

## 論文内容の要旨

### Characterization of novel transporters expressed in the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier, rat Oatp14 and human OATP-F (血液脳関門、血液脳脊髄液関門における新規輸送担体、rat Oatp14、及び human OATP-F の機能解析)

杉山大介

#### 【序】

血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞により構成され、内皮細胞の細胞間には tight junction により結合されており、更に fenestra, pinocytosis が存在しないという特徴を有している。従って、循環血中の化合物が中枢へ移行するためには経細胞輸送を介さなければならず、水溶性の高いまたは分子量の大きい化合物など、細胞膜への分配が小さい化合物の脳内への移行は小さい。水溶性の高いアミノ酸やグルコースなどの栄養物質はトランスポーターと呼ばれる膜蛋白により血液中から中枢神経系へと供給される。一方、脳毛細血管内皮細胞には異物の汲み出しを行っているトランスポーターも存在しており、これら異物排泄に関わるトランスポーターは中枢神経系を異物の侵入から守るバリアー機構の一つと考えられている (Fig. 1)。特に脂溶性の高い中性・カチオン性化合物の場合、血管側膜に発現する P-glycoprotein (Mdr1) により、その中枢移行は著しく制限される。一方、アニオン性化合物については、*in vivo* 並びに *in vitro* での輸送実験

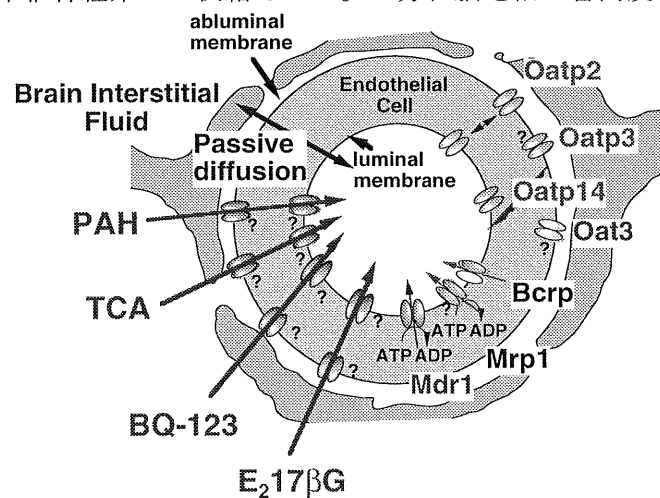


Fig. 1 Transport Systems at the BBB

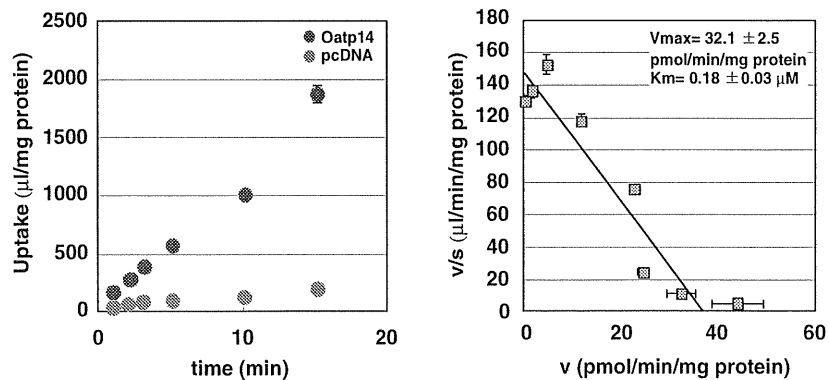
に基づいて、脳毛細血管内皮細胞における *p*-アミノ馬尿酸(PAH)、taurocholate、BQ-123 などのアニオン性化合物に対応する排出輸送機構の存在、及びいくつかの有機アニオントランスポーターの存在が報告されてきた。特に Organic anion transporting polypeptide 2(Oatp2) は脳毛細血管内皮細胞の脳側・血管側の両細胞膜に発現しており、細胞内への取り込み・細胞内からの排出の両方向に働きうるトランスポーターである。私は既にステロイドのグルクロン酸抱合体である 17 $\beta$  estradiol-D-17 $\beta$ -glucuronide (E<sub>2</sub>17 $\beta$ G)の脳内からの排出において、一部が Oatp2 により説明されること<sup>(1)</sup>、及び Multidrug resistance associated protein 1(Mrp1) が E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の血管側からの排出に関与していること<sup>(2)</sup>を報告している。しかし阻害実験の結果から、E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の脳内からの排出はこれらトランスポーターのみで完全には説明できなかった。そこで、私はその排出を担う有機アニオントランスポーターの同定を目的とし脳毛細血管内皮細胞に高発現していることが報告されていた rat Oatp14 とそのヒトホモログである human OATP-F の機能解析に取り組んだ。

