薬 剤 学, **69** (6), 430–434 (2009)

≪若手研究者紹介≫

血液網膜関門トランスポーターの生理機能と薬物輸送への関与

登 美 斉 俊* Masatoshi Tomi
慶應義塾大学薬学部薬剤学講座

1. は じ め に

血液組織関門は循環血液から組織への薬物移行性を決定するため，生物薬剤学的に重要である．血液脳関門は特に有名であるが，その他にも血液網膜関門（Blood-Retinal Barrier：BRB），血液房水関門，血液胎盤関門，血液精巣関門などが存在する．血液組織関門が存在する組織の共通点は，組織内を一定環境におくことが特に厳密に求められる点である．“関門”を構成する組織としては小腸や皮膚も挙げられるが，これらは異物からの防御の最前線部隊として位置づけられる．一方で，血液組織関門は重要組織に対する最後の砦となる“親衛隊”として位置づけられる．ベールに包まれている親衛隊の実力を知ることは非常に困難であるように，血液組織関門も解析対象が微小であり，詳細な機能解析には障害が多い．筆者は東北大学薬学部（寺崎哲也教授）に学部生・大学院生として所属し，その後富山大学薬学部（細谷健一教授）に勤務したが，その多くを BRB におけるベールを剥ぎ，その実力を解明することに費やしてきた．

網膜は光の物理的エネルギーを電気信号に変換して脳に伝達する神経組織であり，神経細胞はイオンや神経伝達物質の細胞膜を挟んだ移動によって情報伝達を行っている．正確な情報伝達には，物質の移動や分布は厳密に制御される必要がある．さらに，BRB の破綻は恒常性の破綻につながるため，糖尿病網膜症，未熟児網膜症，高血圧性網膜症の進行には BRB の破綻が深く関与している．したがって，BRB 輸送機構を明らかにすることは，網膜組織の恒常性維持機構を明らかにする上で極めて重要である．点眼薬物はほとんど網膜には到達しないため，網膜への薬物送達を目指す上でも BRB 輸送機構の解明は極めて重要である．本稿では BRB トランスポーターが組織機能維持および薬物輸送において決定的役割を果たしていることを紹介したい．

2. 血液網膜関門（BRB）の実体と研究の進展

BRB に関する最初の報告は，1913 年，静脈内投与した色素が網膜を染色しないことを示した Schnaudigel の報告である．1960 年代における電子顕微鏡解析の進展により，1966 年に網膜毛細血管内皮細胞において，さらに 1970 年には網膜色素上皮細胞においても密着結合の存在が示された．これら報告により，BRB は網膜毛細血管内皮細胞を実体とする inner BRB と網膜色素上皮細胞を実体とする outer BRB によって構成されることが明らかになった（図 1）．

筆者が薬学部 4 年生として研究活動を開始したのは 1997 年である．当時，outer BRB については網膜色素上皮細胞が単層膜構造をとるために単離が比較的容易であり，輸送機構の解析も比較的進んでいた．一方で inner BRB は，微小組織である網膜中に分散して存在する毛細血管の調製に困難を伴う．

*1998 年 3 月東北大学薬学部卒，2001 年 3 月東北大学大学院薬学研究科博士後期課程中退，同年 4 月富山医科薬科大学（2005 年 10 月大学統合に伴い富山大学）薬学部助手，2004 年 1 月博士（薬学）（東北大学），2006 年 4 月カリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部博士研究員，2009 年 1 月慶應義塾大学薬学部講師，現在に至る．研究では，挑戦を忘れないよう自身に常に言い聞かせている．プライベートでは，今年生まれた娘との時間がとても楽しい．連絡先：〒 105–8512　東京都港区芝公園 1–5–30　E-mail: tomi-ms@pha.keio.ac.jp

