

審査の結果の要旨

氏名 永田 吉範

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H₂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。

(1) 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47μM、PCGのK_i値は800μM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83μM、PAHのK_i値は398μM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 β -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 μ 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 μ Mと自身の K_m 値(354 μ 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 μ Mとやはり自身の K_m 値(111 μ 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 β -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。

(2) 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 μ 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 μM 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。

(3) 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 μM 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_2 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_m 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_2 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_i 値はPCGの取り込みに対する K_i 値と一致していた。

*in vivo*でラットにH₂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H₂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。

以上、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H₂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。

本研究は脈絡叢における薬物、特に水溶性有機アニオン及びヒスタミンH₂受容体拮抗薬、の輸送機構解明に大きく貢献した研究であると考えられ、博士(薬学)の学位に値するものと認めた。