

論文の内容の要旨

論文題目 血液脳関門・血液脳脊髄液関門を介した有機アニオンの輸送機構の解析

氏名 楠原 洋之

[序論]

中枢神経系と循環血との間は、血液脳関門ならびに血液脳脊髄液関門と呼ばれる2つの関門により隔てられている。前者は脳細胞間液と血液との間の関門であり、脳毛細血管内皮細胞により構成されている。後者は脳を浸している脳脊髄液と血液との間の関門であり、脳室に位置する小器官、脈絡叢の脈絡上皮細胞がその実体となっている。両細胞ともに細胞間隙は、密着結合(tight junction)によりシールされており細胞間隙を介した輸送は制限されているため、脳細胞間液あるいは脳脊髄液と循環血との間の物質交換は経細胞輸送を介して行われる。老廃物、薬物・異物の脳内あるいは脳脊髄液内からの排泄を促進するために、両関門には能動的に異物を脳内から循環血中へと排泄する機構が備わっている。薬物の中枢移行性を改善する、あるいは中枢の副作用を抑制するためには、こうした排出輸送機構の特性を利用し関門を介した薬物輸送を制御することが必要である。

私の研究は、血液脳関門・血液脳脊髄液関門を介した異物排泄機構のうち、特に有機アニオンを基質とするものに焦点をあて、その分子種を明らかにすることを目的とした。

[本論]

1. 有機アニオントランスポーター(Oat3)のクローニングと機能解析

脳内に水溶性の低分子有機アニオンである *p*-aminohippurate (PAH) を投与すると、脳内から速やかに消失する。その消失は飽和性を示し、血液脳関門には PAH など水溶性の有機アニオンの排出を行うトランスポーターが存在することが示唆されていた。PAH は尿管分泌により尿中へその大部分が排泄される典型的な有機アニオンである。そこで、腎近位尿細管に発現される有機アニオントランスポーター(Oat1)のアイソフォームがこの PAH の脳内からの排出に関与していると仮定し、ホモロジークローニングにより、脳に発現するアイソフォームの検索を行った。Oat1 ならびに Oat1 と同源性を示す既知トランスポーター(Oat2, Oct1)に保存されている領域に対して設計した degenerate primer を用いて、ラット脳から調製した RNA を用いて RT-PCR を行った。Oat1 とアミノ酸配列で 55% の同源性を有する部分配列を得た。この部分配列をプローブとして、ラット腎臓から調製した cDNA library から全長のクローニングを行った。最終的に、推定 ORF は 1608 塩基からなり、536 個のアミノ酸から成る cDNA を単離した。Oat1 との同源性は、アミノ酸

レベルで 49%であった。Northern blot を行ったところ腎臓、肝臓、脳、眼に発現が見られた。更に、アフリカツメガエル卵母細胞に Oat3 を発現させ、基質薬物の探索を行った。その結果、PAH の他 ochratoxin A (mycotoxin), estrone sulfate や有機カチオンであるが、cimetidine も基質となることが明らかになった。cimetidine は従来から有機アニオン・カチオントランスポーターの両者に認識される化合物として知られていたが、Oat3 は初めて cimetidine を基質とすることが示された有機アニオントランスポーターである。Oat3 は estrone sulfate や ochratoxin A に対する K_m 値が小さく、また輸送活性が大きかった。Oat3 を介した estrone sulfate の取り込みは Na^+ 非依存的であった。また、Oat1 は対向輸送を行うが、Oat3 の場合にはあらかじめ細胞内に標識薬物をプレロードした後、バッファー中に非標識体を加えても細胞内からの排出は促進されなかった。反対に、非標識体をプレロードしても、標識体の取り込み初速度は促進されなかったことから、Oat3 は Oat1 とは異なる輸送特性を有していることが示唆された。Oat3 は benzylpenicillin をはじめとする有機アニオンで阻害されるものの、肝臓に発現される有機アニオントランスポーター(Oatp)の基質となる胆汁酸や digoxin による阻害効果は弱いかほとんど観察されなかった。また、tetraethylammonium などの有機カチオントランスポーター(Oct)の基質でも阻害されなかった。酸性の神経伝達物質の代謝物は Oat3 の阻害剤となることから、基質となる可能性が示唆された。

