

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

血液脳関門の機能特性を利用した脳内への薬物
及び遺伝子輸送システムの開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成13(2001)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

血液脳関門の機能特性を利用した脳内への薬物及び遺伝子輸送システムの開発 1

杉山 雄一

II. 分担研究報告

1. 血液脳関門を介した輸送の評価と排出輸送機構の解明に関する研究、
並びに脳送達を可能とするキャリアー分子の探索 5

杉山 雄一

2. cMOAT/MRP2と相互作用する薬物の立体配座解析と三次元構造特徴の抽出に関する研究 8

広野 修一

3. 機能ゲノミクスによる血液脳関門における薬物輸送システムの解明に関する研究 10

油谷 浩幸

4. 障害神経細胞に対する有効治療薬および薬物輸送システムを開発するための
細胞レベルにおける研究 15

赤池 紀生

5. 脳保護効果を有する「脳環境系」調節因子による脳蘇生法を開発するための研究 16

渡辺 泰雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷り (別刷り冊子)

総括研究報告書

血液脳関門の機能特性を利用した脳内への薬物及び遺伝子輸送システムの開発

主任研究者 杉山 雄一 東京大学・大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 関門を回避し、効率的に脳内へ薬物ならびに遺伝子のデリバリーを行うために、関門における排出輸送メカニズムの解析ならびに、脳機能障害に対して治療効果を有する分子の探索を行った。血液脳関門ならびに血液脳脊髄液関門に発現される既知薬物トランスポーターの寄与率の決定、ならびに新規排出輸送ポンプの探索について検討を加えた。血液脳関門においては、Oatp2 が estradiol 17 β glucuronide の脳内からの排出のかなりの部分を説明できることが示唆された。関門の血管側における排出輸送機構は少なくとも、MRP1 単独では説明できないことが明らかとなった。P-gp/MDR1 発現細胞での経細胞輸送と正常マウスと遺伝子欠損マウスの血漿脳分配係数の比には、良好な相関関係が見出され、経細胞輸送が *in vivo* における脳分布性を推測する上で、よい指標となることが示唆された。DNA データベース上に見出した MRP family と相同性を有するフラグメントはいずれも、脳での発現は低かった。GeneChip(Affymetrix 社)を用いて大動脈、Willis 輪の動脈、脳表細動脈におけるラット遺伝子の発現プロファイル解析を行い、Willis 輪に特異的な遺伝子の単離を試みたが、Willis 輪特異的に発現を示す遺伝子は認められなかった。概要版ヒトゲノム配列から遺伝子予測プログラムにより ABC トランスポーターに相同性を有する遺伝子が 58 種認められた。cMOAT/MRP2 基質の結合配座を推定し、その三次元構造特徴を抽出することを試みた結果、4000 近くあった結合配座候補が现阶段で 16 にまで絞込めた。降圧作用を発現する延髄孤束核ニューロンと、このニューロンを制御する興奮性入力について検討した。その結果、ニューロンには non-NMDA 受容体が、興奮性のグルタミン酸作動性神経終末には ATP とバニロイド両受容体が共存し、降圧の促進を行う共に降圧と痛みの発現との間にクロストークの存在が示唆された。脳虚血による脳機能障害モデル動物を作成し、Ca 拮抗薬の薬効検索から脳虚血時の血液脳関門の異常を示唆した。脳環境系を考慮した新規脳機能障害治療法として細胞外マトリックス調節物質の薬理効果を検索し、コンロイチン硫酸化合物である CS-PE や、キノコの抽出液である CJ-01 に脳保護効果を有することを見出した。

広野修一（北里大学・薬学部、教授）
 油谷浩幸（東京大学・先端科学技術研究センター、助教授）
 赤池紀生（九州大学・大学院医学系研究科、教授）
 渡辺泰雄（東京医科大学、助教授）

関から、脳移行の優れた化合物を合理的に生み出す。(2)に関しては、細胞外マトリックス調整剤が、神経グリア細胞間のペプチドによる情報伝達を介して神経保護作用を有するという仮説に基づく検討を行う。本研究は脳虚血疾患改善を指標として新規脳送達システムの開発を目指したものであり、提唱された方法論は種々脳疾患治療にも適応可能なものである。本研究は脳虚血疾患改善を指標として低分子化合物、高分子ペプチドおよび遺伝子の新規脳送達システムの開発を目指したものである。

A. 研究目的

超高齢化、飽食化が重なり、21世紀早期は循環障害や高脂血症からの脳疾患症例が激増する。しかしながら種々脳機能疾患に対して適切な治療法が確立されていない。殊に脳虚血性疾患や脳梗塞誘発の脳

機能障害に関しては早急な対策が必要である。本研究は、(1)血液脳関門 (BBB) に存在する薬物トランスポーターに着目し、神経細胞に直接効果を示す化合物の脳送達を図り、(2)更に神経細胞保護機構を脳全体の相関性から考究し、同時にBBB機能特性を利用した新規脳送達システムを開発することにより、今までにない治療法を確立することを主目的とする。(1)に関しては、一連の誘導体の脳移行を、BBB上の薬物排出ポンプとの相互作用という観点から検証し、三次元構造活性相

