薬 剤 学, **69** (6), 426–429 (2009)

≪若手研究者紹介≫

カチオン性薬物の血液脳関門輸送機構の解明をめざして：麻薬性鎮痛薬の受容体研究から血液脳関門研究

黄 倉 崇* Takashi Okura
帝京大学薬学部薬物動態学教室

1. は じ め に

血液脳関門は中枢神経疾患治療薬の開発における最大の障壁となり，ほとんどの化合物は血液から脳へ移行しない．血液脳関門を透過し，脳内で作用を発揮する中枢作用薬には，麻薬性鎮痛薬，抗うつ薬，抗ヒスタミン薬をはじめとして数多くのカチオン性薬物が存在する．脳と血液との間の物質輸送を担う輸送体として，数多くのトランスポーターが血液脳関門において同定されているが，有機カチオンの血液脳関門輸送については不明なことが多い．私は現在，カチオン性薬物の血液脳関門輸送機構の解明をめざし，帝京大学薬学部薬物動態学教室の出口芳春教授のもとで研究を進めている．本稿では現在私たちが取り組んでいる研究について紹介させていただきたい．加えて，私が血液脳関門研究を始めるに至った経緯として，これまでに取り組んできた受容体研究についても紹介させていただきたい．

2. 受容体研究との出会いと留学―インビボ受容体結合解析とオピオイド受容体

私の受容体研究との出会いは，学生時代である．当時木村良平教授が主催しておられた静岡県立大学薬学部薬剤学教室（現薬物動態学分野）で，山田静雄先生（現静岡県立大学薬学部教授）のもと，受容体研究に取り組んだ．中でも私が精力的に取り組んだのが，α_1 遮断薬のインビボ受容体結合解析である．前立腺肥大に伴う排尿困難の治療には α_1 遮断薬が用いられるが，起立性低血圧などの循環系の副作用が問題となる．従って前立腺に選択性が高く副作用の少ない薬剤が望まれていた．薬物の受容体結合活性は，発現細胞系などを用いたインビトロでの評価が主流である．しかし，インビボ条件下で薬物－受容体結合を評価することにより，薬物動態（Pharmacokinetics, PK）を包含し，薬効の発現（Pharmacodynamics, PD）を反映したより良い指標が得られると考えられる．そこで，インビボでの α_1 受容体結合測定法を確立し，α_1 遮断薬の結合動態を評価した．その結果，降圧薬としても用いられるプラゾシンは血管と前立腺のどちらの α_1 受容体にも結合するのに対し，新規 α_1 遮断薬のタムスロシンやシロドシンは血管系より前立腺の α_1 受容体に選択的かつ持続的に結合することを見出した[1]．この成果は，これら新規薬剤の臨床的有効性に科学的根拠を与えると同時に，創薬におけるインビボ受容体結合動態解析の有用性を実証している．この方法論は創薬のみならず薬剤の適正使用法の確立においても有用であると確信している．静岡県立大学において山田静雄先生を始め多くの先生方から受けた薫陶と様々なトレーニングが，現在の私の礎となっている．

私は博士課程修了後，受容体研究をさらに進めるべくアリゾナ大学（故 Henry I. Yamamura 教授，

* 岐阜県多治見市出身．1994 年静岡県立大学薬学部卒業，1999 年静岡県立大学大学院薬学研究科博士課程修了，博士（薬学）．1999～2000 年アリゾナ大学医学部博士研究員．2000～2004 年静岡県立大学薬学部薬剤学教室（現薬物動態学分野）助手．2004～2008 年帝京大学薬学部薬物動態学教室助手，2008 年同大学講師，現在に至る．趣味：テニス，純米酒，家族団欒．
連絡先：〒229–0195 神奈川県相模原市相模湖町寸沢嵐 1091–1 E-mail: okura@pharm.teikyo-u.ac.jp

以下 Hank）にポスドクとして留学した．Hank のラボでは，オピオイド受容体研究を精力的に進めていた．オピオイド受容体の down-regulation や脱感作などの細胞内で起こるイベントの機構解明[2] に加え，新規オピオイド受容体作動薬の探索研究を通して *in vitro* および *in vivo* での薬効評価のための方法論について学ぶことができた．Hank は研究と人生の楽しみ方を教えてくれた私の恩人のひとりである．

