

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 ウー チョンヨン

中枢神経系 (CNS) 医薬品の開発成功確率は他の疾患領域と比較して低く、成功確率を改善するための手法が求められている。CNS では、細胞間液中あるいは細胞内の非結合型薬物が、標的分子と相互作用することから、医薬品の CNS 効果は非結合型薬物濃度に依存する。CNS と血液間の物質交換が迅速に行われる場合、血液中の非結合型薬物濃度と CNS の実効濃度は等しく、血液中の非結合型薬物濃度が CNS 効果の指標となる。しかし、CNS は血液脳関門 (BBB) と呼ばれる関門により血液とは隔てられているため、CNS の非結合型薬物濃度と血液中の非結合型薬物濃度との間には乖離が存在する場合がある。BBB を形成する脳毛細血管内皮細胞は、細胞間に発達した **tight junction** を形成しているため、薬物をはじめとして低分子化合物の細胞間隙を介した透過は制限されている。血液中から CNS への移行経路は経細胞輸送が主経路となるため、膜透過性の低い薬物 (水溶性分子、高分子量) に対して、脳毛細血管は拡散バリアとして働く。さらに、P-糖タンパク (P-gp) をはじめとするトランスポーターが医薬品を能動的に血液中へとくみ出しており、こうしたトランスポーターの基質となる薬物については、CNS の非結合型薬物濃度は血液中の非結合型薬物濃度に比較して低くなり、CNS 効果は血液中非結合型薬物濃度から期待されるほど高くはない。BBB における薬物輸送機構を明らかにすることは、CNS 医薬品を開発する上で重要な課題である。

Positron emission tomography (PET) を用いることで、非侵襲的かつ高解像度に脳内の標識薬物の分布を測定することが可能になる。受容体に対する選択的な PET 分子プローブを利用することで、これまでに CNS 作用薬の標的分子との相互作用が *in vivo* で測定されてきた。本研究は、受容体占有率 (RO) を脳内の非結合型薬物濃度の指標として利用することで、ヒト *in vivo* における BBB 透過性に関する知見を得ることを目的として行われた。PET 分子プローブの特異性、ヒト脳内受容体占有率の時間推移データが入手できること、受容体結合能を有する代謝物が生成しないことを条件として、300 を超える文献検索を行った結果、統合失調症治療薬であるドーパミン D2 受容体拮抗薬 olanzapine、haloperidol、paliperidone (risperidone の 9-OH の代謝物)、および sulpiride をモデル薬物として選択し、以下の研究が行われた。

Chapter 1 では、生理学的モデルを用いた D2 受容体拮抗薬の脳内動態解析が行われた。ヒト D2 受容体 (D2L) 過剰発現細胞から調製した膜画分を用いた *in vitro* 結合試験により、D2 受容体拮抗薬による阻害能を *in vitro* で測定した。 $[^3\text{H}]$ raclopride の結合は飽和性 ( $K_d = 1.2 \text{ nM}$  and  $B_{\text{max}} = 21.9 \pm 0.7 \text{ pmol/mg protein}$ ) を示し、非特異的な結合量は総結合の 2% 未満であることから、実験系における選択性を確認した。D2 受容体拮抗薬による  $[^3\text{H}]$ raclopride との交換は十分迅速であり、D2 受容体との結合・乖離は迅速平衡を仮定できることが確認された。また、本実験系を用いて olanzapine、haloperidol、

paliperidone および sulpiride の D2L 受容体に対する  $K_i$  値(それぞれ 8.30、1.17、2.70 および 15.6 nM)が測定された。

血液と脳毛細血管管腔内スペース、CNS の3つのコンパートメントからなる速度論(PK)モデルを構築し、脳内の非結合型薬物濃度と *in vitro* で測定された  $K_i$  値から、受容体占有率を計算した。ヒト血漿中薬物濃度時間推移は文献値を用い、モデル化合物の物理化学的性質から BBB 透過性を推定した他、*in vitro* でラット脳ホモジネートを用いて脳内の非結合型薬物分率を測定した。BBB 透過に受動拡散( $PS_{inf} = PS_{eff}$ )のみを仮定した場合、olanzapine と haloperidol による受容体占有率の予測値は実測値を再現できず、過小評価した。反対に、paliperidone と sulpiride による占有率は過大評価された。脳内非結合型薬物分率、BBB 透過性、血流速度などモデルで使用するパラメーターに関して感度分析を行った結果、脳内の非結合後型薬物分率や血流による影響は見られず、 $PS_{inf}/PS_{eff}$  比がもつとも影響を与える要因であることを確認した。臨床データを説明するためには、olanzapine と haloperidol の脳内への取り込み過程は排出過程の 6.9 倍と 8.2 倍高い必要があり、反対に paliperidone と sulpiride はそれぞれ 1.5 倍と 55 倍低い必要がある。すなわち olanzapine と haloperidol は BBB においてトランスポーターにより能動的に CNS へと取りこまれ、反対に paliperidone と sulpiride は能動的な排出を受けることを示唆している。Arakawa らは、PET により大脳皮質と下垂体での D2 受容体占有率を比較した結果、ヒト大脳皮質では、olanzapine および haloperidol の占有率は脳下垂体より 2-3 倍高く、sulpiride の占有率は反対に下垂体の方がはるかに高いことを報告している(J Clin Psychiatry 71:1131-7, 2010.)。下垂体とは異なり、大脳皮質では BBB が存在するため、本来は受容体占有率は下垂体での値を下回るはずである。大脳皮質の方が受容体占有率の方が高いとする本臨床試験の結果は、本研究で行われた予測計算を支持するものである。