#### 【rat Oatp14 の機能解析】

**rat Oatp14 の組織分布** Oatp14 遺伝子の cDNA 断片をプローブとして用い、ラットの各組織から得られた mRNA に対して Northern Blot を行ったところ、脳において 2.6kbp 付近にバンドが検出された。また、Oatp14 の C 末の 17 残基に対して作製した抗 Oatp14 ポリクローナル抗体を用い、ラット脳、脳毛細血管、脳脈絡叢に対して Western Blot を行ったところ、脳毛細血管、及び脳脈絡叢で Oatp14 特異的なバンドが検出された。さらに、ラット小腸由来の mRNA を用いて RT-PCR を行ったところ、Oatp14 由来のバンドが検出された。免疫染色を行ったところ、rat Oatp14 が脳毛細血管内皮細胞、及び脳脈絡叢上皮細胞の血管側膜に発現していることが示された。

**rat Oatp14 の輸送特性の解析** ラット大脳から単離した mRNA から RT-PCR により Oatp14 の ORF 領域を増幅し、発現ベクターである pcDNA3.1(+)に組み込んだ。ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞にトランスフェクションすることにより、rat Oatp14 の安定発現系を作製し、種々輸送

実験を行った。最初に E<sub>2</sub>17 $\beta$ G が rat Oatp14 の基質か否かについて検討したところ、E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の Oatp14 発現細胞への取り込みは vector 発現細胞への取り込みと比較して有意に高く、その親和性は K<sub>m</sub>=10 $\mu$ M と算出さ



**Fig. 2 Time profiles and concentration dependence of the uptake of T4 by Oatp14-expressed HEK293 cells**

れ、他の Oatp family に対する  $K_m$  値<sup>(3)</sup>とほぼ同程度であることが示された。次に Oatp14 の基質特異性を明らかにするために、 $E_217\beta G$  の Oatp14 発現細胞への取り込みに対する種々化合物の影響を検討した。Oatp14 に対するプロベネシドなどの典型的な阻害剤の親和性は他の Oatp family に対する親和性とほぼ同程度であることが示されたが、甲状腺ホルモンである thyroxine (T4)の Oatp14 に対する阻害効果は非常に高く、その親和性は他の Oatp family に対する親和性と比較して非常に高いことが示された。次に T4 を含めた甲状腺ホルモンや HMG-CoA 還元酵素阻害剤 cerivastatin などの Oatp14 に対する阻害効果の高かった化合物が Oatp14 の基質か否かについて検討した。Oatp14 の中性ステロイドやペプチドなどを含む種々化合物に対する輸送活性が示され、特に甲状腺ホルモンである T4、及び reverse T3 に対する非常に高い輸送活性が示された。一方、triiodothyronine (T3)の Oatp14 発現細胞への有意な取り込みは観察されたものの、その活性は T4 及び reverse T3 に比較して非常に小さいことが示された。また、T4 の Oatp14 に対する親和性は  $K_m=0.18\mu M$  と算出され、既知の Oatp family に対する親和性と比較して 50 倍以上の高親和性であることが示された (Fig. 2)。よって、その局在を考慮すると、rat Oatp14 が血液脳関門及び血液脳脊髄液関門を介した T4 輸送に関わっていることが示唆された。

