

《若手研究者紹介》



血液網膜関門におけるカチオン輸送機構の研究： トランスポーターの道を巡って

久 保 義 行* Yoshiyuki Kubo

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）薬剤学研究室

1. はじめに

筆者が薬剤学の分野に足を踏み入れてから10年程の歳月が経った。その始まりは、異分野でトランスポーター研究に従事していた筆者が、金沢大学大学院自然科学研究科薬学系創剤科学研究室（辻彰教授）に教員として参画した時である。当時は、新しい研究環境に心が奮い立つとともに、出身ラボの先輩たちとは異なる道に踏み出したことに多少の不安もあった。本稿では、筆者のこれまでの研究生活を振り返るとともに、現在の研究について紹介させて頂く。

2. トランスポーター研究の世界へ

筆者は大学院に進学してから教員となった現在まで、一貫してトランスポーター研究に従事してきた。とは言え、その第一歩は、名古屋市立大学薬学部生物薬品化学研究室（奥山治美教授）で卒研究生として従事した脂質栄養学の研究であった。生物薬品化学研究室における1年間に、筆者は薬学研究における個体解析の重要性を教わるとともに、文献紹介などを通して分子生物学と胚操作から作成される遺伝子欠損マウスの有用性を強く印象付けられた。

学部3年生の頃から、筆者は細菌類やがん細胞の

薬剤耐性や薬物の体内動態に関与するトランスポーターに大変な関心を抱くようになっていた。そこで、大学院進学を機会に、筆者は大阪大学産業科学研究所生体情報制御学研究分野（山口明人教授）に参画し、遺伝子工学を利用したトランスポーターの立体構造解明や新規ABCトランスポーターの探索、新規ABCトランスポーター遺伝子欠損マウスの作成・解析などに従事した。当時の山口研究室には、森山芳則先生（現岡山大学教授）が在籍されており、筆者も抗体作成のコツなどをご指導頂いたことがあった。研究室では、日々の研究の中で膜タンパク質の生化学的解析手法や分子生物学的研究法の習得に熱心に努めたが、その反面、心が折れそうになったこともあった。新規トランスポーターの探索ではなかなか思うような遺伝子配列は得られず、また、遺伝子欠損マウス作成では胚操作方法の習得に大変な時間を費やした。このような紆余曲折を経て、筆者はABCA5を同定し、その遺伝子欠損マウスを作成した。ABCA5欠損マウスでは、甲状腺疾患に酷似した眼球突出や拡張型心筋症様の症状が高頻度で観察され、ABCA5の生理的重要性が明らかとなった。組織化学的解析では、ABCA5のオートファジーへの関与が示唆され、このことはABCA5のリソソーム局在からも支持された。以上の研究に筆者が従事していた当時は、ゲノム解析によって哺乳動物における400種ほどのトランスポーター遺伝子の存在が示された時期でもあった。縮重プライマーを用いた新規遺伝子探索は終焉の感があり、筆者の関心も、未知の遺伝子ではなく、機能未知のトランスポーターの発現や機能、役割に向かうようになっていた。

*1998年名古屋市立大学卒業。2001年日本学術振興会特別研究員。2003年大阪大学大学院博後課程修了、同大産業科学研究所研究員。2004年金沢大学助手。2007年同大助教。2008年米国ジョージア医科大学研究員。2010年東北大学特任助教。2011年富山大学講師。2013年同大准教授。連絡先：〒930-0194 富山市杉谷 2630 E-mail: kuboyosh@pha.u-toyama.ac.jp