3. モルヒネと活性代謝物―微小透析法を用いた PK/PD 解析法

モルヒネなどのオピオイド受容体作動薬は，鎮痛薬として長きにわたって人類に貢献してきた．とりわけ癌疼痛コントロールに麻薬性鎮痛薬の使用は必要不可欠である．癌疼痛の激烈な痛みと患者の Quality of life（QOL）に与える影響を考えると，麻薬性鎮痛薬の適正使用は薬学人の責務ともいえる．しかし麻薬性鎮痛薬の作用発現にいたるまでの過程が完全に解明されているわけではない．例えば，モルヒネの 6 位のグルクロン酸抱合体（M6G）が強い鎮痛活性を示すことは有名であるが，どのようなメカニズムで M6G が強い鎮痛作用を発揮するのかは明らかでなかった．私は，1 年余りの留学のあと，学生時代を過ごした静岡県立大学薬学部薬剤学教室に助手として 2000 年に赴任し，モルヒネと活性代謝物の研究に着手した．当時はモルヒネのグルクロン酸抱合体の入手が不可能だったため，同大学の杉本収先生と梅原薫先生のご協力を得てモルヒネから M6G を合成するところからスタートした．同時に麻薬性鎮痛薬の薬物動態と鎮痛作用，とりわけ作用部位での薬物動態と薬理作用を同時に測定する方法として，脊髄微小透析法を用いた方法を考案した（図 1）[3,4]．すなわち，麻薬性鎮痛薬の作用部位のひとつである脊髄後角のオピオイド受容体をターゲットとし，脊髄腔内に移植した微小透析プローブを介して薬物濃度をモニターするとともに，鎮痛作用をホルマリン法により同時に測定するのである．この系を用いてモルヒネと M6G について解析したところ，M6G の用量–鎮痛作用曲線はモルヒネと比べ左にシフトしていたが，薬物濃度 – 作用曲線はモルヒネと M6G でほぼ一致した．このことは，M6G はモルヒネより少ない投与量で同等の鎮痛作用を示すが，作用部位における薬物濃度を基に評価した鎮痛活性は両薬物で同程度であることを示している．さらに，脳室内に投与したモルヒネが速やかに脳内から消失するのに対し，M6G の消失は遅く，脳のみでなく，脊髄組織にも速やかに分布し，高濃度残存することが示された．従って，M6G の強い鎮痛作用の発現は，その脳内動態に起因すると言える．また，脊髄後角における痛覚伝達物質のグルタミン酸遊離に対するモルヒネの抑制作用を，脊髄微小透析法を用いて同時に測定可能であることを実証している．私たちが確立した脊髄微小透析法を用いた PK/PD 解析法は，麻薬性鎮痛薬を含む中枢作用薬の脳内動態と作用発現を解析する方法として有用な手法である．

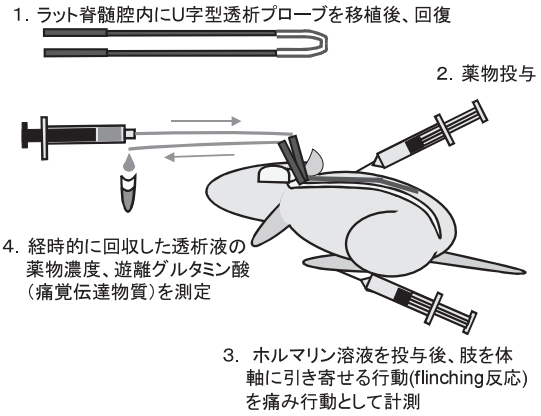

図 1　脊髄微小透析法を用いた PK/PD 同時解析法

4. そして，血液脳関門研究―カチオン性薬物の血液脳関門輸送

私が静岡県立大学に在職中，出口芳春先生との共同研究により，塩基性繊維芽成長因子の血液脳関門輸送研究[5] に携わる機会を得た．これが私の血液脳関門研究との出会いである．前述のように，モルヒネと M6G の鎮痛作用の違いは，作用部位における薬物濃度の相違に起因する．従って，麻薬性鎮痛薬を含む中枢作用薬の脳内濃度を規定する血液脳関門の働きは，中枢作用発現の規定因子となる．冒頭で述べたように，血液脳関門には様々なトランスポーターが発現し，脳内物質濃度を調節している．麻薬鎮痛薬の血液脳関門透過に関して，例えばモルヒネが P–糖タンパク質の基質となり，血液側へ排出輸送されることは良く知られている．しかしながら，血液から脳側への血液脳関門輸送についてはほとん