B. 研究方法

- 1) ラット、マウス脳内ならびに脳室内に薬液を投与し、一定時間後マウスを屠殺し、脳内残存量ならびに脊髄液中濃度を測定した。正常マウスと遺伝子欠損マウスを比較することで、関門における MRP1 の役割について検討した。
- 2) 関門に発現される Oatp1, Oatp2, Oat1, Oat3 に対する阻害剤の選択性を遺伝子発現細胞を用いた輸送阻害実験により評価した。
- 3) MDR1P-gp の基質となる薬物 12 種類を選択し、MDR1P-gp 発現細胞を用いた経細胞輸送と、静脈内投与後の脳内濃度を正常マウスと遺伝子欠損マウスとの間で評価した。また、発現細胞より膜分画を調

整し、ATPの加水分解能を測定した。

4) 既知 MRP family のアミノ酸配列との相同性を指標にして、DNA データベースの検索を行った。検索の結果見つかった部分配列に対するプライマーを作成した。ラット脳より毛細血管内皮細胞を単離し、更に RNA を調製した。この RNA を鋳型として用いて、RT-PCR により血液脳関門における発現を確認した。ヒトゲノム配列概要版より、予測された遺伝子の中から ABC 輸送タンパクファミリーに属すると思われる遺伝子を検索した。また、ラット血管内皮細胞を単離し、その遺伝子発現プロファイルオリゴヌクレオチドアレイにより解析した。

5) cMOAT/MRP2 の基質に対して、エネルギー極小配座集団を得、分子動力学による分子の立体配座解析プログラム (CAMDAS) を用いて、重要なエネルギー極小配座集団を自動抽出した。更に薬物分子を官能基特性球により特徴づけを行い、薬物分子間で同一特性球がもっとも重なる重なりを吐き出した。最終的に、全 cMOAT/MRP2 基質に共通する原子団配置を有する配座を抽出する。

6) 4VO 法により、脳虚血状態にした。連続虚血は初回虚血 1 時間後に施行した。8 字迷路法により、記憶障害の検索を行った。nimodipine、amlodipine は初回虚血前 30 分に腹腔内より投与した。ラットを全能虚血にした際に脳における遺伝子発現プロファイル解析した。

7) 培養細胞は、神経細胞が豊富な群、神経細胞とグリア細胞が混在した群、グリア細胞が豊富な群の三群とした。細胞障害は新規蛍光マルチプレートに撻種した細胞に Calcein-AM (最終濃度 5 μ M) 添加後 75 分間 incubate して測定した。細胞外 TNF α は ELISA 法、アポトーシスは蛍光法で測定した。LPS あるいは Glu やアシドーシスの処置前後に CS、CS-PE あるいは CJ-01 を添加した。ラットを全能虚血状態にし、脳における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。

8) 孤束核の NTS 領域ニューロンそのものの特性とこの NTS ニューロンの活動を制御している興奮性神経終末部の生理機構を解明する。ラット NTS ニューロンを機械的に単離し、単離ニューロンにグルタミンさん作動性興奮性神経終末部が付着した「シナプス・ブートン標本」作成し、これらの細胞活動をパッチ電極で電圧固定下に記録する。

C. 研究成果

1) rOatp1, rOatp2, rOat1, rOat3 の遺伝子発現系を作成し、estradiol 17 β glucuronide の細胞内蓄積量を測定したところ、rOat1 ではコントロール細胞との間に有意な差は見られなかった。rOatp1, rOatp2, rOat1, rOat3 各発現細胞への初期取り込み速度を測定し、probenecid, taurocholate, p-aminohippurate, digoxin による阻害効果を検討したところ、probenecid は非選択的であり、digoxin が rOatp2 に特異的であり、taurocholate ならびに p-aminohippurate はそれぞれ Oatp, Oat に対して選択的であった。estradiol 17 β glucuronide を脳内に投与後、その消失の半減期は約 20 分であった。この排出に対する阻害効果を検討したところ、probenecid, taurocholate によりほぼ完全に、p-aminohippurate により 20%、digoxin により 40% が阻害された。

2) MRP1 の典型的な基質となる estradiol 17 β glucuronide を脳内・脳室内に投与した。その後の、脳内濃度・脳室内濃度には、正常マウスならびに MRP1 ノックアウトマウスとの間に差は見られなかった。一方、dinitrophenol glutathione (DNP-SG) では若干の低下が見られた。正常マウスにおいて、両関門を介した E217 β G ならびに DNP-SG の排出は有機アニオントランスポーターの阻害剤である probenecid により完全に阻害された。

3) MDR1P-gp 基質 12 化合物を選択し、MDR1P-gp 発現細胞を介した経細胞輸送と、正常マウスと MDR1P-gp 欠損マウスとの血漿脳分配係数の比には良好な相関関係が見出された。一方、ATP の加水分解能で評価した場合、加水分解能を増加させるものはすべて基質であったが、基質であるにも関わらず ATP の加水分解能には影響を与えないものもあった。

