

論文の内容の要旨

論文題目 **Investigation of drug transporters determining the permeability across the blood-brain barrier**

(医薬品の血液脳関門透過性を支配する薬物トランスポーターの解析)

氏名 尾瀬 淳

序論

血液脳関門は血液から脳内への物質移行を制限し、脳の恒常性を維持する上で重要な役割を担っている。血液脳関門の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、細胞間に形成されている高度に発達した **tight junction** による拡散バリアと、管腔側細胞膜に発現する **P-gp** や **Bcrp** による能動的くみ出しを特徴とする。さらに有機アニオントランスポーター **Oatp1a4** や **Oat3** は脳毛細血管の脳側細胞膜に発現し、アニオン性薬物の脳実質内からの排泄を促進することが示唆されている。これら血液脳関門に発現する薬物輸送機構は医薬品の脳内濃度の決定に重要な役割を果たしており、その分子実体を解明することで医薬品の脳送達の実現に貢献したり、薬物間相互作用や遺伝的要因によるトランスポーター機能変動に起因する薬剤応答性の個人差の解明により医薬品適正使用に貢献したりする。本研究では、血液脳関門に発現するトランスポーターに注目し、抗インフルエンザ薬 **oseltamivir** およびその活性体である **Ro64-0802** の排出輸送機構ならびに有機アニオントランスポーター **Oatp1a4** の役割を解明するため、ノックアウトマウスを用いた *in vivo/in situ* 試験を実施した。

1. 血液脳関門における **oseltamivir** と活性体 **Ro64-0802** の能動的排出輸送機構の解析

oseltamivir 服用後の異常行動による転落死が報道されたことを発端として、服用と異常行動との因果関係は国民的関心事となったが、まだ結論に至っていない。そこで **oseltamivir** 及び **Ro64-0802** の血液脳関門透過性および脳内暴露の支配要因となる排出輸送機構について検討した。

マウスに **oseltamivir** を静脈内投与した後、その脳内薬物量は脳毛細血管容積中の薬物量より十分に大きいことから、**oseltamivir** は血液脳関門を透過し、中枢神経系へ移行する。*Mdr1a/1b*^{-/-}マウスでは **oseltamivir** の脳-血漿濃度比の有意な上昇が認められ、*Bcrp*^{-/-}マウスにおける脳-血漿濃度比は野性

型マウスと同程度であった。すなわち、oseltamivir は血液脳関門において P-gp によるくみ出しを受けることが明らかとなった。一方 *Mdr1a/1b*^{-/-}マウス及び *Bcrp*^{-/-}マウスにおいても、Ro64-0802 の脳-血漿濃度比は野生型マウスと同程度であり、Ro64-0802 の脳分布の低さはこれらトランスポーターによるくみ出しによるものではない。oseltamivir による有害事象は若年齢層での報告例が多いとされていることから、Wistar ラットの脳における P-gp 発現量および oseltamivir の脳分布に関する加齢依存性を検討した。成体ラットに比べて幼若ラットでは、P-gp の mRNA レベル量及びタンパク量ともに低く、それに伴い oseltamivir の脳-血漿濃度比は有意に高いことを明らかにした。

Usami らはラット海馬スライスにおいて oseltamivir 及び Ro64-0802 による異常発火が起こることを示しているが、Ro64-0802 の方がより発火作用が強いことを見出している。Oat3 は脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に局在し、脳実質内からの異物排泄に働くことが示唆されており、また Ro64-0802 はその基質となる。そこで、Oat3 によるくみ出しが Ro64-0802 の脳分布を制限している要因である可能性について検討した。野生型マウスおよび *Oat3*^{-/-}マウスにおける Ro64-0802 の脳内からの排出速度を比較したところ、*Oat3*^{-/-}マウスでは、大脳皮質からの Ro64-0802 消失は遅延しており、Ro64-0802 は Oat3 によるくみ出しを受けことが明らかとなった。しかし、*Oat3*^{-/-}マウスにおいても、24 時間連続皮下投与後の Ro64-0802 の脳分布容積は脳毛細血管容積程度であった。この結果を説明する要因として、P-gp や Bcrp 以外の排出トランスポーターによる血液側でのくみ出しを仮定した。近年、新たに血液脳関門に発現していることが見いだされた ABC トランスポーター MRP4 について Ro64-0802 の脳移行に及ぼす効果を検討した。oseltamivir を 2 時間連続静脈内投与した後の Ro64-0802 の脳-血漿濃度比は、*Mrp4*^{-/-}マウスの方がわずかながら高く、さらに 24 時間連続皮下投与することで、野生型マウスとの差はより顕著となった。また、Ro64-0802 自身を 24 時間連続皮下投与した後の脳-血漿濃度比も同様の結果であった。野生型マウスおよび *Mrp4*^{-/-}マウスにおける Ro64-0802 の脳内からの排出速度の比較を行ったところ、*Mrp4*^{-/-}マウスにおいて Ro64-0802 の脳からの排出が有意に遅延することが認められた。

