

# 論文の内容の要旨

論文題目 血液脳脊髄液関門における Organic Anion  
Transporter 3 (OAT3/SLC22A8)の機能解析

氏名 永田吉範

## 序論

脈絡叢は脳室に位置し、脳脊髄液の大半を産出し、脳を物理的に保護している組織である。脈絡叢の毛細血管を取り囲む脈絡上皮細胞は発達した密着結合を形成するとともに、種々の異物排泄に働くトランスポーター群が発現していることから、血液-脳脊髄液間の物質透過を制限する血液脳脊髄液関門として機能する。脈絡上皮細胞の脳脊髄液側細胞膜(刷子縁膜)には、*p*-aminohippurate (PAH)、benzylpenicillin (PCG)をはじめとする腎排泄型の有機アニオンを脳脊髄液から能動的に排出するトランスポーターの発現が示唆されてきたが、その分子実体は不明であった。

本研究では、この腎排泄型有機アニオンの排出に関わるトランスポーターとして、organic anion transporter 3 (Oat3/*Slc22a8*)に着目した。Oat3はPAHなどの水溶性有機アニオンやステロイドの硫酸抱合体など両親媒性の有機アニオン、また弱塩基性化合物であるヒスタミンH<sub>2</sub>受容体拮抗薬 cimetidineなどを基質とするなど、広範な基質選択性を示すトランスポーターである。本研究では、Oat3の脈絡叢における発現・局在および薬物輸送における重要性を明らかにする事を目的とした。

## **第1章 ラット単離脈絡叢におけるPCGおよびPAHの取り込みトランスポーターの同定**

PCG および PAH は、脈絡叢に存在する排出機構により脳脊髄液から血液へと排出される。その輸送に関するトランスポーターとして Oat1 および Oat3 の寄与率について、それぞれの遺伝子発現系ならびに単離組織(単離脈絡叢)での輸送特性を比較することで検討した。

Oat1 発現細胞においてPAHは顕著に取り込まれたが、PCGの取り込みは非発現細胞と同程度であった。Oat3 発現細胞では、両化合物とも有意な取り込みを示したが、PCGの取り込みはPAHに比べ約3倍高かった。Oat1 発現細胞へのPAHの取り込みの $K_m$ 値は $47\mu\text{M}$ 、PCGの $K_i$ 値は $800\mu\text{M}$ と、PAHの方がOat1 に対する親和性が高いのに対して、Oat3 発現細胞でのPCGの取り込みの $K_m$ 値は $83\mu\text{M}$ 、PAHの $K_i$ 値は $398\mu\text{M}$ とPCGの方がOat3 に対する親和性が高かった。さらに、Oat1 および Oat3 による取り込みに対する、各種阻害剤の効果を検討したところ、estradiol-17 $\beta$ -glucuronideおよびcimetidineはOat3 を特異的に阻害した。

Western blottingにより脈絡叢にOat3 の発現は認められたものの、Oat1 の発現は検出されなかった。更に、免疫染色により、Oat3 は脈絡叢刷子縁膜に局在していることを明らかにした。PCGおよびPAHは単離脈絡叢へ時間依存的に取り込まれたが、PCGの取り込みはPAHの取り込みに比べ3倍程度高かった。単離脈絡叢への取り込みの濃度依存性を検討したところ、 $K_m$ 値はそれぞれ111および $354\mu\text{M}$ と算出された。PCGの脈絡叢への取り込みをPAHは濃度依存的に阻害し、その $K_i$ 値は $406\mu\text{M}$ と自身の $K_m$ 値( $354\mu\text{M}$ )と一致していた。逆に、PAHの単離脈絡叢への取り込みをPCGは濃度依存的に阻害し、 $K_i$ 値は $67\mu\text{M}$ とやはり自身の $K_m$ 値( $111\mu\text{M}$ )と一致したことから、PCGとPAHは脈絡叢における取り込み機構を共有していることが示唆された。更に、阻害剤の効果を検討したところ、PCGおよびPAHの単離脈絡叢による取り込みは、Oat3 特異的な阻害剤であるestradiol-17 $\beta$ -glucuronideやcimetidineにより阻害され、両化合物の取り込みに対する $K_i$ 値は良く一致した。さらに、Oat3 発現細胞でのPCGの取り込みに対する $K_i$ 値とも一致したことから、PCGおよびPAHは脈絡叢刷子縁膜に局在するOat3 により取り込まれていると考えられた。

## **第2章 2,4-dichlorophenoxyacetateの脈絡叢取り込み過程におけるOat3 の寄与率評価**

除草剤として用いられている 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)は、中枢性の神経毒性を有していることが知られている。2,4-D は腎臓において Oat1 により効率的に取り込まれ尿中へ排泄される。2,4-D の脳脊髄液からの消失にも脈絡叢のアニオントランスポーターを介した輸送が報告されている