ど明らかにされていない．本邦で 2003 年から癌疼痛治療薬として使われているオキシコドンは，モルヒネと比較し，オピオイド受容体に対する親和性は弱いものの，強い鎮痛活性を示す．我々の共同研究者の Margareta Hammarlund-Udenaes 教授（Uppsala 大学）は，微小透析法を用いた実験から，オキシコドンの遊離形薬物濃度は，血液に比べ脳で 3 倍高いことを見出している．すなわち，オキシコドンは血液から脳側に能動的に輸送されることが示唆される．オキシコドンは生体内でカチオンとして存在するが，カチオン性薬物の脳移行に関わる輸送分子は同定されていない．オキシコドンを含めたカチオン性薬物の血液脳関門輸送をテーマとして，私は帝京大学薬学部薬物動態学教室に異動した 2004 年 10 月に血液脳関門研究を本格的に開始した．出口研究室では脳関門のモデル細胞株とインビボでの脳関門輸送解析実験系を駆使して，研究を進めている[6,7]．条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株を用いてオキシコドンの血液脳関門輸送を解析したところ，オキシコドンの初期取り込み速度は飽和性を示し，ピリラミンなどのカチオン性薬物によって阻害された．血液脳関門におけるピリラミンの輸送体の存在は 1990 年代に示唆されている．そこでオキシコドンとピリラミンとの相互作用について調べたところ，両薬物は互いに競合的な輸送阻害作用を示し，同じ輸送体を共有することが示された．さらに両薬物の血液脳関門輸送は，代謝エネルギー阻害薬により顕著に抑制され，逆向きの H^+ 濃度勾配に依存的であった．さらに，*in situ* brain perfusion 法により調べたオキシコドンの脳移行は，細胞株で得られた結果と同様，pH およびピリラミンに感受性を示した．従って，血液脳関門には有機カチオン（OC^+）と H^+ を交換輸送する OC^+/H^+ アンチポーターが存在し，オキシコドンなどのカチオン性薬物の効率的な脳移行に関与すると考えられる（図 2）．さらにオキシコドンの適正使用の観点から，鎮痛補助薬との相互作用について調べた[8]．すなわち，麻薬性鎮痛薬が効き難い神経因性疼痛などに対して併用される鎮痛補助薬（抗うつ薬や抗不整脈薬など）として多くのカチオン性薬物が用いられるため，オキシコドンの血液脳関門輸送過程における鎮痛補助薬との薬物間相互作用について調べた．その結果，アミトリプチリンなどの鎮痛補助薬は高濃度存在下ではインビトロでオキシコドンの血液脳関門輸送を阻害するものの，治療濃度域あるいは薬効発現濃度域ではインビボで薬物動態に影響を及ぼすことなく，オキシコドンの鎮痛作用を増強することが示された．

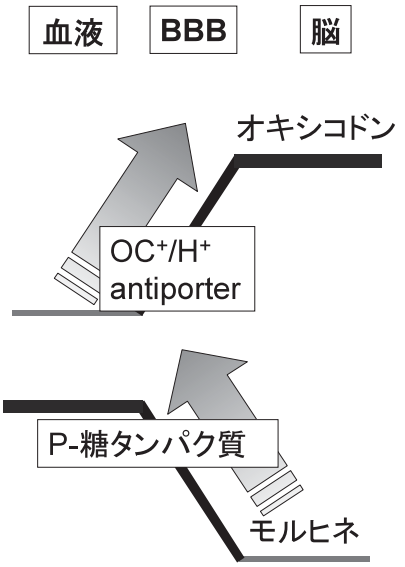

図 2　血液脳関門（BBB）におけるオキシコドンとモルヒネの輸送
オキシコドンは有機カチオン / プロトン交換輸送系により BBB を介して血液から脳側に uphill 輸送されるのに対し，モルヒネは P-糖タンパク質により血液側に輸送される．

さらに我々は，カチオン性薬物の輸送分子同定のため，血液脳関門における既知有機カチオントランスポーターの遺伝子発現プロファイルを調べ，over expression および gene silencing 法を用いて検討した．これらの結果とその輸送特性から，カチオン性薬物の血液脳関門輸送を担う OC^+/H^+ アンチポーターは，既知の有機カチオントランスポーターではなく，未同定の輸送システムであると考えて研究を進めている．

5. 血液脳関門輸送を担う新たな役者 PMAT

血液脳関門におけるカチオン性薬物の輸送体同定の過程で，興味深いトランスポーターに出くわした．2004 年に新規モノアミントランスポーターとして同定された plasma membrane monoamine transporter（PMAT/SLC29A4）が脳関門細胞で非常に高い遺伝子発現を示す結果が得られたのである．そこでラット PMAT をクローニングして輸送特性を解析したところ，PMAT は膜電位依存的に 1-methyl-4-phenylpyridinium（MPP）などの水溶性