3. トランスポーターの道を巡る

博士号取得の後、筆者は大阪大学産業科学研究所に博士研究員として勤務した。研究遂行上のフリーハンドが増え、大学院生時代に温めていたアイデアを試す機会も増えた。一方、教員への道は当分険しく思え、「しばらく研究員をやったら、その後は海外留学」というのが当時の考えだった。このような中、筆者は膜ベシクル取り込み輸送解析法を金沢大学大学院自然科学研究科薬学系創剤科学研究室（辻彰教授）においてご教示頂く機会を得た。これが思いがけない幸運となり、筆者は創剤科学研究室に教員として参画することとなった。筆者が金沢大学に着任した2004年は、金沢大学薬学部が宝町から角間町に移転した年であり、完成間も無い自然科学研究棟で筆者の教員生活が始まった。創剤科学研究室では、辻先生のご指導の下、筆者は多様な研究テーマに関わる機会を頂けた。特に、在籍期間を通して関与したOCTN1 (SLC22A4)の研究では、OCTN1遺伝子欠損マウスの作成などで活躍の場を頂き、これが筆者にとってカチオン性薬物の体内動態研究に携わる最初の機会となった。また、その欠損マウスを用いたメタボローム解析において、OCTN1の生理的基質としてL-ergothioneineの同定に立ち会えたことは、欠損マウスを用いた研究に携わってきた者として大変な喜びであった。以上のような経験を通して、筆者は薬物や栄養物の体内動態に寄与する輸送機構やトランスポーターの研究の意義と面白さを知った。創剤科学研究室における4年間は、筆者にとって教員や研究者としての将来をじっくり考える期間でもあり、辻先生や加藤将夫先生（現金沢大学教授）から頂いた貴重なご指導やご助言は、筆者の貴重な財産となった。

2008年の辻先生のご退任を機に、筆者は海外留学の途に就いた。留学先のMedical College of Georgiaでは、生化学/分子生物学講座(Vadivel Ganapathy教授)において、大腸がん細胞におけるアミノ酸取り込み輸送機構などの研究に従事した。留学の当初、Ganapathy教授のアイデアの豊富さと研究が上手くいかない時の切り替えの速さには、本当に驚いた。思わしくない研究結果が出た時は、ディスカッションの終わりに「OK, you can forget.」という台詞がボスから出てきた。部下である筆者としては、あま

り面白くない状況だったが、同時に、適切な判断によって研究の活性化を図ることの重要性を学んだ。留学するまでの筆者は、特定のトランスポーター分子を指向して研究に取り組むことが主であったが、Ganapathy教授の下においては、輸送機構や輸送活性を指向した研究に取り組む機会が増え、未知の生理機構を探索する面白さを知った。当時、研究室内で未知のペプチド輸送機構を研究していた大学院生は、筆者の大事なディスカッション相手であった。

留学の後、筆者は東北大学にグローバルCOE特任助教として勤務する機会を頂いた。東北大学では、大学院薬学研究科薬物送達学分野（寺崎哲也教授）において「機能性タンパク質の定量的局在解析法の確立」に従事し、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)に発現するトランスポーターの局在性を題材として、ファーマコプロテオミクスを利用した新しい膜タンパク質局在解析法の確立に挑んだ。この研究の遂行には、脳毛細血管を大量に調製することが必須であり、筆者は食肉卸売市場から供与頂いたブタ脳から遠心を重ね、最後は粗膜画分を5層の密度勾配遠心によってluminal-rich画分などを調製し、LC/MS/MS定量を実施した。大槻純男先生（現熊本大学教授）のご指導の下、筆者は得られた定量値からdistribution ratioを算定し、BBBにおけるトランスポーターの局在性を定量化した。特に、安定した収量の膜画分調製が可能となった時期には、筆者はやる気に満ちてLC/MS/MS定量を計画した。残念なことに、本研究は、2011年3月11日に発生した東北地方太平洋沖地震によって一時中断となったが、後年に寺崎先生からの御提案で、論文執筆の機会を頂けたことは筆者にとって大変貴重な経験となった¹⁾。

4. 組織関門研究への取り組み

筆者が富山大学大学院医学薬学研究部薬剤学研究室（細谷健一教授）に赴任したのは、東北地方太平洋沖地震の発生から約3週間後であった。これを契機に、筆者は網膜などに存在する血液組織関門の研究に本格的に従事することとなった。筆者の今回の引越しに関しては、珍しいことに親戚から喜びの声があがった。というのも、筆者の浮沈激しい家系には眼科医の先祖（江戸中期）がおり、大袈裟なこととは思いつつ、伯母は「巡り合わせ」と喜んだ。網

