

## 血液脳関門・血液脳脊髄液関門における薬物排出メカニズム

東京大学・大学院薬学系研究科

楠原 洋之

血液脳関門・血液脳脊髄液関門は、それぞれ脳毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞により構成されている中枢の関門である。脳毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞はそれぞれ発達した密着結合を有し、細胞間隙を介した輸送が大きく制限している他、異物排泄トランスポーターによる能動的な排泄により、脳内・脳室内から速やかに異物を血液中へと排泄する。こうした排出輸送系も関門機構の一つであり、中枢における薬物濃度を決定する重要な要因となっている。薬物、特に負電荷を有する有機アニオンと呼ばれる化合物群の場合、細胞内への取り込み過程と排出過程の両方にトランスポーターが働き、効率的な方向性のある輸送（ベクトリアル輸送）を形成している。こうした関門におけるベクトル輸送解明のため研究を行ってきた。

1999年に、ラット脳から有機アニオントランスポーター、organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8)のクローニングを行った。Kakeeらのin vivoでの解析により、血液脳関門には腎排泄型の有機アニオンを基質とするトランスポーターの発現していることは示唆されていた。当時 Sekineらがクローニングした腎側底膜に発現する有機アニオントランスポーター (Oat1/Slc22a6)は腎特異的な発現を示すことから、ホモロジッククローニングを用いて脳cDNAライブラリーからクローニングしたのがOat3である。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析では、*p*-アミノ馬尿酸など水溶性有機アニオンのほか、ステロイドの抱合体など胆汁中に排泄される脂溶性の高い有機アニオンも基質とする。更に、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬も基質とすることが明らかとなった。H<sub>2</sub>受容体拮抗薬は有機アニオン・カチオントランスポーターと認識する電荷の異なるトランスポーターの基質になることが知られていたが、有機アニオントランスポーターとして始めてH<sub>2</sub>受容体拮抗薬を基質とすることを見出した。

このクローニング以降、Oat3の医薬品の体内動態に占める寄与率を評価するために主に阻害剤の選択性について、遺伝子発現系を用いて確認し、in vivoあるいは単離組織に適用し、Oat3の寄与率を推定してきた。

### 血液脳関門・血液脳脊髄液関門における薬物輸送

Oat3は血液脳関門、血液脳脊髄液関門の両方に発現し、血液脳関門では脳側（管腔側にもシグナルは検出される）、血液脳脊髄液関門では脳脊髄液側（刷子縁膜）に局在し、脳内・脳脊髄液内からの排出に関与することが示唆される。*p*-アミノ馬尿酸やbenzylpenicillinなど水溶性の有機アニオンの脳内からの排出に対してはOat3に対する阻害剤で阻害がかかることからOat3で説明可能なのに対して、estradiol 17β glucuronideなど脂溶性の高い有機アニオンの脳内からの排出に対しては*p*-アミノ馬尿酸はほとんど阻害をかけず、Oat3の寄与率は小さいことが示唆されている。脂溶性の高い有機アニオンの排出には、Oat3とは別のfamilyに属するorganic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4)が関与していることが示唆されている。

血液脳脊髄液関門においても、血液脳関門での輸送システムと類似しており、水溶性の高い有機アニオン及び H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の排出には Oat3 が中心的な働きをしており、脂溶性の高い有機アニオンは Oatp1a5 が主たる排泄経路となる。血液脳脊髄液関門の Oat3 は probenecid との相互作用により、H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の脳脊髄液中濃度が増加することを in vivo で実証した。過去、髄膜炎治療の際に、beta-lactam 系抗生物質と probenecid とを併用することで治療効果が増大することが知られていたが、腎からの排泄阻害による血中滞留性の上昇の他、血液脳脊髄液関門を介した排出阻害による協奏的な作用によるものであると考えている。抗ウイルス薬の脳脊髄液からの排出に Oat3 が関与していることが示唆されており、probenecid や benzbromarone の併用により、抗ウイルス薬の脳脊髄液中濃度の増加、ひいては薬効の増強が期待される。

### 有機アニオンの腎尿細管分泌

腎臓は腎小体から遠位尿細管までを一つの構成単位とするネフロン集合体である。腎近位尿細管は薬物の尿細管分泌で中心的な役割を果たす。腎近位尿細管の側底膜に Oat3 が局在していることを見出した。同じく Oat1 も側底膜に局在する。両トランスポーターの基質選択性を比較すると、Oat1 は特に *p*-アミノ馬尿酸など分子量の小さい有機アニオンの輸送活性が非常に高い点を特徴とする。腎組織切片を調製し、輸送実験を行った。その結果、Oat1 は *p*-アミノ馬尿酸など分子量の小さい有機アニオンの腎取り込みに関与しているのに対して、Oat3 はそれ以外の有機アニオンに対する寄与率が大きい。estrone sulfate などの有機アニオンも Oat3 により説明される。この点、Oatp が主要な役割を果たしている、血液脳関門や血液脳脊髄液関門とは異なる。

