

## 中枢神経系における有機イオントランスポータの機能解析

京都薬科大学 藤田 卓也

### 1. はじめに

生体内のきわめて多彩かつ複雑な生命現象は、組織を構成する細胞集団の高度に統合された細胞応答の上に成立している。この機能統合には細胞間の情報伝達が必須であり、神経系、内分泌系、免疫系などが細胞外情報伝達系として知られている。一方、細胞内情報伝達系は情報伝達物質の情報を細胞内へ転換する機構であり、その反応系の発動は主として細胞膜受容体の刺激に始まる。神経系においてはシナプスを中心とした神経伝達物質による情報伝達機構の解明が特に進められており、多数の受容体や機能分子が明らかにされている。一方で近年、グリア細胞がシナプス伝達をダイナミックに制御するという「tripartite synapse (三者間シナプス)」の概念が受け入れられるようになり、グリア細胞（特にアストロサイト）が脳の情報処理・発信機能に積極的に関わっている可能性が強く示唆されている。また、神経細胞の機能維持にアストロサイトの関与が示唆され、神経伝達物質受容体の存在が次々と報告されるにつれて、その情報伝達系の解明が望まれている。演者らは、アストロサイトに発現している様々なイオンチャネル<sup>1)</sup>、有機イオントランスポータ<sup>2-5)</sup>の機能解析を通じて、中枢におけるグリア細胞（特にアストロサイト）の生理的役割の解明を目的として研究を進めており、ここ数年で得られている研究の一端を紹介する。

### 2. アストロサイトにおける PEPT2 とアミノ酸トランスポータの機能特性

演者は、1996 - 1997 年に米国ジョージア医科大学 Leibach 教授・Ganapathy 教授の研究室に留学する機会を得、その間にラット、マウス、ヒト脳 cDNA libraries より高親和性ペプチドトランスポータ PEPT2 cDNA を単離した。当時、脳における PEPT2 の機能および生理的役割に関してはほとんど不明であったことから、帰国後、まず脳における PEPT2 の機能解析を行った。まず、ラット大脳皮質より調製した synaptosomes 中へのジペプチド [<sup>14</sup>C]glycylsarcosine (Gly-Sar) の取り込みが PEPT2 を介したものであることを速度論的解析および生化学的な検討により明らかにした<sup>2)</sup>。さらに、マウス大脳皮質より神経細胞、アストロサイトを初代培養し PEPT2 を介した dipeptide の取り込み特性を検討した結果、PEPT2 の発現はニューロンではなくアストロサイトで認められること、PEPT2 の内向き H<sup>+</sup> 勾配形成には Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE) が関与していることを明らかにできた<sup>3)</sup>。アストロサイトでの PEPT2 の生理学的役割としては peptide neuromodulators の terminator 機能、あるいは種々の neuropeptides やその代謝物のシナプス間隙からの除去機能などが考えられ、事実 enkephalin の代謝産物である Phe-Leu や Tyr-Gly, kyotorphin (Tyr-Arg) などは、Gly-Sar の取り込みを高親和性に阻害する。今後は、in vivo でアストロサイトに発現している PEPT2 の機能特性解析を進めていく予定である。

一方、アストロサイトは PEPT2 以外にもグルタミン酸トランスポータをはじめとする様々な

アミノ酸トランスポータを発現しており、神経伝達の termination 機能や神経細胞への栄養供給に重要な働きを果たしていると考えられる。演者らはニューロン・アストロサイト間のグルタミン酸 - グルタミン輸送に関与しているシステム A/N アミノ酸トランスポータに注目し、その適応調節機構についてもヒトアストロサイトを用いて検討を進めており<sup>4)</sup>、脳障害時のアストロサイトの神経保護作用との関連についても明らかにしていく予定である。