が、その分子実態は明らかにされていなかった。本研究では脈絡叢における取り込みに過程における Oat3 の関与について検討した。

Oat3 発現細胞では、2,4-Dについて非常に低い輸送活性しか検出できなかった。免疫染色の結果、Oat3 は LLC-PK1 細胞の基底膜に局在していることが明らかとなったことから、経細胞輸送を測定した。Oat3 発現細胞では基底膜から頂側膜方向への 2,4-Dの経細胞輸送は、反対方向に比べ 4 倍高かった。また、この経細胞輸送は飽和性を示し、 $K_m$ 値は 20  $\mu\text{M}$ であり、過去 Oat3 による PCG の取り込みに対して測定された 2,4-Dの  $K_i$ 値と一致した。コントロール細胞では経細胞輸送に方向性は認められなかった。

単離脈絡叢への 2,4-Dの取り込みは飽和性を示し、その  $K_m$ 値は 22  $\mu\text{M}$ と見積もられ、Oat3 発現細胞で測定された値と一致した。単離脈絡叢による 2,4-Dの取り込みに対する PCG、PAH、probenecid および cimetidine の阻害効果を検討した。これら化合物は、単離脈絡叢による 2,4-Dの飽和性の取り込みを阻害した。さらに、2,4-Dの取り込みに対する  $K_m$ 値および  $K_i$ 値を PCG の取り込みに対する値と比較したところおおむね一致した。単離脈絡叢による 2,4-Dの取り込みに対する PCG の阻害様式は競合阻害であった。以上の結果から 2,4-Dは Oat3 による輸送活性の低い基質ではあるが、PCGとは脈絡叢において同一の輸送機構、すなわち Oat3 により取り込まれていると考えられた。Oat3 が腎排泄型有機アニオンの排出において中心的な役割を果たしているトランスポーターであることが示唆された。

### **第3章 ヒスタミン $H_2$ 受容体拮抗薬の脈絡叢取り込み過程における Oat3 の役割**

ヒスタミン  $H_2$  受容体拮抗薬 (cimetidine、ranitidine および famotidine) は、腎の有機アニオントランスポーターおよび有機カチオントランスポーターいずれにも親和性を有する bi-substrate であることが知られている。これら  $H_2$  受容体拮抗薬の脳脊髄液中からの排出に関して Oat3 の関与およびその寄与率について検討した。

$H_2$  受容体拮抗薬は、コントロール細胞に比べ Oat3 発現細胞に有意に取り込まれた。取り込みの絶対値は cimetidine  $\approx$  ranitidine  $\gg$  famotidine であった。Oat3 発現細胞への cimetidine および ranitidine の取り込みは飽和性を示し、 $K_m$ 値は、それぞれ 80 および 120  $\mu\text{M}$ と算出された。

$H_2$  受容体拮抗薬は単離脈絡叢に時間依存的に取り込まれた。取り込みの絶対値は cimetidine  $\approx$  ranitidine  $>$  famotidine であった。有機カチオントランスポーターの代表的な基質である

tetraethylammonium (TEA)の取り込みも観察されたが、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬に比べ非常に低い輸送活性であった。単離脈絡叢へのcimetidineおよびranitidineの取り込みは飽和性を示し、K<sub>m</sub>値は、それぞれ 93 および 170 μMとOat3 発現細胞で観察された値とおおむね同様であった。単離脈絡叢へのH<sub>2</sub>受容体拮抗薬の取り込みは、Oat3の代表的基質であるPCGを添加することにより顕著に阻害され、その程度はそれぞれの自己阻害の程度と同レベルであった。一方、TEAを添加してもほとんど阻害は認められず、脈絡叢の取り込み過程への有機カチオントランスポーターの関与は小さいと考えられた。さらに、単離脈絡叢へのcimetidineの取り込みに対するOat3 の基質による阻害のK<sub>i</sub>値はPCGの取り込みに対するK<sub>i</sub>値と一致していた。

*in vivo*でラットにH<sub>2</sub>受容体拮抗薬を持続投与時の血漿中濃度は、probenecid併用による影響を受けなかったが、脳脊髄液中濃度はprobenecid併用により顕著に上昇した。この結果は、probenecidが脈絡叢でのH<sub>2</sub>受容体拮抗薬の排出輸送を阻害した結果と考えられる。probenecidの脳脊髄液中濃度はOat3 を阻害するには十分な濃度に達しており、おそらくOat3 の阻害の結果により脳脊髄液中濃度が増加したものと考えられる。bi-substrateとして特性として、組織により排出輸送に関わるトランスポーターが異なることが示唆された。

## 結果

本研究により、脈絡叢上皮細胞の刷子縁膜側においてOat3 が局在することを明らかとした。PAHやPCG、2,4-Dなど腎排泄型の水溶性有機アニオンの他、弱塩基性・塩基性であるH<sub>2</sub>受容体拮抗薬の脈絡叢への取り込みにもOat3 が中心的な役割を果たしていることを明らかとした。本研究成果は、脳(脳脊髄液)指向型の医薬品開発に有用であると考えている。また、薬物によっては血中濃度に影響を与えず、中枢の薬物濃度のみ影響を与える薬物間相互作用が生じ得ることを示した。そうした薬物間相互作用の予測、あるいは検証など臨床研究についても貢献できるものと考えている。