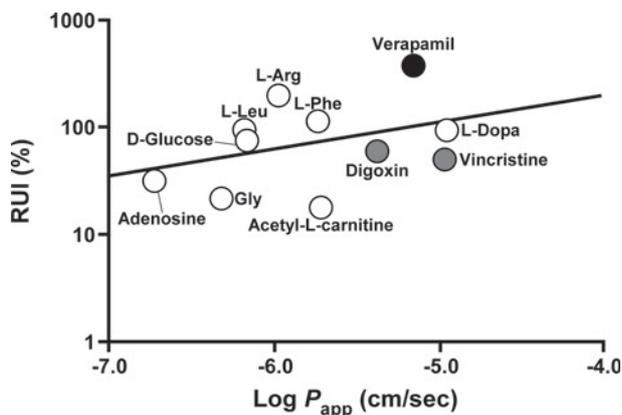


図1 *In vivo-in vitro* 相関解析. RUI と parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) で得られた P_{app} をプロットした. P-gp の基質である digoxin や vincristine が予測値 (実線) よりも低い RUI 値を示す一方, verapamil は高い RUI 値を示した (文献2) より転載).

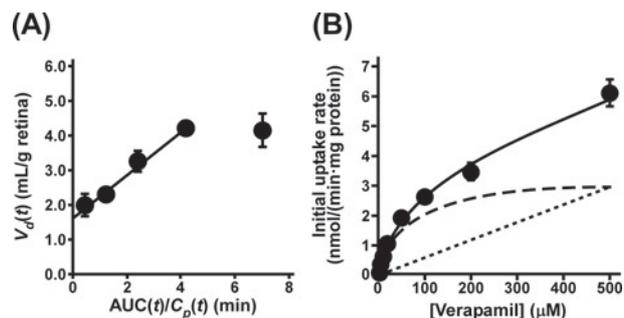


図2 血液網膜関門を介した $[^3\text{H}]$ verapamil 輸送の解析. (A) Integration plot による網膜への $[^3\text{H}]$ verapamil 透過性解析, および (B) TR-iBRB2 細胞を用いた $[^3\text{H}]$ verapamil 取り込み輸送解析 (文献3) より転載).

膜は視覚を司る神経組織であり, 糖尿病網膜症や加齢性黄斑変性症などの網膜疾患は失明に繋がることから, 患者の quality of life を低下させる原因となる. 一方, 現在の網膜疾患薬物療法はその安全性や効率性の点において不十分な状況であり, 薬剤学研究室では「循環血液中から網膜への薬物送達」を提唱し, これに血液網膜関門 (blood-retinal barrier ; BRB) に発現するトランスポーターの利用を考えてきた. BRB は, 網膜毛細血管内皮細胞を細胞実体とする内側血液網膜関門 (inner BRB) と網膜色素上皮細胞を細胞実体とする外側血液網膜関門 (outer BRB) から構成されており, 研究室では, inner BRB に発現するアミノ酸やビタミンを基質とするトランスポーター群の生理的役割が明らかとされてきた.

当時, 研究室内では BRB のカチオン性薬物輸送機構が考え始められていた. BRB を介した化合物の網膜移行性の評価には, *in vivo* 解析である retinal uptake index (RUI) 法の利用が考えられてきたが, その創薬応用には, より簡便で迅速な *in vitro* 評価法の確立が必須であった. 筆者は進行中であった *in vitro-in vivo* 相関解析に加わり, 化合物の BRB 透過性の予測において inner BRB モデル細胞株である条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2 細胞) を利用した *in vitro* 輸送解析の有用性を報告した²⁾. この検証過程において, P-gp (ABCB1/MDR1) の基質である verapamil が予測値に比して高い RUI 値を示したことから, BRB における verapamil 取り込み輸送機構の存在が考えられるように

なった (図1). 筆者らは *in vivo* 解析をラットにおいて実施し, 網膜への $[^3\text{H}]$ verapamil 取り込みクリアランスが細胞間隙輸送マーカーに比して約 980 倍高い値を示すこと, また, 網膜への $[^3\text{H}]$ verapamil 取り込みがカチオン性薬物である pyrilamine によって阻害されることを明らかとした. これに対し, 脳への $[^3\text{H}]$ verapamil 取り込みは pyrilamine によって促進される傾向にあった. 以上から, BRB における verapamil 取り込み輸送の存在が示されるとともに, BRB と BBB がカチオン性薬物に対して異なる関門特性を示すことが示唆された. さらに, 筆者らは inner BRB におけるカチオン性薬物取り込み輸送機構を *in vitro* レベルで解析し, inner BRB を介した verapamil や pyrilamine, propranolol などの輸送が担体介在輸送であることを示唆した (図2)^{3,4)}.