4) DNA データベース上に、MRP family と相同性を有するフラグメントが 4 つ見つかった。4 つのフラグメントすべてが、脳毛細血管内皮細胞より RT-PCR により増幅された。このうち、3 つは、当初検索をかけた時点では登録されていなかったヒト MRP7 と高い相同性 (~80%) を示し、MRP7 のマウスホモログと思われる。Northern blot を行ったところ、期待とは異なり、脳の発現は非常に少ないか、あるいはほとんど見られなかった。GeneChip (Affymetrix 社) を用いて大動脈、Willis 輪の動脈、脳表細動脈におけるラット遺伝子の発現プロファイル解析を行い、Willis 輪に特異的な遺伝子の単離を試みたが、Willis 輪特異的に発現を示す遺伝子は認められなかった。概要版ヒトゲノム配列から遺伝子予測プログラムにより ABC トランスポーターに相同性を有する遺伝子が 58 種認められた。

5) cMOAT/MRP2 の基質となる薬物 18 分子について、CAMDAS プログラムにより、エネルギー極小配座集団を得た。続いて活性のもっとも高い化合物 1 を基準として、SUPERPOSE プログラムを用いて分子重ね合わせを行った。化合物 9~12 との重ね合わせにより、3846 配座から結合候補配座として、12 配座を抽出することができた。今後はさらに 3 ないし 4 個の化合物との重ね合わせの計算を行い、結合候補配座を更に絞込み、3 次元定量的構造活性相関解析手法として代表的な CoMFA 解析を行い、結合配座を決定するとともに、cMOAT/MRP2 と相互作用する薬物の 3 次元的な構造特徴を明らかにしていく予定である。

6) 大動脈弓圧受容体から発する降圧神経を蛍光色素の Di-I で生体染色し、その投射を受ける NTS ニューロンは non-NMDA 受容体を多く発現していた。また、NTS ニューロンを制御する興奮性のグルタミン酸作動性神経終末部にはバニロイド受容体 (VR-1) が存在し、カプサイシンの投与によってグルタミン酸の放出が増加した。このため、迷走神経が活性化され、血管拡張に引き続き、血圧降下が生じることが示唆された。また、ATP が作用する P2X 受容体も本神経終末部に存在して、グルタミン酸の放出を増加した。これら VR-1 と ATP 両受容体の間には相互干渉がみられた。

7) 虚血群に字迷路検索での正選択数の著名な減少、誤選択数の著名な増加が確認された。一方、Ca 拮抗薬投与群では、一回虚血において、いずれの投与

群も対照群と比較して統計的に有意な差を見出す結果は得られなかったが、連続虚血では対照群と比較して Nim 投与で有意な改善効果が認められた。

8) LPS は細胞外 TNF α を急激に増量させた。他の刺激因子は細胞死を生じさせる割合は高いが細胞外 TNF α 量の増量の程度は低かった。一方、ECM 調製機能を有すると思われる CS-PE や CJ-01 は用量依存的な刺激因子誘発脳細胞死の阻害効果が観察された。

D. 考察

遺伝子発現細胞を用いた輸送阻害実験により明らかとなった阻害剤の選択性を考慮すると、estradiol 17 β glucuronide の脳内からの排出は、Oatp2 によりその 40% が説明されるものと考えられる。一方、PAH による阻害効果から、残り 60% の内 20% は OAT により説明できるものと考えられる。更に残りの部分を説明するためには、今後の検討が必要である。阻害剤の選択性を明らかにすることで、in vivo で簡便に薬物トランスポーターの寄与率を評価することができるものと思われる。estradiol 17 β glucuronide で正常と MRP1 ノックアウトマウスで差が見られなかったこと、ならびに DNP-SG で若干の低下が見られたのみであったことから、脊髄液中からの有機アニオンの消失に占める MRP1 の寄与率は小さいものと考えられる。DNA データベースの検索、更にはオリゴヌクレオチドアレイにより最大 25,000 のラット遺伝子を解析することにより、血液脳関門特異性の高い新規 ABC トランスポーターを同定していく必要がある。薬物トランスポーターの遺伝子発現細胞を介した経細胞輸送と正常マウスと遺伝子欠損マウスとの脳分布性の比に、相関関係が見られたことから、遺伝子発現系を利用して、少なくとも in vivo での中枢移行性を相対的に評価が可能であることが示された。しかし、絶対値を評価するためには、更なる検討が必要である。遺伝子発現系を用いて、より効率的に中枢移行性が高い薬物のスクリーニングが可能になるものと考えている。

CAMDAS による立体配座集団の生成を終え、重ね合わせにより結合配座を絞り込んでいる段階で、はじめ 4000 近くあった配座を 12 にまで絞り込むことができた。今後は更に 3 ないし 4 個の化合物との重ね合わせの計算を行い、結合配座を絞り込み、3 次元定量的構造活性相関解析手法として代表的な CoMFA 会席を行い、結合配座を決定すると共に、cMOAT/MRP2 との相互作用に必要な、医薬品の三次元的な構造特徴を明らかにしていく必要がある。延髄には血液脳関門が十分に発達していないか、あるいはないといわれていることから、血液中のカプサイシンは直接、孤束核領域に侵入して、降圧作用を起こすと考えられる。また VR-1 と P2X 受容体の共存は、血圧調節機構と痛みのクロストークの存在を示唆するが、詳細は今後の検討を待たねばならない。