### 3 . 中枢におけるジカルボン酸トランスポータの機能解析

ニューロンは、グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質の細胞内プールにおける再生産を細胞外に存在するクエン酸回路中間体を利用して行っている。-ケトグルタル酸やリンゴ酸などのクエン酸回路中間体はアストロサイトで合成された後、神経伝達物質の前駆体としてニューロンへ輸送される。一方、N-acetyl-L-aspartate (NAA) は、中枢系ではグルタミン酸に次いで豊富に存在するアミノ酸であり (1.5 - 10  $\mu\text{mol/g tissue}$ )、グリア系細胞や細胞外液中にはほとんど存在せず、ニューロン内に高濃度に存在することが明らかにされている。NAA の生理的な役割は、現在までのところほとんど明らかにされていないが、Huntington 病や Alzheimer 病などの病態時における神経障害や神経細胞死を反映してニューロン内の NAA が減少すること、虚血や脳障害時にも NAA 濃度が減少することが報告されている。また、NAA の脱アセチル化酵素である aspartoacylase II を遺伝的に欠損している Canavan 病の患者では脳内に NAA の蓄積が認められる。Aspartoacylase II はグリア細胞に特異的に発現している酵素であり、NAA の脱アセチル化のためにはグリア細胞内にこの化合物が輸送される必要がある。演者らはニューロン、アストロサイト初代培養系を用いて、両細胞がそれぞれ NaC2/NaCT、NaC3/NaDC3 と異なる Na<sup>+</sup>-依存性ジカルボン酸トランスポータを発現していること、NAA が NaC3/NaDC3 の良好な基質となることを明らかにした<sup>5,6)</sup>。興味深いことに、ニューロンに発現している NaC2/NaCT は、ヒトでは Li<sup>+</sup> の共存によりその輸送活性が大きく促進されるのに対し、げっ歯類では著しい阻害が認められる。この結果は、NaC2/NaCT が躁病治療薬として用いられている Li<sup>+</sup> の新規ターゲットとなり得る可能性を示唆しており、この点に注目して現在さらなる検討を進めている。

これまでグリア系細胞は薬理学的に重要視されてこなかったことから、神経伝達物質トランスポータ以外の研究は、ほとんどなされていない。演者は、神経化学 (科学) の分野で益々重要視されてくるグリア細胞における、受容体・チャネルの機能・発現調節タンパクとしてのトランスポータ研究を進めることで、新規作用機序を有する医薬品開発に有用な情報を還元したいと考えている。

#### 参考文献：

- 1) Oka M. et al., *Glia* **46**, 53–62 (2004).
- 2) Fujita T. et al., *Brain Res.* **997**, 52–61 (2004).
- 3) Wada M. et al., *Brain Res.* **1044**, 33–41 (2005).
- 4) Tanaka K. et al., *Neurosci. Lett.* **378**, 70–75 (2005).
- 5) Fujita T. et al., *J. Neurochem.* **93**, 706–714 (2005).
- 6) Yodoya E. et al., submitted.

## 薬物動態研究に私はどこまで関わっていけるのか？

京都薬科大学 藤田 卓也

### 1. はじめに

演者は、京都大学大学院生時代には橋田 充教授・瀬崎 仁教授のもとで高分子薬物の drug delivery system (DDS) 研究の方法論を学び、京都薬科大学に助手として赴任した後は、村西昌三教授・山本 昌教授の主宰する研究室で、薬物の消化管吸収やペプチドの経粘膜デリバリーなどの研究を進めてきた。さらに留学先である米国ジョージア医科大学では、Leibach 教授・Ganapathy 教授のもと様々なトランスポータのクローニングと機能解析に関する研究に従事することができた。多くの優れた研究者のもとで薬物動態にかかわる様々な研究を経験できたことが、現在演者が研究を進める上での大きな礎となっている。

本フォーラムでのパネルディスカッションを進めるにあたり、演者が関わっていると思われる幾つかの討論内容に関して、今後の自分自身が進めたいと考えている研究展開とあわせて述べてみたい。

### 2. 薬物の消化管吸収評価

周知のように、経口剤は最も望まれる投薬形態であり、優れた薬効を示す化合物をいかに経口製剤化するかが医薬品開発にとって重要であると製剤・動態研究者は信じている。薬効を大きく左右する薬物の吸収性の評価法に関しては、*in vivo* から *in vitro*、*in silico* に至る様々な方法論が開発されてきた。「実際の医薬品開発においては、どの評価法が best で、どこまで（最終的にはヒトの消化管吸収性まで）評価できるのか？」という議論が常になされるが、現時点では統一見解が得られていないようである。また、製薬企業においては薬物の *in vivo* 消化管吸収性評価にラット（マウス）、イヌ、サルが用いられているが、これらの種で得られる消化管吸収性 (*FaFg*) が異なる場合、ヒト消化管吸収の予測はどの動物種を用いるべきかについてもケースバイケース（都合のよさそうなデータ）であることが多い。*Fh* については、それぞれの動物種での肝ミクロソームを用いることで *in vitro* から *in vivo* へスケールアップすることがほぼ可能であることから、こうした問題を整理することで *in vivo* における薬物の消化管吸収をある程度まで予測することが出来ると思われる。