Inner BRB において, カチオン性薬物輸送機構の存在が明らかとなったことから, 筆者の関心はその分子の実体や医療への応用に向かうこととなった. *In vitro* 阻害解析において, 筆者らが報告したカチオン性薬物輸送機構は, *p*-aminohippuric acid (PAH) などのアニオン性化合物によっては阻害されず, その分子実体として有機カチオントランスポーターが想定された. しかし, 既知の有機カチオントランスポーターである OCTs や OCTNs, MATE1, PMAT などの阻害剤である tetraethylammonium (TEA) や 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), decynium-22, choline, cimetidine などは阻害効果を示さず, inner BRB のカチオン性薬物取り込み輸送機構は未知のトランスポーター分子によって担われることが示唆された^{2~4)}. カチオン性薬物に関しては, これまでの神経科学研究において desipramine

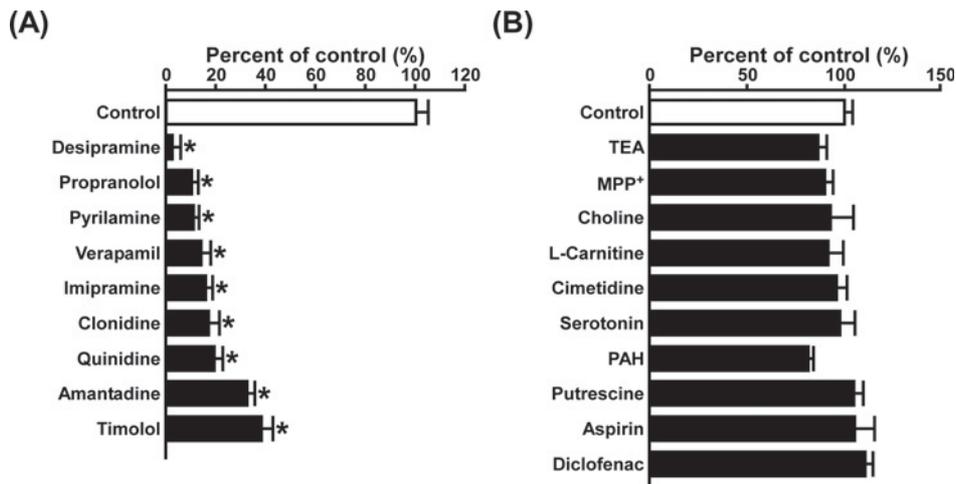


図3 $[^3\text{H}]$ Clonidine 輸送の *in vitro* 阻害解析. TR-iBRB2 細胞による $[^3\text{H}]$ clonidine 輸送は, (A) に示されるようなカチオン性化合物によって阻害される一方, (B) に示されるような典型的な有機カチオンや有機アニオンによって阻害されない.

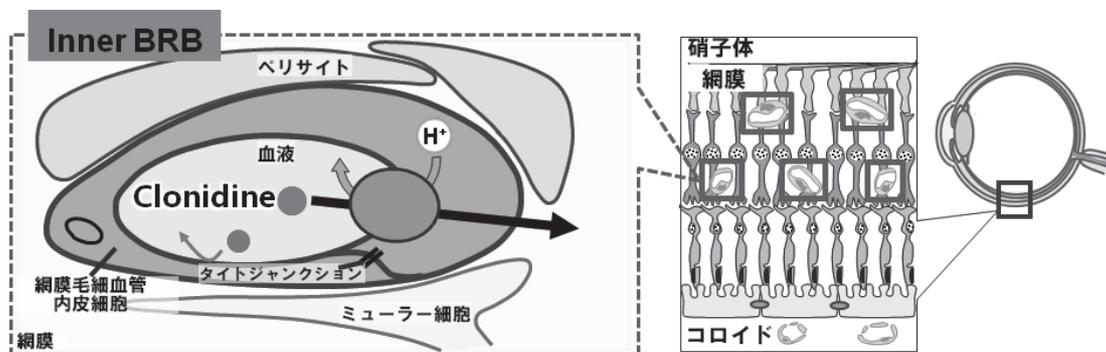


図4 血液網膜関門を介した網膜への clonidine 輸送. BRB に存在するカチオン性薬物輸送機構は, 神経保護薬の網膜への送達に有用と期待される.

