

## 審査の結果の要旨

氏名 杉山大介

血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞により構成され、内皮細胞の細胞間は tight junction により結合されており、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。また、異物排泄に関わるトランスポーターが発現し、中枢神経系への異物の侵入を制限している。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* での輸送実験に基づいて、脳毛細血管内皮細胞における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発現が報告されてきた。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。申請者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 ( $E_217\beta G$ )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、及び Multidrug resistance associated protein 1(Mrp1)が  $E_217\beta G$  の血管側からの排出に関与していることを報告している。しかし阻害実験の結果から、 $E_217\beta G$  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、本研究で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 について研究が行われた。

### (1) 新規ラットトランスポーター(Rat Oatp14)の機能解析

Northern blot、RT-PCR、Western blot、及び免疫染色法を用い、rat Oatp14 の組織分布、局在を検討した。Rat Oatp14 は脳、及び小腸での発現が見られ、特に血液脳関門を構成する脳毛細血管内皮細胞、血液脳脊髄液関門を構成する脈絡叢上皮細胞に強く発現し、両細胞の血管側膜に局在していることが示された。

ラット大脳から Oatp14 の ORF 領域を RT-PCR により増幅し、rat Oatp14 の安定発現系を作製し、種々輸送実験を行った。 $E_217\beta G$  や HMG-CoA 還元酵素阻害剤 cerivastatin などの種々有機アニオン化合物を基質にすることが示されたが、特に甲状腺ホルモンである thyroxine (T4)の輸送活性が最も高く、その親和性は  $K_m=0.18\mu M$  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。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。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。

Rat Oatp14 の T4 輸送に対する寄与を明らかにする目的で、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 を含む他の Oatp family 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 RT-PCR、及び Western blot により検討した。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が、他の Oatp family である Oatp2、及び Oatp3 の発現量変化は観察されなかった。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、及び血液脳脊髄液関門を介した血中から脳内への中樞移行に関わっていることが示唆された。

## (2) 新規ヒトトランスポーター(Human OATP-F)の機能解析

ヒト各組織から調製された cDNA に対して 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 からもバンドが検出された。さらに免疫染色により、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た。よって、human OATP-F が rat Oatp14 のヒトホモログであることが組織分布、及び局在からも示唆された。

ヒト EST データベースを検索した結果、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 種類が含まれており、両者の遺伝子発現系をそれぞれ作製し、種々輸送実験を行った。human OATP-F は、E<sub>2</sub>17βG、cerivastatin、reverse T3、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、その輸送特性からも human OATP-F が rat Oatp14 のヒトホモログであることが示唆され、その局在を考慮すると、human OATP-F も rat Oatp14 と同様に血液脳関門、及び血液脳脊髄液関門を介した血中から脳内への中樞移行に関わってい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。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。

以上、本研究では血液脳関門、及び血液脳脊髄液関門に発現する新規トランスポーター、rat Oatp14、及び human OATP-F について検討し、以下の点を明らかにした: 1、rat Oatp14、及び human OATP-F が脳、及び小腸に発現し、特に脳毛細血管内皮細胞、脳脈絡叢上皮細胞の血管側膜に局在すること。2、rat Oatp14、及び human OATP-F が種々有機アニオン化合物を基質とし、特に甲状腺ホルモンである T4 に対して高い輸送活性を有し、その親和性は他の Oatp family と比較して非常に高親和性であること。さらに、human OATP-F において、その頻度は低いものの、T4 特異的な輸送活性の低下を生じる変異体が存在すること。3、rat Oatp14 の脳毛細血管内皮細胞での発現量が血中甲状腺ホルモン濃度により変化すること。以上の結果より、rat Oatp14、及び human OATP-F が血中から中樞への T4 輸送に大きく関与していることが示唆された。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考えられる。

以上のように、本研究は血液脳関門、及び血液脳脊髄液関門に発現し、甲状腺ホルモンを良好な基質とする新規トランスポーターを明らかにし、その寄与を病態時での発現量変化から示唆したものである。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ことから、本研究は中枢への甲状腺ホルモン輸送研究に対する端緒を開く研究であると考えられ、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。