Nim 投与により、連続虚血誘発の記憶障害が改善された結果は、Nim が BBB を透過することによって神経保護効果を発現したものと思われる。CS-PE や CJ-01 は脳機能障害時発現時に ECM を介する脳環境系調節作用により保護効果を有することが示唆さ

れた。

E. 結論

1) 血液脳関門では少なくとも estradiol 17 β glucuronide の排出に Oatp2 が大きく関与している。

2) 血液脳脊髄液関門では、特にグルタチオン抱合体について MRP1 が排出ポンプとして働いていることが示唆されたが、単独ではなく、他の排出ポンプの関与が示唆された。

3) 薬物トランスポーターの遺伝子発現細胞を用いた経細胞輸送を測定することにより、in vivo における中枢移行性を少なくとも相対的には評価が可能である。

4) トランスポーターと薬物の相互作用を立体構造化学的観点で解析する研究はほとんどないといっている。蛋白質側の立体構造情報がない場合の薬物の結合/活性配座の予測手法により、cMOAT/MRP2 結合薬物の三次元ファーマコフォアをかなり解明することができた。

5) 最近発表されたヒトゲノム配列情報の概要版に加えて、マウスあるいはラットのゲノム情報も用いて新規トランスポーター遺伝子の同定を行うインフォマティクスシステムを構築し、ラットを用いた in vivo 実験系を確立した。

6) 降圧作用を発現する延髄孤束核ニューロンには non-NMDA 受容体が多く存在する。また本ニューロンを制御する興奮性神経終末にはバイロイト (VR-1) と ATP 両受容体が共存して、ともに孤束核ニューロンを活性化させ、減圧をもたらすことが示唆された。

7) 連続虚血で誘発される血液脳関門の薬物移行性での異常を見出し、かつ ECM 調製作用物質を応用した新しい脳保護治療法への発展性を示唆するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Morita N., Kusuhara H., Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of rat organic anion transporter 2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, submitted.

Adachi Y., Suzuki, H., Sugiyama Y. Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, submitted.

Sugiyama D., Kusuhara H., Abe T., Meier P.J., Sekine T., Endou H., Suzuki H., Sugiyama Y. Characterization of the efflux transport of 17 β -estradiol-D-17 β -glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, in press.

Kusuhara H., Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Drug Discovery Today* 6: 206-212, 2001.

Kusuhara H., Sugiyama Y. Efflux transport systems for

drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Drug Discovery Today* 6: 150-156, 2001.

Sugiyama Y. and Kato Y. Tissue-selective drug delivery utilizing transporters and receptors. In "Biomaterials and Drug Delivery toward New Millennium" Ed. By Park K.D., Kwon I.C., Yui N., Jeong S.Y. and Park K. pp 383-393, 2000.

Taya K., Watanabe Y., Kobayashi H. and Fujiwara M. Nimodipine improved the disruption of spatial induced by cerebral ischemia. *Physiology & Behavior* 70:19-25, 2000

Okita M., Watanabe Y., Taya K., Utsumi H. and Hayashi T. Presynaptic L-type Ca²⁺ channel on excessive dopamine release from rat caudate putamen. *Physiology & Behavior* 68:641-649, 2000

Miura I., Miyamoto K., Nakamura K., Watanabe Y. Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis. *Life Science* 68, in press, 2001

Hippo, Y., Yashiro, M., Ishii, M., Taniguchi, H., Tsutsumi, S., Hirakawa, K., Kodama, T., Aburatani, H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Research* 61: 889-895, 2001

Tsutsumi, S., Kobune, Y., Midorikawa, Y., Aburatani, H. Classification of hepatocellular carcinoma by gene expression profiling analysis. *Genome Informatics* 11: 240-241, 2000

Suwa M., Sato T., Okouchi I., Mikoshiba M., Akiyama Y., Asai K., Matsumoto S., Tsutsumi S., Aburatani H. Gene discovery of G-protein coupled receptors from human genome. *Genome Informatics* 11:410-411, 2000

Ge X., Yonamine S., Mi Y., Tsutsumi S., Kobune Y., Aburatani H., Iwata S. A physics-inspired algorithm for information visualization with application to gene expression analysis. *Journal of the School of Engineering XLVII:89-103, 2000*

Ishii M., Hashimoto S., Tsutsumi S., Wada Y., Matushima K., Kodama T., Aburatani H. Direct comparison of genechip and SAGE on the quantitative accuracy in the transcript profiling analysis. *Genomics* 68: 136-143, 2000

Murakami T., Mataka C., Nagao C., Umetani M., Wada Y., Ishii M., Tsutsumi S., Kohro T., Saiura A., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. The gene expression profile of human umbilical ven endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor α using DNA microarray analysis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press, 2001

Mataka C., Murakami T., Umetani M., Wada Y., Ishii M., Tsutsumi S., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical ven endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor α . *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. in press, 2001

Gouda H., Sunazuka T., Omura S., Hirono S. Three-dimensional structure-activity relationship analysis between motilin and motilide using conformational analysis and a novel molecular superposing method.