や memantine などの薬物が神経保護作用を示すことが明らかとされており, 将来の神経疾患治療におけるこれら薬物の有用性が考えられてきた. *In vitro* 阻害解析において, inner BRB におけるカチオン性薬物の輸送機構が desipramine などによって阻害されることから, これら輸送機構が網膜への神経保護薬の送達に有用であることが考えられた. 筆者らはアドレナリン α_2 受容体アゴニストである clonidine を用いて, このことを検証してきた. Clonidine の神経保護作用としては, 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF) の発現を上昇させて虚血や興奮毒性による障害から網膜神経を保護することが知られていた. 筆者らによる解析の結果, ラットにおける網膜への $[^3\text{H}]$ clonidine 取り込みクリアランスは細胞間隙輸送マーカーに比して約 730 倍高い値を示すとともに, この輸送は pyrilamine などによって阻害されたことから, BRB を介した clonidine 輸送機構の存

在が示唆された. 加えて, 筆者らが実施した *in vitro* 解析においては, inner BRB における clonidine 取り込み輸送機構が pH 依存性を有する担体介在輸送であること, また, 種々のカチオン性神経保護薬によって阻害されることなどが示されており (図3)⁵⁾, 以上から, 網膜への神経保護薬の輸送におけるカチオン性薬物輸送機構の有用性が示唆された (図4).

5. おわりに

大学院生であった頃, 恩師から「難しいテーマだけど, とにかくやってみろ. ‘瓢箪から駒’ってこともある. 骨は拾ってやる.」とよく言われた. 当初の見通しと異なる結果や展開となった研究は少なくなく, ‘瓢箪から出てきた駒’を捕まえようと努めてきた. そして, トランスポーターの道を巡りながら, バリエーション豊かな研究に従事できたことは本当に幸運なことだったと思う. 現在取り組んでいる

BRB の輸送機構研究に関しては、神経疾患治療の飛躍的向上が期待されるとともに、新たな生理機構の発掘や詳細解明に繋がるものと予想される。今後とも、分子実体同定を含めた研究展開に精励したい。

最後に、筆者に研究の機会を与えて頂くとともに厚いご指導を賜った先生方、また、貴重なご助力を賜った学生の皆様に、心より御礼申し上げます。また、本稿の執筆に絶え間ないご助力を賜りました富山大学細谷健一教授ならびに赤沼伸乙助教に深謝するとともに、執筆の機会を与えて下さいました「薬剤学」編集委員の先生方に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Y. Kubo, S. Ohtsuki, Y. Uchida, T. Terasaki, Quantitative determination of luminal and abluminal membrane distributions of transporters in porcine brain capillaries by plasma membrane fractionation and quantitative targeted proteomics, *J. Pharm. Sci.*, doi: 10.1002/jps.24398 (2015).
- 2) Y. Kubo, E. Fukui, S. Akanuma, M. Tachikawa, K. Hosoya, Application of membrane permeability evaluated in *in vitro* analyses to estimate blood-retinal barrier permeability, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 2596–2605 (2012).
- 3) Y. Kubo, Y. Kusagawa, M. Tachikawa, S. Akanuma, K. Hosoya, Involvement of a novel organic cation transporter in verapamil transport across the inner blood-retinal barrier, *Pharm. Res.*, **30**, 847–856 (2013).
- 4) Y. Kubo, Y. Shimizu, Y. Kusagawa, S. Akanuma, K. Hosoya, Propranolol transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement of a novel organic cation transporter, *J. Pharm. Sci.*, **102**, 3332–3342 (2013).
- 5) Y. Kubo, A. Tsuchiyama, Y. Shimizu, S. Akanuma, K. Hosoya, Involvement of carrier-mediated transport in the retinal uptake of clonidine at the inner blood-retinal barrier, *Mol. Pharm.*, **11**, 3747–3753 (2014).