

審査の結果の要旨

氏名 尾 瀬 淳

医薬品の中枢応答性は脳内の標的分子近傍の濃度によって決定される。血液と中枢神経系との間には血液脳関門が存在し、医薬品の自由な拡散が制限されているため、血液脳関門透過性は中枢応答性を決定する重要な要因である。血液脳関門は拡散バリアとして機能するだけでなく、P-glycoprotein (P-gp/MDR1) や BCRP/ABCG2 など異物排泄トランスポーターによる能動的な汲み出しにより能動的バリアとしても機能する。そのため薬物の血液脳関門透過性は排出トランスポーターの基質選択性も考慮する必要があり、中枢薬の開発を困難にしている要因となっている。トランスポーターにより、中枢神経系の移行が抑制されている場合、併用薬あるいは遺伝的要因に伴うトランスポーター機能の個人差は、薬剤応答性の個人差にも繋がる。創薬の観点からだけでなく、市販後での適性使用においても、対象薬物の血液脳関門透過機構を明らかにすることは重要な研究課題である。本研究では、申請者は抗インフルエンザ薬 oseltamivir およびその活性体である Ro64-0802 に注目し、血液脳関門における排出輸送機構(Part-I)、ならびに有機アニオントランスポーター Oatp1a4 の薬物輸送における役割 (Part-II) を解明した。

Part-I では、oseltamivir に注目した試験が行われた。疫学調査では最終的に結論づけるに至らなかったが、インフルエンザ患者において、oseltamivir 服用と異常行動との因果関係が一部で示唆されたことを鑑み、oseltamivir とその活性体 Ro64-0802 が血液脳関門を透過し、中枢神経系に到達するのか、ラットならびにマウスを用いて検討した。マウスに oseltamivir を静脈内投与した後の脳内薬物量は、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ことを示した。P-gp を欠く *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。一方 *Mdr1a/1b*^{-/-}マウスおよび *Bcrp*^{-/-}マウスにおいても、Ro64-0802 の脳-血漿濃度比は野性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ことを示した。次に、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。幼若ラット(11日齢まで)では、成体ラットに比べて P-gp の mRNA レベル量およ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(6日齢まで)を明ら

かとしている。P-gp による汲み出しが、加齢依存的な oseltamivir の中枢作用を説明できる可能性を示唆した。

Oseltamivir こと異なり、加水分解を受け、カルボキシル基が露出した活性他 Ro64-0802 の脳分布容積は毛細血管管腔内容積であり、ほとんど中枢神経系の移行は無視できる程度である。私が主宰する分子薬物動態学教室の伊藤らの解析によると、Ro64-0802 は腎有機アニオントランスポーターOat3 の基質となる。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きたことから、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 の消失は顕著に遅延した。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。そこで管腔側での排出トランスポーターによるくみ出しを仮定した。*Mdr1a/1b*^{-/-}マウスおよび *Bcrp*^{-/-}マウスでは、Ro64-0802 の脳-血漿濃度比は野生型と同程度であったことから、Oat3 と同じく腎刷子縁膜に発現し尿中への薬物輸送に関わる Mrp4 が血液脳関門に発現していることに注目した。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。この時間依存性は、Ro64-0802 は極性が高く脂質膜透過能が高くないため、有意な蓄積を検出するために時間がかかるためと考察している。Ro64-0802 の脳内からの排出速度も、*Mrp4*^{-/-}マウスでは有意に遅延することを見いだしている。

以上の結果から、oseltamivir は血液脳関門を透過し、中枢神経系へと到達するものの、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、成体に比べて oseltamivir の脳曝露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ものの、Mrp4 による汲み出しを受けるためみかけ上中枢神経系の移行が認められないことを明らかにした。特に後者においては、Oat3 とともに血液脳関門を介した経細胞輸送において方向性輸送を形成していることを明らかにした。血液脳関門の異物排出において、このように取り込みと排出のトランスポーターを同定したのは、本研究が初めてである。

Part-II では、血液脳関門に発現する有機アニオントランスポーターOatp1a4 に焦点をあて、薬物輸送における重要性を解明した。Oatp1a4 は能動的に薬物を細胞内へ取り込むトランスポーターであり、分子薬物動態学教室において、阻害剤を使い脳内からのアニオン性化合

物の排出に働いていることを示唆する結果を報告している。申請者は、*Oatp1a4*^{-/-}マウスを用いた *in situ/in vivo* での試験で、血液から中枢神経系の移行、脳実質内から血液中への排出の両輸送過程に関わることを明らかにした。

Oatp1a4 はラットでは脳側細胞膜に大部分局在していることが報告されているが、*Oatp1a4* はマウス脳毛細血管内皮細胞の脳側および血液側の両細胞膜に局在していることを免疫染色により明らかにした。安定発現系を用いた *in vitro* 輸送実験により、*pitavastatin* をはじめとする種々アニオン性医薬品や *digoxin* が *Oatp1a4* 基質となることを示した。In vitro で基質となることが確認されたアニオン性薬物を大脳皮質に直接投与し、その消失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* および *taurocholate* の消失は顕著に遅延し、*pravastatin* においても有意な遅延が観察された。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* で説明可能であることを示している。さらに、*in situ* 脳灌流法により脳取り込みクリアランスを測定したところ、*pitavastatin*、*rosuvastatin*、*taurocholate* および *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。これら化合物の血液から脳への輸送には *Oatp1a4* が関与する。すなわち *Oatp1a4* は血液脳関門において、脳内からのアニオン性薬物の排出に働くだけでなく、血液中からの薬物の取り込みにも働くトランスポーターであることが明らかとなった。*digoxin* と DPDPE は *Oatp1a4* 基質であるにも関わらず、野生型マウスと *Oatp1a4*^{-/-}マウスでは、脳移行は同程度であった。これら薬物は P-gp 基質となり、血液脳関門において能動的なくみ出しを受ける。そこで P-gp 阻害剤 GF120918 を投与し、P-gp 阻害時での脳移行を *in situ* 脳灌流法により比較した。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ていた。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するユニークな特性を有していることを明らかとした。また、*digoxin* など、一部の薬物は管腔側での汲み出しのため、*Oatp1a4* を介した中枢移行が制限されており、排出トランスポーターがフィルターとして、中枢神経系へと送達する基質を選別している可能性を示唆した。*Oatp1a4* のヒトホモログ OATP1A2 は脳毛細血管の管腔側に発現していることから、OATP1A2 は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、創薬への応用が可能であることを示している。

本研究は、血液脳関門における排出トランスポーターが *oseltamivir* および Ro64-0802 の脳内濃度を決定する要因となることを明らかにした。年齢や遺伝子多型等により生じるこ

れらトランスポーターによる排出輸送活性の個体間変動が、中枢応答性の個人間変動と関連しうる。また、血液脳関門において、多様な化合物を基質とすることができる Oatp1a4 が血液中からの薬物の取り込みに関与することを明らかにし、薬物の脳送達を可能とする標的分子の1つとなるものと期待される。

上記の通り、本研究は薬物動態領域の研究発展ならびに中枢性医薬品の創製および適正使用に大きく貢献するものであり、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。