Chemical & Pharmaceutical Bulletin 48:1835-1837, 2000

Gouda H., Yamazaki K., Hasegawa J., Hirono S. Refinement of NMR structures of α -conotoxin MI using molecular dynamics simulation with explicit solvent water and a full molecular force field. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 49:249-252, 2001

Radwan A.A., Gouda H., Yamaotsu N., Torigoe H., Hirono S. Radtional procedure for 3D-QSAR analysis using TRNOE experiments and computational methods: application to thermolysin inhibitors. *Drug Design and Discovery*, in press, 2001

2.学会発表

Kusuhara H., Nagata Y., Sugiyama D., Suzuki H. Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of the uptake of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid into rat choroid plexus. 14th International Conference Cerebral Vascular Biology Blood-Brain Barrier.

Nagata Y., Kusuhara H., Sugiyama D., Suzuki H. Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of the uptake of benzylpenicillin into rat choroid plexus. 14th International Conference Cerebral Vascular Biology Blood-Brain Barrier.

Sugiyama D., Kusuhara H., Suzuki H., Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the efflux of organic anions from the brain across the BBB. Gordon Conference.

Kusuhara H., Suzuki H. and Sugiyama Y. Choroid plexus in the brain disposition of antibiotics and other anionic drugs. Focus on choroid plexus

杉山、楠原他 RatOatp2 の基質多選択的輸送機構の解析 日本薬学会

森田、楠原他 有機アニオン輸送担体 Oat2 の肝取り込み過程における役割 日本薬学会

堤、油谷他、Classification of hepatocellular carcinoma by gene expression profiling analysis. 11th Genome Informatics Workshop.

諏訪、堤ほか Gene discovery of G-protein coupled receptors from human genome. 11th Genome Informatics Workshop.

又木、石井他 ヒトZnフィンガータンパク質クラスター(19q13.4)における新規遺伝子群のクローニング及び機能解析、第23回分子生物学会

赤池、村上他 中枢微小抑制性シナプス前神経終末部のフォーカル刺激、第74回日本薬理学会年会

中込、広野 グルタミン酸トランスポーターサブタイプに対する輸送阻害剤の結合配座モデルの探索、第28回構造活性相関シンポジウム

福井、濱野他 細胞環境系調節物質の脳細胞障害に対する神経保護作用の検索；新規脳蘇生法への試み 第18回日本蘇生学会

福井、福井他 脳細胞環境因子としての細胞外マトリックスを考慮した脳保護機構、第53回日本薬理学会西南部会

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

血液脳関門を介した輸送の評価と排出輸送機構の解明に関する研究、並びに脳送達を可能とするキャリアー分子の探索

主任研究者 杉山 雄一 東京大学・大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 血液脳関門ならびに血液脳脊髄液関門に発現される既知薬物トランスポーターの寄与率の決定、ならびに新規排出輸送ポンプの探索について検討を加えた。MDR1P-glycoprotein基質の脳分布のin vitroからの予測法に関する検討を行った。中枢に発現される有機アニオントランスポーター（rOatp1, rOatp2, rOat1, rOat3）の遺伝子発現系を作成し、阻害剤の探索を行った。digoxinがrOatp2に特異的であり、taurocholateならびにpaminohippurateはそれぞれOatp, Oatに対して選択的であった。血液脳関門を介したEstradiol glucuronideの脳内からの排出に対して、これら阻害剤を適用したところ、rOatp2の寄与率は40%程度であることが明らかとなった。Mrp1ノックアウトマウスを用いて、脳内あるいは脳室内投与後の、脳内濃度および脊髄液中濃度を測定した。Estradiol glucuronideをモデル基質とした場合には、脳内、脳室内いずれの経路においても正常マウスとMrp1ノックアウトマウスの間に差は見られなかった。しかし、probenecidにより排出は阻害されることから、トランスポーターが関わっていることが示唆された。MDR1P-glycoprotein発現細胞での経細胞輸送と正常マウスとP-gpノックアウトマウスにおける静脈内投与後の脳内濃度を測定した。両者の間には良好な相関関係が見られた。新規薬物トランスポーターの探索として、排出ポンプであるMRP（MRP1-6）のアミノ酸配列との相同性を有する4つの部分配列を、DNAデータベース上に見出した。ラット脳毛細血管から調製したRNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、期待される長さのフラグメントが増幅された。4つのフラグメントのうち、3つは最近報告されたMRP7と相同性が高いことから、そのマウスホモログであることが考えられる。残るひとつもNorthern blotで発現量を比較したところ、精巣への発現が高いものの脳での発現はほとんど見られなかった。