一般に、腎排泄型の医薬品の場合、そのクリアランスにはアロメトリー式が適用できることが知られており、ネフロンあたりのクリアランス能力に関しては種差が小さいとされる。H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬と probenecid との相互作用には種差が存在し、ヒトでは併用により血中からの消失に遅延が見られるのに対して、この相互作用はラットでは再現することができない。この種差は、1) OCT1 の発現に種差があること、2) OAT3 の輸送活性に種差が存在することにより説明されるものと考えている。ラットと異なり、サルでは OCT1 の発現、OAT1、OAT3 の基質選択性・輸送活性はヒトと近い特性を示すことから、相互作用の解析にはサルを用いた試験が有用である。

### 今後の課題

Oat3 あるいは Oatp など脳側のトランスポーターに関する情報は集まってきたが、これらと協奏的に働き、ペクトル輸送を形成する排出側のトランスポーターを明らかにすることが第一の目標である。脳毛細血管内皮細胞の管腔側には breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) や multidrug resistance associated protein 4 (Mrp4) などの ABC トランスポーターが発現していることが発現しており、これらが候補トランスポーターと考えられている。遺伝子欠損動物を用いて、in vivo/in situ 試験により、これらトランスポーターの関与について検討を加える。関門における異物排泄メカニズムの個人差を解析するために、PET で利用可能なプローブドラッグの探索を進める。

## 参考文献

- 1) Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem.* 274:13675-80, 1999
- 2) Nagata Y, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus. *Mol Pharmacol.* 61:982-8, 2002
- 3) Kusuhara H, Sugiyama Y Active Efflux across the Blood-Brain Barrier: Role of the Solute Carrier Family. *NeuroRx.* 2: 73-85, 2005
- 4) Hasegawa M, Kusuhara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H, Sugiyama Y. Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 746-53, 2002
- 5) Tahara H, Kusuhara H, Endou H, Koepsell H, Imaoka T, Fuse E, Sugiyama Y. A species difference in the transport activities of H<sub>2</sub> receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters. *J Pharmacol Exp Ther, in press*

## 21世紀の薬物動態学

21世紀の薬物動態学では、“in silico”が一つのキーワードになることは間違いない。これまで、“in vitro から in vivo”へが薬物動態の予測という領域でのキーワードであったが、膨大な数の化合物情報（構造、物性、in vivo/in vitro など生体データ）の蓄積を受けて、インフォマティクス的手法を用いた in silico、また、実験科学の進歩による蛋白（代謝酵素・トランスポーター）の3次元構造決定というプロセスを経て、蛋白と基質との相互作用の物理計算による相互作用・反応予測に関する in silico 予測は、実施可能であろう。

トランスポーターについては結晶化により解析された例はほとんどないが、既知の3次元構造に基づいた蛋白とのホモロジーモデリングの手法を用いた構造予測、あるいは基質となる化合物群の3次元情報から、トランスポーターと基質薬物との相互作用に必要な領域予測が進められ、ある程度の成果を挙げている。少なくとも、トランスポーター領域においては、 $K_m$  値と基質側との構造活性相関が中心となっており、あくまで親和性を決定する要因の探索が中心となっているため、本当に知りたい輸送能力 ( $V_{max}/K_m$ ) を予測する段階には至っていない。今後、この輸送能力の予測をどのように進めていくかが課題となっている。

もう一つの方向性としては、ヒトモデルを作製することであろう。分子種が明らかになったことで、組織分布・基質選択性、輸送・代謝能力に関する種差を解析することが可能になった。ラットやマウスとヒトでは、アミノ酸の不一致による蛋白機能の種差のほか、組織分布など発現制御が異なる場合がある。例えば、腎における OCT1 や BCRP の発現であり（どちらもヒトでは発現していない）である。また、Oatp のようにヒトとげっ歯類で、肝取り込みに関わる分子種が対応していない場合 (Oatp1a1 versus OATP1B1) もある。基質選択性のほか、このような種差の理解は、ヒト体内動態の予測、あるいは薬物間相互作用のメカニズム解析において、適切な動物種を選択する際に必要であろう。動物種選択の際の指標となるように、創薬の過程で利用される実験動物種については、ヒトとの種差に関する検討を系統的に進めていく必要がある。さらには、遺伝子あるいはゲノム操作技術が発展すると、実験動物が有する蛋白をヒト型に置換し、ヒトでの代謝・排泄を再現できる実験動物を作製することも実施可能と思われる。現在の技術で、標的蛋白のノックアウト・ノックダウンすることは可能であることから、ヒト型実験動物にさらに遺伝子操作を行うことで、ヒトでは倫理上実施できない毒性実験などへの応用も可能になるものと期待される。