#### 問題点 1 消化管吸収の種差は何によって規定されるか？

企業においては代謝安定性に優れている化合物であっても、「ラットとサルでの BA 値は低い、イヌでの BA 値は高い。では、ヒトでの BA 値は？」といったようなケースが存在する。こ

うしたケースにおいて、go or no の判断を的確に行えるようにするには、やはり各動物種における消化管の生理をしっかりと把握しておく必要があると思われるが、現状ではこうした点が必ずしも整理されているとは言い難い。従って、

各動物種の消化管の解剖学的特徴・生理学的特徴

各動物種の消化管上皮に発現しているトランスポータの発現量解析と基質認識特性

各動物種の消化管上皮に発現している代謝酵素の発現量解析と活性・基質認識特性

などをデータベース化するとともに、様々な化合物の各動物種における消化管吸収性に関してもデータベース化することで、現在ヒトにおける消化管吸収性を予測する上で confuse している諸問題の一端を明らかにできると思われる。こうしたプロジェクトの遂行は、一企業・一研究室では不可能であり、産官学一体となった研究組織の整備の必要性を感じている。

## 問題点2 消化管吸収に p-gp や bcrp、mrp2 などの排出トランスポータは関与しているのか？

消化管上皮に発現している p-gp が一部薬物については吸収障壁となり得るとの報告がなされている一方で、ベラパミルやキニジンなどの p-gp の基質となる薬物の消化管吸収性が必ずしも低いわけではないことも周知の事実である。既に上市されている医薬品においては、比較的投与量が高いため消化管管腔内での薬物濃度が高く p-gp が既に飽和していると考えられているが、探索段階では、(1) 投与量が低く、(2) 溶解度が低くかつ溶解速度も遅いという化合物が多々あり、こうした化合物が p-gp の基質である場合に p-gp が消化管吸収の障壁として働く可能性は高い。また、他の p-gp 基質となる薬物との併用を考えた場合、drug-drug interaction を引き起こす可能性も考えられる。p-gp に対する各化合物の  $K_m$  値を求めることができれば、臨床投与量での消化管吸収における p-gp の寄与を見積もることができるが、膨大な数の化合物についてこの値を求めることは非現実的であり、ある程度簡便なスクリーニング系の構築が必要である。

発現系を用いた解析は、p-gp の基質になり得るか否かを判別するには有用な系であると思われるが、薬物吸収に p-gp がどの程度寄与するかを定量的に評価することは難しい。我々は *in vivo* での消化管吸収における p-gp の寄与を明らかにする必要があるが、問題点1でも挙げたように消化管における p-gp の発現量・基質認識に関する種差に関する情報は必ずしも多くない。

さらに、近年、非イオン性界面活性剤や polyethylene glycol などが p-gp の阻害剤となり、p-gp 基質の消化管吸収性を増大させるとの報告がある。しかしながら、難溶性化合物に対する可溶化剤としてルーチンに用いられるこれらの添加剤においては、薬物の溶解度の上昇による消化管吸収性改善の効果と p-gp 阻害による吸収改善の効果を分離定量することが難しく、さらに p-gp に対する阻害機構に関しても現時点では不明である。

以上の問題は p-gp のみならず、消化管上皮に発現している他の ABC トランスポータについても同様であると思われる。消化管吸収において ABC トランスポータが障壁となる市販の薬物、化合物はほとんどなく、こうした現象を示す具体的なデータについて製薬企業より可能な限り学会発表等で公表していただければ幸いである。