A. 研究目的

血液脳関門・血液脳脊髄液関門は、血液中からの異物の侵入を制限するバリアーとして働いている。中性・カチオン性薬物の場合においては一次性能動輸送により、薬物の中枢移行は妨げられている。このトランスポーターを欠損した動物では、薬物の脳内濃度の著しい増加が報告されている。一方、アニオン性薬物も脳内あるいは脳室内からの薬物の排出にトランスポーターが関わっていることが示されているものの、特に排泄側のトランスポーターに関しては、明確な知見は得られていない。薬物、特にアニオン性薬物の中枢へのデリバリーを考えたときに、関門における排出トランスポーターを明らかにすることは非常に重要なテーマであると考えられる。関門においてはOatp2、MRP1による能動的な排出輸送の関与が示唆されているものの、これらトランスポーターによりどの程度排出輸送過程が説明できるのか、定量的な評価はなされていない。そこで、本研究では、トランスポーターに対する阻害剤ならびにMRP1ノックアウトマウスを用いて、血液脳関門・血液脳脊髄液関門における排出輸送を正常マウスと比較することで、両トランスポーターの寄与率に関する定量的な知見を得ることを目的とした。血液脳関門に発現される新規排出トランスポーターの探索を行った。更に、仮に血液脳関門で薬物がくみ出される場合、薬物トランスポーターでの輸送活性と中枢におけ

る分布容積の関係は不明である。そこで、遺伝子発現系と遺伝子欠損動物を用いた比較検討を行った。

B. 研究方法

(1) 関門におけるOatp2、MRP1の寄与

ラット脳内に薬液を投与し、一定時間後に脳内薬物残存率を測定した。阻害剤は同時投与した。阻害剤の選択性を明らかにするために、常法に従いブタ腎由来のLLC-PK1細胞を用いて、遺伝子発現系を作成した。遺伝子発現系を用いて、種々薬物による阻害効果を測定し、阻害定数から選択性を明らかとした。マウス脳内ならびに脳室内に薬液を投与し、一定時間後、マウスを屠殺し、脳内残存量ならびに脊髄液中濃度を測定した。マウスを用いた脳室内投与については、報告があるものの、脊髄液採取に関しては本研究がはじめてである。そこで、1) 投与部位、2) 採取部位、3) 回収率を指標に、種々検討を加えた。Magnaを起点として側方に+1mm、後方に+1mm、下方に+2.5mmに投与し、大槽穿刺法により脊髄液を回収すると最も回収率は高く、脊髄液も5~10 μ l/マウス採取可能となった。

(2) MDR1P-glycoproteinの基質となる薬物の脳分布性の予測

MDR1P-glycoproteinの遺伝子発現系を作成し、その経細胞輸送を測定した。ATPの加水分解能を薬物存在下・非存在下において測定した。MDR1P-gp欠損マウ

スと正常マウスに静脈内投与後、血漿中濃度と脳内濃度を測定した。

(3) 新規MRP familyの探索

既知MRP familyのアミノ酸配列との相同性を指標にして、DNAデータベースの検索を行った。検索の結果見つかった部分配列に対するプライマーを作成した。ラット脳より毛細血管内皮細胞を単離し、更にRNAを調製した。このRNAを鋳型として用いて、RT-PCRにより血液脳関門における発現を確認した。

C. 研究結果

1) rOatp2の関門における排出輸送機構の関与
rOatp1, rOatp2, rOat1, rOat3の遺伝子発現系を作成し、estradiol 17 β glucuronideの細胞内蓄積量を測定したところ、rOat1ではコントロール細胞との間に有意な差は見られなかった。rOatp1, rOatp2, rOat1, rOat3各発現細胞への初期取り込み速度を測定し、probenecid, taurocholate, p-aminohippurate, digoxinによる阻害効果を検討したところ、probenecidは非選択的であり、digoxinがrOatp2に特異的であり、taurocholateならびにpaminohippurateはそれぞれOatp, Oatに対して選択的であった。estradiol 17 β glucuronideを脳内に投与後、その消失の半減期は約20分であった。この排出に対する阻害効果を検討したところ、probenecid, taurocholateによりほぼ完全に、p-aminohippurateにより20%、digoxinにより40%が阻害された。

2) MRP1の関門における排出輸送機構の関与
MRP1の典型的な基質となるestradiol 17 β glucuronide(E2 17 β G)を脳内・脳室内に投与した。その後の、脳内濃度・脳室内濃度を測定した。正常マウスにおいて、両関門を介した排出は、有機アニオントランスポーターの阻害剤であるprobenecidにより阻害された。脊髄液中からの消失には、脊髄液のターンオーバーもあるが、E217 β Gの消失は脊髄液のターンオーバー速度よりも、3倍程度速いが、probenecidによりこのターンオーバー速度にまで排出輸送は低下した。正常マウスとMRP1ノックアウトマウス間で、脊髄液中からの排出輸送を比較すると、少なくともE217 β Gの排出に関しては差は見られなかった。同じくMRP1の基質となるグルタチオン抱合体(dinitrophenyl glutathione)の排出を比較したところ、MRP1ノックアウトマウスにおいて若干の低下が見られた。しかし、ターンオーバー速度にまでは低下していなかった。