甲状腺機能亢進症モデル、及び低下症モデルにおける rat Oatp14 の発現量変化 rat Oatp14 の生体における血液脳関門を介した T4 輸送への関与が示唆されたことから、甲状腺ホルモン異常の病態である甲状腺機能亢進症、及び低下症時における rat Oatp14 の脳毛細血管内皮細胞での発現量変化をそれぞれのモデル動物を用いて検討した。甲状腺機能亢進症のモデルとして、生後 6 週齢から 4 日間 T3 を皮下投与したラットを、甲状腺機能低下症のモデルとして、生後 6 週齢において甲状腺切除したラット、及び生後 6 週齢から 28 日間 0.05% methimazole (MMI)水を飲ませたラットを作製し、それぞれから脳毛細血管を単離し、RT-PCR、及び Western Blot により発現量変化を検討した。その結果、T3 投与による甲状腺亢進症モデルでの rat Oatp14 の発現量の減少、及び甲状腺切除による甲状腺低下症モデルでの発現量の増加が RT-PCR、Western Blot の両者で観察された(Fig. 3)。甲状腺ホルモンの血中濃度は甲状腺亢進症時では上昇し、甲状腺低下症時では下降することから、rat Oatp14 の発現量が甲状腺ホルモンで制御されていることが示唆され、さらにその発現量変化から、rat Oatp14 が血液脳関門を介した血中から脳内への中枢移行に関わっていることが示唆された。

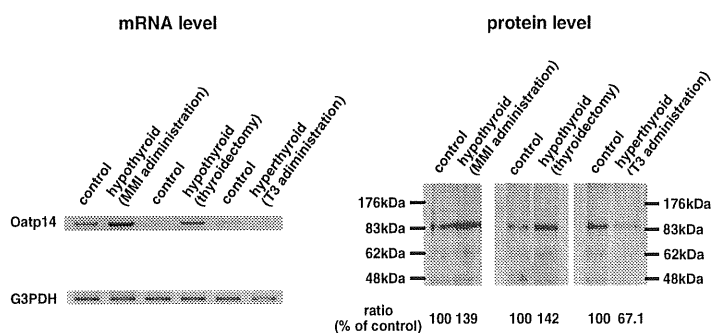


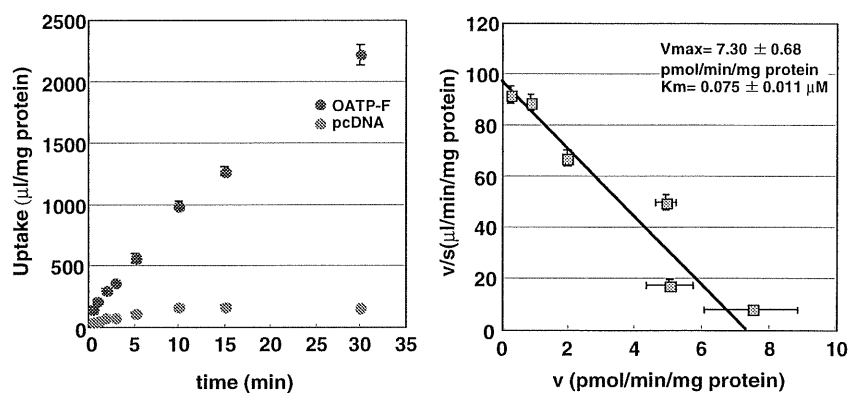
Fig. 3 Comparison of the expression level of rat Oatp14 on the BBB in hyperthyroid and hypothyroid condition

【human OATP-F の機能解析】

**human OATP-F の組織分布** ヒト各組織から調製された cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、脳由来の cDNA から強いバンドが検出され、また空腸由来の cDNA からバンドが検出された。よって、human OATP-F は rat Oatp14 と同様に脳、及び小腸に高発現していることが示された。さらに免疫染色の結果から、human OATP-F が脳毛細血管内皮細胞、及び脳脈絡叢上皮細胞の血管側膜に発現していることが示され、これらの結果から human OATP-F が rat Oatp14 のヒトホモログであることが組織分布からも示唆された。