医療への応用であるが、2000年に Hoffmeyers らが、P-glycoprotein の遺伝子多型と消化管での発現量、digoxin の血漿中濃度の AUC との間に相関を報告して以来、薬物トランスポーターの遺伝子多型に関する解析も加速してきた。P-gp はもとより、多くの薬物トランスポーターについて、アミノ酸置換を伴う変異についての解析が進められ、そのいくつかは発現量あるいは輸送機能に影響を与えることが報告され、OATP1B1 や BCRP のように、医薬品の血漿中濃度と遺伝子多型間に相関があるトランスポーターも見出されている。臨床試験での知見を増やし、体内動態

に影響を与えるような遺伝子多型を同定していくことが求められている。現状では、アミノ酸置換を伴う変異のみに焦点が当てられているが、発現量の個人差（5'側の制御領域の遺伝子多型）についても解析を進め、ORF 上の変異のみで輸送能力の個人差を説明できるのか、否か解析することは必要である。トランスポーターがテーラーメイド医療に貢献するケースとして考えられるのは、1) 抗癌剤をはじめとする治療域の狭い薬物、2) 薬効・副作用に密接に関わる場合、のいずれかのケースである。テーラーメイド医療へと貢献していくためには、それなりに規模の臨床試験を行い薬効・副作用の頻度と関連をあきらかにしていく必要がある。大学の研究室レベルで行う臨床試験では、試験のサイズにおのずと限界があることから、薬効との関連にまで踏み込んでいくのは難しい。製薬企業との共同研究をすすめる、大規模試験の中でトランスポーターの多型と薬効との重要性を明らかにしていくことが必要である。その点では、ポピュレーションファーマコキネティクスを扱う人材育成も必要であろう。

固有クリアランスの上限値は、組織への取り込み過程により決定される。そのため、取り込み過程に関わるトランスポーター機能の個人差は、血漿中濃度に反映されやすい。しかし、血中からの消失の律速段階が取り込み過程である場合、排泄側トランスポーターの多型によるトランスポーター機能の個人差は、血漿中濃度の個人差に反映されにくい。ただし、組織中濃度は排出クリアランスに反比例するため、対象とするトランスポーターが組織からの排泄経路として重要な位置を占めている場合には、組織中濃度の個人差として反映される。薬効・副作用発現臓器である場合には血中濃度では説明できない薬効の個人差として現れる。排泄側トランスポーターの遺伝子多型に関しては、血漿中濃度の時間推移と合わせて、薬効・副作用に関するバイオマーカーとの関連を議論していくことが必要である。しかし、バイオマーカーの個人差については薬物動態以外の個人差も含まれるため、統計的な有意差を得るためには規模の大きな臨床試験となることが予想される。その点、 $^{99m}\text{Tc}$  ラベルを用いた single photon emission computed tomography (SPECT) や  $^{11}\text{C}$  を用いた positron emission tomography (PET) などイメージング技術を用いることで、ヒトにおいても組織中濃度を定量することができる。核種の半減期が短いためプローブ薬には制約も多いが、既に、P-glycoprotein については種々の PET プローブが合成されており、MRP2 についても論文で報告されているプローブがある。今後 MRP4/MRP3 や BCRP など、他のトランスポーターに対する SPECT/PET プローブを開発していく必要性を感じる。特に、脳のようなクリアランス臓器ではない組織では、その組織分布の個人差は血中濃度にはほとんど反映されないため、血中濃度の測定だけでは多型との相関を議論できない。このような臓器にこそ、SPECT/PET などイメージング技術は有用である。既に、 $^{11}\text{C}$ -verapamil を用いて、P-gp については臨床試験が報告されており、cyclosporin A との併用により  $^{11}\text{C}$ -verapamil の脳内濃度が増加することが報告されている。PET・SPECT などイメージング技術を用いることで、リアルタイムで脳内濃度を領域別に測定できることから、脳内動態のモデル化など応用していきたい。 $^{11}\text{C}$  は各種の半減期が非常に短いため、合成法など種々の制約がある。この点を有機化学、分析化学の学問領域と共同で研究を進める必要がある。