の高い有機カチオンを輸送した．さらに，血液脳関門および血液脳脊髄液関門の細胞株でPMATが有機カチオントランスポーターとして機能することが示唆され，脳関門におけるPMATの発現と機能をインビボ実験により調べた．血液脳関門および血液脳脊髄液関門において，免疫組織化学的にPMATの発現が確認され，PMATは，血液から脳側ではなく，脳から血液側への排出輸送に関与することが示された．脳関門に発現するPMATはモノアミンなどのカチオン性神経伝達物質やカチオン性の神経毒を脳から血液側に排出し，脳内環境の維持に貢献していると考えている．モノアミンやコリンなどのカチオン性内因性物質の血液脳関門輸送機構を明らかにすることは，脳関門の持つ新たな生理的役割の解明に繋がると考えてさらに研究を進めている．

6. おわりに

以上，私が取り組んできた受容体研究から血液脳関門研究について麻薬性鎮痛薬を中心に紹介させていただいた．血液脳関門の研究，特にヒトの血液脳関門研究は未開領域が多い．私たちはヒト血液脳関門における有機カチオン輸送について，近年注目を集めている不死化ヒト脳血管内皮細胞株（hCMEC/D3）を用いて研究を進めている．さらに，血液脳関門輸送を含めた薬物動態と受容体結合を統合的に解析することで，薬物が生体に投与されてから薬理作用の発現に至るまでの過程を理解し，最適な薬物療法の実現に貢献できるものと考え，さらに研究を推進していきたいと考えている．

最後に，御指導・御鞭撻を賜りました静岡県立大学名誉教授木村良平先生，静岡県立大学薬学部教授山田静雄先生，帝京大学薬学部教授出口芳春先生に謹んで厚く御礼申し上げます．また有益なご助言をいただきました東北大学大学院薬学研究科教授寺崎哲也先生，金沢大学薬学部教授玉井郁巳先生，徳島文理大学香川薬学部准教授加藤喜久先生，現在ともに出口研で教育・研究に励んでいる加藤清香先生に深謝するとともに，日夜研究に邁進してくれた大学院・学部学生の方々に感謝いたします．

引用文献

1) S. Yamada, T. Ohkura, Y. Deguchi, R. Kimura, *In vivo* measurement by [^{3}H]tamsulosin of α_1-adrenoceptors in rat tissues in relation to the pharmacokinetics, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 1575–1583 (1999).
2) T. Okura, E. V. Varga, Y. Hosohata, E. Navratilova, S. M. Cowell, K. Rice, H. Nagase, V. J. Hruby, W. R. Roeske, H. I. Yamamura, Agonist-specific down-regulation of the human δ-opioid receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, **459**, 9–16 (2003).
3) T. Okura, M. Saito, M. Nakanishi, N. Komiyama, A. Fujii, S. Yamada, R. Kimura, Different distribution of morphine and morphine-6β-glucuronide after intracerebroventricular injection in rats, *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 211–217 (2003).
4) T. Okura, N. Komiyama, Y. Morita, Y. Deguchi, S. Yamada, Comparative evaluation of antinociceptive potency of morphine and morphine-6β-glucuronide by simultaneous measurements of spinal concentration, *Life Sci.*, **80**, 1319–1326 (2007).
5) Y. Deguchi, H. Okutsu, T. Okura, S. Yamada, R. Kimura, T. Yuge, A. Furukawa, K. Morimoto, M. Tachikawa, S. Ohtsuki, K. Hosoya, T. Terasaki, Internalization of basic fibroblast growth factor at the mouse blood-brain barrier involves perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, *J. Neurochem.*, **83**, 381–389 (2002).
6) T. Okura, R. Ito, N. Ishiguro, I. Tamai, Y. Deguchi, Blood-brain barrier transport of pramipexole, a dopamine D_2 agonist, *Life Sci.*, **80**, 1564–1571 (2007).
7) T. Okura, A. Hattori, Y. Takano, T. Sato, M. Hammarlund-Udenaes, T. Terasaki, Y. Deguchi, Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone, *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 2005–2013 (2008).
8) Y. Nakazawa, T. Okura, K. Shimomura, T. Terasaki, Y. Deguchi, Drug-drug interaction between oxycodone and adjuvant analgesics in blood-brain barrier transport and antinociceptive effect, *J. Pharm. Sci.*, in press.