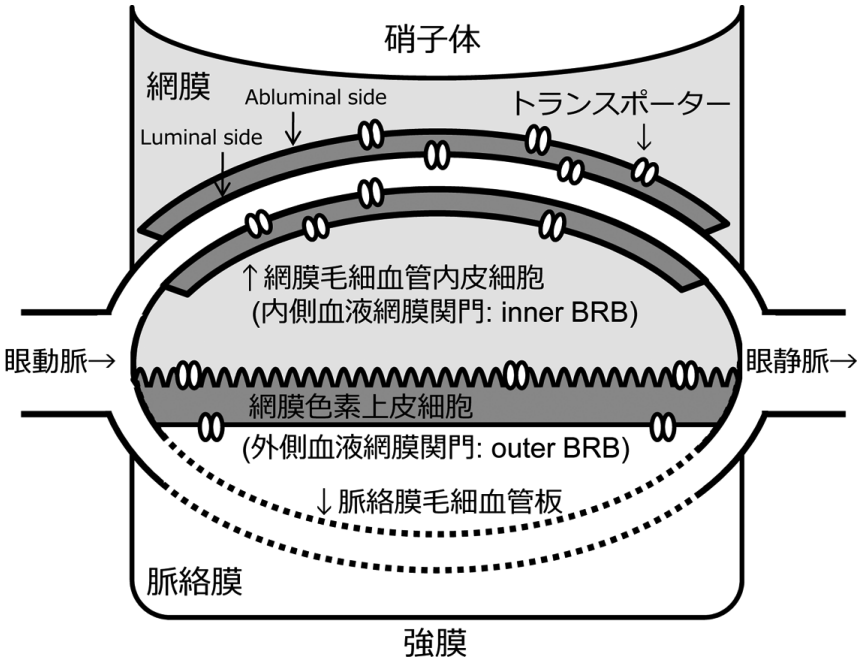

図 1　循環血液と網膜間の物質透過における血液網膜関門（BRB）の役割
網膜血管は網膜の内側のみに分布し，inner BRB を構成する．網膜色素上皮細胞は網膜の最外部に位置して outer BRB を構成し，血管に富む脈絡膜との間の物質透過を制御する．

Inner BRB 輸送機構は依然としてベールに包まれていたため，その解明に意義を感じたのが研究を開始したきっかけである．新しい研究課題を担当できたことで筆者の研究意欲は著しく高まり，大学での研究生活にはまっていくこととなった．したがって，この研究課題設定は筆者にとって大いなる幸運であった．

微小組織である inner BRB における輸送機構を詳細に解析するにはモデル細胞株が有用であり，筆者らはまずモデル細胞株である TR-iBRB 細胞を樹立し，2001 年に発表した[1]．その後，網膜血管内皮細胞の高純度単離法（2004 年）[2] およびマイクロダイアリシスプローブを用いたラット BRB 輸送機構解析法（2006 年）の確立[3] 等を通して，inner BRB におけるトランスポーターの発現および機能を明らかにしてきた．

3. エネルギー供給・維持における inner BRB の役割

神経組織はその活動に大量のエネルギーを必要とし，安定的なエネルギー供給は視覚維持に不可欠である．そのためグルコース輸送機構研究は比較的進んでおり，1990 年には促進拡散型グルコーストランスポーターである GLUT1 が inner BRB の血管側および網膜側に発現することが報告されている．一方で，GLUT3 の inner BRB における発現を示す報告もあり，主たる役割を果たすサブタイプは不明確であった．筆者らは酵素分散させた網膜に対し，内皮細胞特異的表面抗原（CD31）に対する磁気ビーズ標識抗体を用いて血管内皮細胞を磁気的に高純度単離することで解決を試みた．単離されたラット網膜内皮細胞画分における密着結合関連分子（Claudin-5，Occludin）の発現量は非内皮細胞画分の 100 倍以上であり，高純度での内皮細胞単離が示された．本内皮細胞画分において GLUT1 は高発現している一方，GLUT3 は検出されず，inner BRB では主に GLUT1 が網膜へのグルコース供給を担っていることが示唆された[2]．

Inner BRB において GLUT1 は抗酸化物質ビタミン C の供給にも関与する．酸化的リン酸化にはフリーラジカル産生を伴うため，エネルギー消費量の多い網膜において抗酸化物質供給は重要である．血中ビタミン C のうち，約 9 割は還元型の ascorbic acid（AA），残りが酸化型の dehydroascorbic acid（DHA）で存在する．ラット BRB において DHA は GLUT1 を介して輸送され，DHA の網膜取り込みクリアランスは AA の約 40 倍であった．さらに，DHA は網膜内で直ちに AA に変換されることも示

された．したがって，ビタミンCは主としてDHAの形で，GLUT1を介して網膜に供給されていると考えられる．

クレアチンはATPとの結合によりエネルギー貯蔵物質として機能するため網膜中に高濃度に存在し，高オルニチン血症を伴う脳回転状網脈絡膜萎縮症における生体内クレアチン濃度の低下は，網膜萎縮および失明を引き起こす．筆者らはラットinner BRBにはクレアチントランスポーター（CRT）が発現し，網膜へのクレアチン供給に関与していることを明らかにしている．