### 問題点3 mdr1a/1b KO マウスや bcrp KO マウスは、消化管吸収におけるこれらトランスポーターの関与を明らかに出来るか？

問題点2と密接に関連するが、消化管吸収における ABC トランスポータの関与は mdr1a/1b KO マウスなどを用いることにより解明できると思われる。しかしながら、digoxin や cyclosporine A の脳移行が mdr1a/1b KO マウスにより有意に増加するなどとの報告はあるものの、消化管吸収における p-gp の関与を目的とした mdr1a/1b KO マウスの使用に関する報告は金沢大学・辻 教授ら (Naruhashi et al. *JPP* 53, 699 (2001))、京大病院・乾 教授ら (Yamaguchi et al. *JPET* 300, 1063 (2002)) の報告を含めて必ずしも多くない。また、こうした KO マウスの消化管における他のトランスポータや代謝酵素の発現変動に関する報告はさらに少なく、KO マウスと wild type マウスでの消化管吸収性の差異が、そのまま p-gp の関与と言い切って良いのか否かに関しては、少し考慮する必要があると思われる。

以上、消化管吸収性評価における問題点を幾つか列挙した。薬物の消化管吸収に関するこれまでのデータを生理学的特性やトランスポータや代謝酵素に関する最新の生化学・分子生物学的情報と integrate することより、新たに創生されてくる薬物の消化管吸収性の予測に還元できればと考えている。

### 3. 創薬のターゲットとしてのトランスポータ

「研究の狙いと成果、将来展望」の項でも一部述べたが、演者は中枢における受容体・チャネルとトランスポータとの機能的連関に着目した研究を進めている。ニューロンにおけるモノアミン・アミノ酸神経伝達物質を介した情報伝達は、受容体・チャネルを介して行われるが、神経細胞やアストロサイトに発現しているこれら神経伝達物質に対するトランスポータは、情報伝達の termination 機能のみならず、作用発現の機能調節も行っていると考えられる。こうしたトランスポータに対する特異的な阻害薬としては、serotonin transporter (SERT) や norepinephrine transporter (NET) の阻害薬が抗うつ薬として上市されているが、他の中枢に発現している受容体に関しても同様な方法論が適用できる可能性を探るべく、現在幾つかのトランスポータをターゲットとして研究を進めている。

また、演者の共同研究者である米国ジョージア医科大学 Ganapathy 教授は、Na<sup>+</sup>-依存性中性・塩基性アミノ酸トランスポータ ATB<sup>0,+</sup> が消化管では大腸上皮細胞に特異的に発現していること、ATB<sup>0,+</sup> が NOS 阻害剤を基質として認識することから、NOS 阻害剤の消化管吸収性を改善できる可能性を示唆している (Hatanaka et al., *JCI* 107, 1035 (2001))。また、acyclovir の valyl ester である valacyclovir は、PEPT1 の基質となるだけでなく、ATB<sup>0,+</sup> や小腸上皮細胞に豊富に存在している Na<sup>+</sup>-依存性中性アミノ酸トランスポータ ASCT2/ATB<sup>0</sup> の基質となることも明らかにしている (Umapathy et al., *Pharm. Res.* 21, 1303 (2004); Hatanaka et al. *JPET* 308, 1138 (2004))。これまで、アミノ酸トランスポータに関しては組織分布の特異性があまりない、あるいは基質特異性の問題等からトランスポータを介したドラッグデリバリーのターゲットとしてあまり注目されていなか

ったが、消化管上皮に発現しているこれらアミノ酸トランスポータは、 $\text{Na}^+$  依存性でかつ low-affinity & high-capacity type のトランスポータであることから、消化管吸収性が低い薬物の吸収性を改善するためのプロドラッグ戦略に有用なターゲットとなるかもしれない。また、我々の研究室で研究を進めているキトサンカプセルなどの大腸デリバリーのためのデバイスと組み合わせることで  $\text{ATB}^{0,+}$  を介した消化管吸収性の改善がはかれる可能性がある。

#### 4 . おわりに

演者は、ここ最近ではトランスポータ研究を中心として薬物動態研究に携わっている。自分の興味で進めてきたトランスポータ研究を、消化管吸収性評価あるいは消化管吸収改善に関する研究と組み合わせていくことで、得られる知見を少しでも社会に還元していければと思っている。