以上の結果から、oseltamivir は血液脳関門を透過するが、P-gp による能動的なくみ出しを受け中枢移行性が制限されていること、そして幼若ラットでは血液脳関門における P-gp の発現量は成体ラットに比べて低いため、oseltamivir の脳移行性が高いことを明らかとした。また、Ro64-0802 も血液脳関門を透過することが可能だが、その脳分布は Oat3 と MRP4 で形成されるベクトル輸送による制限を受け、見かけ上脳に分布しないことを明らかとした。

2. 血液脳関門における有機アニオントランスポーター Oatp1a4 の機能評価

OATP1A2 はヒト OATP ファミリーから初めてクローニングされたトランスポーターであり、脳において豊富に発現し、血液脳関門への発現も認められることから、薬物輸送に関わっていると考えられている。Oatp1a4 はヒト OATP1A2 のげっ歯類ホモログであり、肝臓の他、脳や脈絡叢に発現している基質多選択的有機アニオントランスポーターである。βアミロイドを過剰産生する遺伝子改変動物では、アニオン性医薬品であるスタチンやサルタンの投与は、βアミロイド蓄積ないしβアミロイドによる神経症状を軽減することが報告されている。一般的にアニオン性化合物の膜透過性は小さいことから、こうした薬物の中枢神経系の移行にはトランスポーターの関与が想定されている。そこで、血液脳関門における Oatp1a4 がアニオン性薬物の中枢移行に関わるトランスポーターの分子実体であると考え、*Oatp1a4*^{-/-}マウスを用いた薬物動態試験を行った。

免疫染色による解析の結果、Oatp1a4はマウス血液脳関門に発現し、脳毛細血管内皮細胞の脳側・血液側の両細胞膜に局在する。安定発現系を用いた *in vitro* 輸送実験により基質選択性を解析した結果、マウス Oatp1a4 は pitavastatin をはじめとするアニオン性医薬品や digoxin を基質とする。Oatp1a4^{-/-}マウスを用いて、種々アニオン性薬物の脳内からの排出速度を比較したところ、野生型マウスに比べて、Oatp1a4^{-/-}マウスでは pitavastatin、rosuvastatin、pravastatin 及び taurocholate の消失は遅延し、これら化合物の脳内から血液方向への排出輸送は主に Oatp1a4 で説明することができる。さらに、*in situ* 脳灌流法により取り込みクリアランスを測定したところ、pitavastatin、rosuvastatin、taurocholate 及び ochratoxin A の取り込みクリアランスは Oatp1a4^{-/-}マウスにおいて有意に低下したことから、それら化合物の血液から脳への輸送には Oatp1a4 が関与している。すなわち Oatp1a4 は脳内からの排出および血液中からの取り込みの両輸送過程に働く。一方、digoxin と DPDPE は Oatp1a4 基質であるにも関わらず、脳移行に対する Oatp1a4 の関与は認められなかった。これら薬物は P-gp 基質となることから、野生型マウス及び Oatp1a4^{-/-}マウスに、P-gp 阻害剤 GF120918 を静注した後、*in situ* 脳灌流法により、³H]digoxin の取り込みクリアランスを比較した。GF120918 投与群では digoxin の取り込みクリアランスは顕著に増加した。GF120918 投与群では、Oatp1a4^{-/-}マウスにおける digoxin の取り込みクリアランスは野生型マウスに比べて有意に低く、P-gp 阻害時では Oatp1a4 を介した輸送が認められた。

以上の結果から、Oatp1a4 は種々の化合物の脳内から血液の排出、血液から脳への輸送に関与していることが明らかとなった。また、digoxin では、Oatp1a4 基質であっても、P-gp による汲み出しを受けるため、血液脳関門透過性が制限されていることが明らかとなった。

結論

本研究により、oseltamivir の脳分布は P-gp による制限を受け、Ro64-0802 の脳分布は Oat3 と Mrp4 で形成されるベクトル輸送による制限を受けていることを明らかとした。これらトランスポーターの遺伝子多型や加齢に伴う輸送活性及び発現の変動が、oseltamivir 及び Ro64-0802 の脳分布を変動させ、有害作用の発現と関連する可能性が考えられる。

また、Oatp1a4 がアニオン性薬物の脳側からの排泄、血液から脳への輸送に関与していることを明らかとした。ヒトホモログ OATP1A2 は脳毛細血管の管腔側に発現していることから、医薬品の脳内への取り込みに働き、薬効の増強あるいは中枢性の副作用の回避等、創薬への応用が期待される。