以上、脳に発現している Oat1 のアイソフォーム(Oat3)を単離した。その基質選択性は、脂溶性の高い有機アニオンから水溶性有機アニオンまで幅広いことが明らかになった。有機カチオンである cimetidine も基質とすることが明らかになった。輸送駆動力については、現在のところ不明である。Oat3 の脳毛細血管内皮細胞、脈絡叢での発現を確認している。免疫染色の結果、Oat3 は脳毛細血管内皮細胞の脳側の細胞膜、脈絡叢では脳脊髄液側の細胞膜に局在していることが示された。速度論解析の結果 PAH や benzylpenicillin など水溶性有機アニオンの脳・脳脊髄液から細胞内への取り込みに働いていることが示唆されている。しかし、estrone sulfate や estradiol 17 β glucuronide (E217 β G)のような脂溶性の高い有機アニオンについては、後述する Oatp の寄与率が大きいことも明らかにしている。

2. 脈絡叢における有機アニオントランスポーター(Oatp3)の機能解析

脈絡叢は血液脳脊髄液関門として、脳脊髄液と血液との間の関門となっている。脳脊髄液中に E217 β G を投与すると、脳脊髄液中の交換速度を示すイヌリンよりも速い消失を示す。また、probenecid を併用することで、この脳脊髄液中の交換速度にまで低下することから、トランスポーターが E217 β G の排泄に関与していることが示唆されていた。脈絡上皮細胞の刷子縁膜には、肝臓に発現される基質多選択的な有機アニオントランスポーター-organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1)が局在していることが過去報告されており、E217 β G の脳脊髄液内からの消失は Oatp1 によるものと考えられていた。しかし、脈絡叢から調製した cDNA を鋳型として PCR を行うと、脈絡叢に発現しているアイソフォームは Oatp3 であることが明らかとなった。更に、TaqMan MGB probe を用いて real time PCR による Oatp1 と Oatp3 mRNA の発現量を定量を行い、Oatp3 の発現量の方が Oatp1 よりも著しく高いことが明らかとなった。蛋白レベルでの発現も確認し、脈絡叢では Oatp3 が刷子縁膜に局在していることも確認した。Oatp1 ならびに Oatp3 の安定発現系を作製し、その基質選択性の比較を行った。両発現系において、E217 β G の取り込みはベクター導入細胞に比較して顕著に増加しており、更に過剰量の非標識体により取り込みは飽和した。その K_m 値はそれぞれ 2.3, 1.2 μM であり、両トランスポーターで非常に近い値であった。更に、corticosterone をはじめとする 8 種類の化合物を用いて、阻害実験を行った。probenecid が若干 Oatp3 に対する親和性が低い、その他の化合物については Oatp1 ならびに Oatp3 に対する K_i 値は非常に近い値を示し、両者の基質選択性が非常に似ていることが明らかとなった。更に、脈絡叢への取り込み過程に占める Oatp3 の寄与率を評価するために、単離脈絡叢を用いた輸送実験を行った。E217 β G ならびに taurocholate の脳脊髄液側からの取り込みを測定したと

ころ、いずれも飽和性を輸送が検出されており過去の報告と一致する。また、corticosterone や indomethacin などにより、単離脈絡叢への E217βG の取り込みは阻害された。taurocholate の E217βG の単離脈絡叢への取り込みに対する K_i 値は自身の K_m 値と一致しており、E217βG と taurocholate は脈絡叢にて取り込みに関わるトランスポーターを共有していることが示唆される。遺伝子発現系で測定した速度論パラメーター(K_m 、 K_i 値)は単離脈絡叢で検出された値よりも小さく、遺伝子発現系との間に乖離が見られた。基質選択性を考慮すると、脈絡叢の刷子縁膜において脂溶性の高い有機アニオンの取り込みには Oatp3 が働いていることが推察される。速度論パラメーターの乖離については、本研究で用いた安定発現系が脈絡叢での環境を再現していない可能性が考えられる。他のトランスポーターの関与の可能性も含め、今後の検討課題である。

以上、脈絡叢刷子縁膜において Oatp3 が発現していることが確認され、脂溶性の高い有機アニオンの脳脊髄液中からの取り込みに関与していることが推察されたが、その寄与率についてはさらなる検討を必要とする。

以上、血液脳関門・血液脳脊髄液関門に発現している有機アニオントランスポーター(Oat3, Oatp3)を見いだした。Oat3 は両関門で水溶性有機アニオン排出に、Oatp3 は脈絡叢での脂溶性有機アニオンの排出に働いていることが示唆された。本トランスポーターの基質選択性を考慮することで、脳内薬物動態を改善することが可能になるものと期待される。