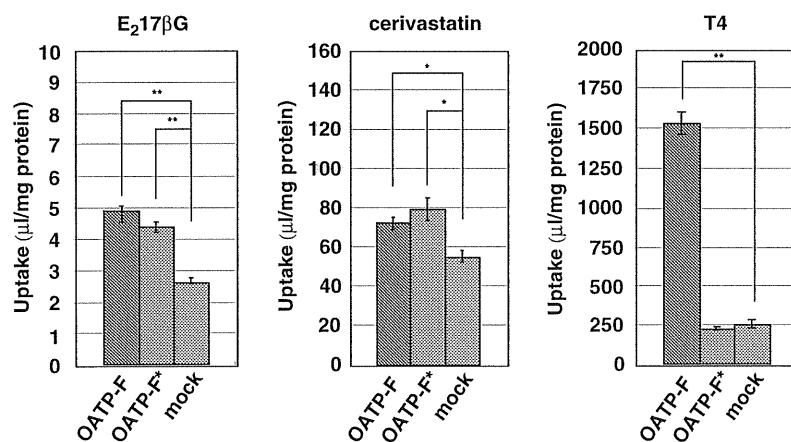
**human OATP-F の輸送特性の解析** ヒト EST データベースを検索したところ、OATP-F 類似配列を持ったクローンが数種類見つかった。Open reading frame (ORF) 領域の塩基配列を確認した結果、既

知の human OATP-F の ORF 領域の塩基配列とは 3 塩基異なるもののアミノ酸変異は伴わない塩基配列 (OATP-F)、及び 3 つのアミノ酸変異を伴う塩基配列 (OATP-F\*) の 2 種類が含まれていた。human OATP-F は、E<sub>2</sub>17βG、cerivastatin、reverse T3、



**Fig. 4 Time profiles and concentration dependence of the uptake of T4 by OATP-F-expressed HEK293 cells**

T4 などの rat Oatp14 基質に対して輸送活性を有し、特に T4 に対して非常に高い輸送活性を有していた。また、その親和性は  $K_m=0.075\mu\text{M}$  と算出され rat Oatp14 に対する親和性とほぼ同程度であり (Fig. 4)、その基質特異性からも human OATP-F が rat Oatp14 のヒトホモログであることが示唆された。一方、human OATP-F\* の場合、E<sub>2</sub>17βG、及び cerivastatin の OATP-F\* 発現細胞への取り込みは OATP-F と変わらないものの、T4 の取り込みは著しく減少した (Fig. 5)。



**Fig. 5 Comparison of the transport activity between OATP-F and OATP-F\***

OATP-F、及び OATP-F\* 発現細胞から細胞膜を調製し、Western Blot を行ったところ、約 80kDa 付近に OATP-F 特異的なバンドが検出されたことから、OATP-F、及び OATP-F\* の両者ともに膜に発現していることが示された。従って、3 つのアミノ酸変異により T4 特異的な輸

送活性の低下が生じるものと考えられる。次に OATP-F\*が有する変異の頻度を明らかにすることを目的として、90 人のヒトゲノムを対象にゲノム配列を決定した。その結果、この 3 つの変異とも 90 人のゲノムからは見つからず、この変異の頻度は小さいものと考えられる。

#### 【まとめ】

rat Oatp14 及び human OATP-F は血液脳関門、及び血液脳脊髄液関門を介した T4 の中枢移行に関与していることが示唆されたが、その寄与がどの程度であるかは今後の検討課題である。現在までに循環血中から中枢への甲状腺ホルモン輸送について詳細な研究はほとんどなく、その輸送メカニズムは全く明らかとされていない。一方、脳内において甲状腺ホルモンは脳の成長、分化に関わることが知られており、特に胎児期、及び新生児期では不可欠とされ、この時期の甲状腺ホルモン低下により知能障害や小頭症などの症状を呈することが知られている。OATP-F の脳毛細血管での役割を考慮すると、OATP-F が甲状腺ホルモンの脳内ホメオスタシスを制御するメカニズムの一つであると考えられる。よって、甲状腺ホルモン異常が原因と疑われる種々中枢性疾患における OATP-F の遺伝子変異と機能変動との関連を検討していくことが必要であり、本研究が中枢における甲状腺機能低下症の病態改善に繋がると期待している。

#### 【参考文献】

- 1). D.Sugiyama et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 298, 316-322, 2001.
- 2). D.Sugiyama et al, Pharm. Res. Submitted.
- 3). D.Sugiyama et al, Drug. Metab. Dispos. 30, 220-223, 2002.