Chapter 2 では、Chapter1 の結果を支持するため、ヒト脳毛細血管内皮細胞由来の不活化細胞(hCMEC/D3)を用いてモデル化合物の *in vitro* 輸送試験が行われた。hCMEC/D3 細胞内への olanzapine、haloperidol、risperidone、paliperidone および sulpiride 取り込みは経時的に増加し、4°Cでは取り込みが顕著に低下し、明確な温度依存性を示した。さらに、Olanzapine、haloperidol、risperidone および paliperidone の取り込みは飽和性を示し、digitonin 処理により大きく取り込みが低下することから、細胞膜上での結合の寄与は無視できることを確認した。pyrilamine などカチオン性薬物により olanzapine の細胞内取り込みは阻害されるものの、既知有機カチオントランスポーター(OCT、PMAT、MATE)の阻害剤による効果は小さく、新規の有機カチオントランスポーターの関与が示唆された。Pyrilamine は olanzapine の細胞内取り込みに対して競合的な阻害を示し、pyrilamine を予め細胞内にプレロードし、外向きの pyrilamine 濃度勾配存在下では、olanzapine、haloperidol、risperidone および paliperidone の細胞内取り込みは促進され、明確な *trans-stimulation* 効果が観察された。以上の結果は、putative pyrilamine transporter がこれら薬物の輸送にも関与していることを示唆するものである。sodium azide(代謝阻害剤)あるいは carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenyl(プロトノフォア)処理により取り込みが低下すること、な

らびに pH 依存性も観察されたことから、 $H^+$ との対抗輸送が輸送駆動力と考えられる。ICR マウスを用いた *in situ* 脳灌流法により、olanzapine、haloperidol および risperidone の BBB 透過性を評価したところ、いずれの薬物の BBB 透過性は diphenhydramine 存在下では低下した。しかし、paliperidone の BBB 透過性に対する阻害効果は認められなかった。上記の結果は、hCMEC/D3 細胞ならびにマウス BBB に、olanzapine 等を基質とするトランスポーターの発現を支持するものである。

Olanzapine や haloperidol とは異なり、risperidone と paliperidone は、BBB に発現する異物排泄トランスポーター P-gp の基質となることを確認した。P-gp 過剰発現細胞を用いた *in vitro* 細胞透過試験では、コントロール細胞に比較して有意な輸送能力が観察された他、野生型マウスと比較して、P-gp ノックアウトマウスでは olanzapine、risperidone と paliperidone の脳内分布が有意に増加した。BBB に発現する排出トランスポーター BCRP については、いずれの化合物も基質とならないことが確認された。Paliperidone による受容体占有率の過大評価は、BBB における P-gp による能動排出によるものと考えられる。Sulpiride に関しては、予測値では排出輸送が取り込み輸送を大きく上回る結果となったが、P-gp、Bcrp いずれのトランスポーターでも説明することはできず、さらなる検討を必要とする。

以上、本研究では、脳 D2 受容体占有率を脳内非結合薬物濃度の指標として利用することで、ヒト *in vivo* における薬物の BBB 透過性に関する知見を得ることができた。従来、脂溶性の高いカチオン性薬物は、単純拡散により BBB を透過すると考えられてきたが、D2 受容体拮抗薬など一部薬物については取り込み過程にはトランスポーターによる能動輸送が関与しているとする結果は、新しい知見である。当該トランスポーターは CNS 作用薬の脳送達素子として、CNS 移行性の優れた薬物の開発に貢献できることを提起している。これらの成果は薬物動態研究の進展に貢献するものであり、本研究を博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。