3) MDR1P-gp基質の脳分布容積の予測
MDR1P-gp基質12化合物を選択し、MDR1P-gp発現細胞を介した経細胞輸送と、正常マウスとMDR1P-gp欠損マウスとの血漿脳分配係数の比には良好な相関関係が見出された。一方、ATPの加水分解能で評価した場合、加水分解能を増加させるものはすべて基質であったが、基質であるにも関わらずATPの加水分解能には影響を与えないものもあった。

4) 新規MRP familyの探索
検索の結果見つかった4つのフラグメントすべてが、脳毛細血管内皮細胞より増幅された。このうち、3つは、当初検索をかけた時点では登録されていなかったヒトMRP7と高い相同性(~80%)を示した。得られたフラグメントをプローブとして、Northern blotを行ったところ、期待とは異なり、脳への発現は非常に少ないか、あるいはほとんど見られなかった。MRP7

はすべての組織において、非常に低い発現を示したのに対して、新規のMRPは、精巣特異的に高発現していた。

D. 考察

1) 関門におけるOatp2の寄与
阻害剤の選択性から、digoxinで阻害がかかる部分がOatp2の寄与率であることが示唆される。すなわち、全排出の40%程度である。また、PAHにより20%が阻害されることから、Oatの関与も20%程度であることが示唆される。Oatp2とOatをあわせても60%程度でしか説明できないことから、他のトランスポーターの関与もおそらくあり、今後の検討を必要とする。

2) 正常マウスとMRP1ノックアウトマウスとの比較から、少なくともE217 β GやDNP-SGといった有機アニオンの血液脳関門・血液脳脊髄液関門における排出輸送における寄与率は小さいものと思われる。ただし、脳内、脳室内投与による消失の評価の欠点として、脳側・脊髄液側膜における取り込み過程が全体の消失の律速となり、かつMRP1が単独で排出に関わっていない場合、仮にMRP1を欠損したとしても、全体の消失として低下しにくい。今回の結果もこれに起因している可能性が考えられる。この点の克服として、脳毛細血管・脈絡叢内において、グルタチオン抱合・グルクロン酸抱合を受ける親化合物を静脈内投与し、脳内濃度、脊髄液中濃度を測定する必要がある。この場合、上記のような条件下においてもMRP1欠損に伴う機能低下も評価し得る。現在、系の立ち上げを行っている。しかし、いずれにしても関門における排出機構はMRP1単独では説明できず、他のトランスポーターの関与が考えられる。

3) MDR1P-gp発現細胞の経細胞輸送と正常マウスとMDR1P-gp欠損マウスの脳内濃度の比には、良好な相関関係が観察されたことから、薬物トランスポーターの遺伝子発現細胞での経細胞輸送が、in vivoでの中枢移行性を評価する際の指標となりうるということが示唆された。一方、ATPの加水分解能を評価した場合には、false negativeな予測を避けることができないことから、仮に否定的にでた場合に、慎重な解釈が必要であろう。経細胞輸送の評価により、より効率的に中枢移行性の高い薬物をスクリーニングすることができると期待される。

4) MRP7との相同性を考慮すると、単離したフラグメントのうち3つはラットMRP7に相当するものと思われる。1つはまったく新規のMRP familyのトランスポーターであるが、Northern blotの結果によると、脳における発現は見られず、脳毛細血管内皮細胞に発現しているとは考えにくい。

E. 結論

Estradiol 17 β glucuronideの脳内からの排出に占めるOatp2の寄与は40%であると見積もられた。阻害剤の選択性を明らかにすることで、比較的簡便に関門における排出に関わる薬物トランスポーターの寄与率を評価できることが示唆された。今後、新規薬物トランスポーターが血液脳関門で同定された際にも、阻害剤の選択性を利用して関門を介した排出過程に占める寄与率を議論する上で有効な方法論である。DNP-SGの

排出輸送に差が見られたことから、血液脳脊髄液関門においてMRP1が、側底膜における排出輸送に関わっていることが示唆された。しかし、単独で説明できず、他のトランスポーターの関与も考えられる。血液脳関門から増幅したMRPと類似の配列を持つフラグメントについては、脳での発現が低く、関門で機能しているとは考えにくい。MDR1P-gpを用いた比較実験から、遺伝子発現細胞を用いて評価された経細胞輸送が、*in vivo*での中枢移行性を評価する際のよい指標となる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Morita N., Kusuhara H., Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of rat organic anion transporter 2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *submitted*.

Adachi Y., Suzuki, H., Sugiyama Y. Comparative studies on *in vitro* methods for evaluating *in vivo* function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, *submitted*.

Sugiyama D., Kusuhara H., Abe T., Meier P.J., Sekine T., Endou H., Suzuki H., Sugiyama Y. Characterization of the efflux transport of 17 β -estradiol-D-17 β -glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *in press*.

Kusuhara H., Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Drug Discovery Today* 6: 206-212, 2001.

Kusuhara H., Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier. *Drug Discovery Today* 6: 150-156, 2001.

