なくとも一部異なる輸送系を介していることが推定された。一方、Octreotide の脳からの排出速度は極めて遅いことが示された。

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 の実体である脳毛細血管内皮細胞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。そこでラット単離脳毛細血管から調製した poly A⁺ RNA と、肝臓において TCA や BQ-123 に対する輸送担体と考えられている oatp (organic anion transporting polypeptide) を始めとする幾つかの輸送担体のプライマーを用い、BBB における発現を RT-PCR 法を用いて解析した。その結

果、oatp2 と 99.2%の相同性を有する断片が増幅された。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 あるいはそれと極めて近い輸送担体の関与が示唆された。

3. BCSFB における E1S、E217bG の排出輸送系の解析

BCSFB は BBB に加えて、脳と血液を隔離するもう一つの関門である。BCSFB の実体である脈絡叢上皮細胞にはグルクロン酸抱合酵素が高発現していることから E1S、E217bG 等の抱合型ステロイドの脳排出に BCSFB が関与している可能性が考えられる。ラット脳室内投与実験の結果、E1S、E217bG は各々、半減期 3.9 分、4.2 分で脳脊髄液 (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結果、輸送速度は飽和性を示し、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 OAT (organic anion transporter 3) の基質であるパラアミノ馬尿酸 (PAH) によって E1S の輸送速度は阻害されなかった。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。一方、E217bG の単離脈絡叢に対する取り込みは飽和性を示し、その Km 値は oatp1 oocyte 発現系への E217bG の Km 値とほぼ一致した。E217bG 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は阻害されたが、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、E1S 及び E217bG 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。

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 E217bG を基質とし、肺に最も高発現が報告されている輸送担体である。そこで BCSFB における E217bG 排出機構に MRP1 の関与の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。ラット単離脈絡叢と肺から調製した poly A+ RNA と MRP1 のプライマーを用いて半定量的 PCR 解析を行なった結果、脈絡叢には MRP1 の高発現臓器である肺の 4~5 倍の MRP1 mRNA が検出された。さらにラット単離脈絡叢と肺を用い、抗 MRP1 抗体を用いて Western blot を行った結果、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。

以上の結果から、BBB と BCSFB には、ペプチド性薬物である BQ-123、そして E1S、E217bG 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胆汁酸感受性の担体輸送系が機能していることが示唆された。BCSFB における E1S、E217bG の排出には少なくとも一部、*oatp1* が関与していることが示唆された。一方、BBB における BQ-123 の排出にも、*oatp family* が関与している可能性が示された。これらの知見は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の脳への送達法を開発する上で重要であり、博士（薬学）の学位を授与するのに値するものと認めた。