4. 神経伝達物質供給におけるinner BRBの役割

網膜における主要な神経伝達物質としてグルタミン酸およびGABAが挙げられるが，これらの細胞間液中濃度は厳密に制御される必要があるため，BRBを介した血液からの移行性は極めて低い．したがって，神経伝達物質前駆体のBRBを介した供給が生理的に重要である．網膜でのグルタミン酸合成経路として，α-ケトグルタル酸と分岐鎖アミノ酸からの分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼを介した合成が挙げられる．GABAはグルタミン酸からの脱炭酸によって合成される．α-ケトグルタル酸はクエン酸回路の中間体であり，前述したGLUT1を介したグルコース輸送が重要な役割を果たしている．ロイシンなど分岐鎖アミノ酸は必須アミノ酸であり，BRBを介した血液からの供給が不可欠である．ロイシンのラット網膜取り込みクリアランスは非透過性マーカーのクリアランスと比べて200倍以上高い．筆者らは独自に開発したinner BRBのラットモデル細胞株，TR-iBRB 2細胞において，L-ロイシンの輸送はsystem L輸送系を介していることを明らかにした．System Lの実体であるL-type amino acid transporters（LAT）のうち，ラット網膜内皮細胞画分においてLAT1の発現量はLAT2に比べて約100倍高く，さらに免疫染色によってラットinner BRBにおけるLAT1の発現を明らかにした[4]．したがって，LAT1はinner BRBにおいて分岐鎖アミノ酸供給に機能し，網膜神経活動の維持に必須の役割を担っていると考えられる．

コリンは網膜においてアセチルコリンの前駆体として機能し，コリンのラット網膜取り込みクリアランスはロイシンと同様に，非透過性マーカーのクリアランスと比べて200倍以上高い．TR-iBRB2細胞を用いたコリン輸送機構解析の結果，tetraethyl ammonium（TEA）に対する親和性が低く，Na^+非依存性のカチオン輸送機構の関与が示唆された．さらに，TR-iBRB2細胞においてcholine transporter-like protein 1（CTL1）の発現が示された一方，CTL1 siRNAのコリン輸送への影響は20%以下であった[5]．CTL1は基質認識性などその基本的輸送メカニズムに未解明の部分が多く，まずはその解明が必要である．

筆者らはTR-iBRB2細胞においてタウリントランスポーター（TauT）はタウリンに加えてGABA輸送に関与していることを明らかにした．さらに，TauT遺伝子導入細胞を用いてTauTがGABAを基質とすることを証明している[6]．血液中GABAの網膜組織への移行は極めて低いため，TauTは組織中の過剰なGABAを網膜外に排出するために機能している可能性がある．

5. Inner BRBにおける薬物トランスポーターの発現と機能

薬物移行性を考える上で，organic anion transporting polypeptide（oatp）およびorganic anion transporter（Oat）の発現と機能を明らかにすることは重要である．筆者らはラット硝子体に投与した化合物の濃度推移を眼球内に留置したマイクロダイアリシスプローブからの回収液を介して測定し，BRBを介した排出輸送機構を解析する技術を確立した．本手法を用いた結果，estradiol 17-β glucuronide（E17βG）はBRBを介して眼球内から排出され，本排出輸送はdigoxinを含むoatp阻害剤で阻害されることが示された[3]．さらに，ラット網膜内皮細胞画分において，oatp1c1およびoatp1a4の発現が示された[2]．Digoxinはoatp1c1等と比べてoatp1a4に対して特に強い親和性を示すため，E17βGのinner BRBを介した排出輸送にはoatp1a4が関与していることが示唆された．Oatについては，ラット網膜内皮細胞画分においてOat3の発現が示され，さらに免疫染色によってOat3がラット網膜毛細血管内皮細胞の網膜側膜に発現していることが示された．マイクロダイアリシスプローブを用いた排出輸送機構解析においても，*p*-aminohippuric acid（PAH），benzylpenicillin，および6-mercaptopurine（6MP）

表1　Inner BRB において機能発現するトランスポーター群

トランスポーター	基質	膜局在
エネルギー供給・維持		
GLUT1（Slc2a1）	D–グルコース，ビタミン C	L, A
MCT1（Slc16a1）	L–乳酸	L, A
CRT（Slc6a8）	クレアチン	L, A
アミノ酸・神経伝達物質		
LAT1（Slc7a5）	L–ロイシン	L, A
xCT（Slc7a11）	L–シスチン	ND
TauT（Slc6a6）	タウリン，GABA	ND
ENT2（Slc29a2）	アデノシン	ND
有機アニオン		
Oatp1a4（Slco1a4）	E17βG	ND
Oat3（Slc22a3）	PAH, Benzylpenicillin, 6MP	A
ABC トランスポーター		
Mdr1a（Abcb1a）	Cyclosporine A, Rhodamine 123	L
Mrp4（Abcc4）		L
Bcrp（Abcg2）	Phototoxins	L

E17βG, Estradiol 17-β glucuronide; PAH, *p*-aminohippuric acid; 6MP, 6-mercaptopurine; L, luminal localization; A, abluminal localization; ND, not determined.

の BRB を介した排出輸送における Oat3 の関与が示唆された．

ABC トランスポーターについて，筆者らはマウス網膜血管内皮細胞画分における Abca ファミリー，Abcb1（mdr1），Abcc ファミリー，および Abcg2（bcrp）の発現量を網羅的に解析し，非内皮細胞画分における発現量と比較した．その結果，Abca9，Abcb1a，Abcc4（mrp4），Abcc6（mrp6），および Abcg2 の内皮細胞画分における発現量が非内皮細胞画分における発現量に比べて著しく高いことが示され，inner BRB 選択的な発現が示された．このうち，Abcb1a，Abcc4，Abcg2 に関しては，免疫染色により inner BRB の血管側膜への局在が報告されており，網膜への薬物移行を制限する役割を果たしていると考えられる．その他 ABC トランスポーターに関しても，まずは細胞膜局在性を明らかにし，薬物輸送への関与を解明することが極めて重要である．

6. お　わ　り　に

Inner BRB に機能発現しているトランスポーターについて，筆者が解析対象にしたものを中心に表1にまとめた．血液組織関門輸送機構は，薬物移行性を決定する薬剤学的に重要な機構であるが，本来は組織機能を維持するための生理機構である．生理的に重要なトランスポーターは発現量も高く，薬物移行性を決める上でも重要な役割を果たすことが多い．したがって，薬剤学と生理学の複合的な視点からの解析が血液組織関門を知る上で重要だと考えている．

筆者はカリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部への留学を経て，2009年1月に慶應義塾大学薬学部に着任し，中島恵美教授の下で進められている血液胎盤関門研究に参加している．胎盤は妊娠中の限られた期間のみ存在する特別な組織であり，独特なトランスポーター発現分布が報告されている．しかし，胎盤選択的に発現するトランスポーターの生理機能や薬物輸送への関与が充分に解明されているとは言い難い．今後の研究を通して，これら胎盤独自のトランスポーターの生理機能と薬物輸送機構を解明することを楽しみにしている．

本稿で紹介した研究の実施において，終始御指導および叱咤激励を賜りました東北大学大学院薬学研究科寺崎哲也教授，大槻純男准教授ならびに富山大学大学院医学薬学研究部細谷健一教授に厚く御礼申し上げます．また，本研究成果は多くの方々との共同研究によるものであり，関係する先生方，学部卒業生，大学院修了生の方々に，心から感謝いたします．

引 用 文 献

1) K. Hosoya, M. Tomi, S. Ohtsuki, H. Takanaga, M. Ueda, N. Yanai, M. Obinata, T. Terasaki, Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat, *Exp. Eye Res*., **72**, 163–172 (2001).
2) M. Tomi, K. Hosoya, Application of magnetically isolated rat retinal vascular endothelial cells for the determination of transporter gene expression levels at the inner blood-retinal barrier, *J. Neurochem*., **91**, 1244–1248 (2004).
3) K. Katayama, Y. Ohshima, M. Tomi, K. Hosoya, Application of microdialysis to evaluate the efflux transport of estradiol 17-beta glucuronide across the rat blood-retinal barrier, *J. Neurosci. Methods*, **156**, 249–256 (2006).
4) M. Tomi, M. Mori, M. Tachikawa, K. Katayama, T. Terasaki, K. Hosoya, L-type amino acid transporter 1-mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*., **46**, 2522–2530 (2005).
5) M. Tomi, K. Arai, M. Tachikawa, K. Hosoya, Na(+)-independent choline transport in rat retinal capillary endothelial cells, *Neurochem. Res*., **32**, 1833–1842 (2007).
6) M. Tomi, A. Tajima, M. Tachikawa, K. Hosoya, Function of taurine transporter (Slc6a6/TauT) as a GABA transporting protein and its relevance to GABA transport in rat retinal capillary endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 2138–2142 (2008).