Sugiyama Y. and Kato Y. Tissue-selective drug delivery utilizing transporters and receptors. In "Biomaterials and Drug Delivery toward New Millennium" Ed. By Park K.D., Kwon I.C., Yui N., Jeong S.Y. and Park K. pp 383-393, 2000.

2. 学会発表

Kusuhara H., Nagata Y., Sugiyama D., Suzuki H. Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of the uptake of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid into rat choroid plexus. *Ivth International Conference Cerebral Vascular Biology Blood-Brain Barrier*.

Nagata Y., Kusuhara H., Sugiyama D., Suzuki H. Sekine T., Endou H., Sugiyama Y. Characterization of the uptake of benzylpenicillin into rat choroid plexus. *Ivth International Conference Cerebral Vascular Biology Blood-Brain Barrier*.

Sugiyama D., Kusuhara H., Suzuki H., Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the efflux of organic anions from the brain across the BBB. *Gordon Conference*.

Kusuhara H., Suzuki H. and Sugiyama Y. Choroid plexus in the brain disposition of antibiotics and other

anionic drugs. *Focus on choroid plexus*

杉山大介、楠原洋之、設楽悦久、鈴木洋史、杉山雄一 RatOatp2 の基質多選択的輸送機構の解析 日本薬学会

森田直美、楠原洋之、杉山大介、関根孝司、遠藤仁、杉山雄一 有機アニオン輸送担体Oat2の肝取り込み過程における役割 日本薬学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

cMOAT / MRP2と相互作用する薬物の立体配座解析と三次元構造特徴の抽出に関する研究

分担研究者 広野修一 北里大学 薬学部 創薬物理化学教室 教授

研究要旨 脂溶性の高い有機アニオン系化合物の細胞外への排出に関与するABCトランスポーターであるcMOATは主に肝臓での胆汁排泄機構、とくに胆管側膜を介した肝細胞から胆汁への化合物の排泄に関与しているが、cMOATの広範な基質認識特異性を化合物の構造との関連から明らかにした例は報告されておらず、立体構造の決定された異物排泄トランスポーターもまだ無い。また、cMOAT様の輸送担体が血液脳関門にも存在すること及びcMOATが多剤耐性因子としての性格を有することが示唆されており、cMOATと化合物結合部位のより詳細な理解は、化合物の侵入や排泄、脳移行性を考えるうえで重要である。そこで当研究室で開発した計算化学的手法を用いて、化合物が実際にcMOATに結合している構造（結合配座）を推定し、cMOAT結合化合物の三次元構造特徴を抽出することを試みた結果、4000近くあった結合配座候補が現段階で16にまで絞り込むことができた。

A.研究目的

血液脳関門、血液脳脊髄液関門に存在する薬物輸送担体（トランスポーター）蛋白質と薬物の相互作用を、コンピュータを使った新規医薬品の合理的分子設計技術を応用して立体構造化学的に解析し、相互作用に重要な役割を果たす官能基の3次元空間配置を決定する。この結合薬物の3次元構造情報と他の多くの実験情報に基づき、種々の有効な分子設計を行い、薬物の脳内動態の予測及び脳内濃度のコントロールを合理的に行うことを最終目標とする

B.研究方法

(1) 高温分子動力学法による分子のコンフォメーション解析

当研究室では既に分子動力学法による分子の立体配座解析プログラム（CAMDAS）を開発済みである。このプログラムは、化合物分子に関して高温分子動力学法で得られる膨大なトラジェクトリから配座のサンプリングを行い、類似構造をクラスタリングする。さらに、各クラスタを代表する配座についてエネルギー極小化により構造最適化を行い、再度クラスタリングして重要なエネルギー極小配座集団を自動抽出するという特徴を持つ。このプログラムを用い、まず5個程度の、cMOAT結合薬物についてエネルギー極小配座集団を得る。

(2) 分子重ね合わせプログラムによる分子の重ね合わせ

上記の薬物分子のそれぞれに関して、1つの分子内の原子団（官能基）を疎水性、水素結合供与性、水素結合受容性、水素結合供与/受容性の4つに分類し、それらを球（官能基特性球）で表現する。

次に、開発済みの分子重ね合わせプログラムを用い、3次元空間内で並進、回転により異なる分子のある配座同士を重ね合わせ、同一特性を持つ球が重なった場合、正の得点を、異なった特性球が重なった場合は負の得点を与えて、最高総得点になる重ね合わせ、つまり、与えた2配座に対して、同一特性球が最も重なっている重なりを掃き出す。

2つの分子の配座集団に対して、分子重ね合わせプログラムを使って、順次、配座の重ね合わせを行う。まず化合物1と化合物2の配座集団に対し重ね合わせを行い、共通配座（高得点の配座）を抽出する。次にその共通配座と化合物3の配座集団の重ね合わせを行う。この操作を化合物4、5に対して繰り返す。最終的に全部の化合物に対して共通する原子団配置を有する配座が抽出される。

この段階で、複数の配座セットが得られた場合、可能なら3次元定量的構造活性相関解析を行い、統計的数値の最良のセットを、各分子のcMOAT結合配座（活性配座）と特定する。又、同時に、これらの全分子の活性配座に共通する化学特性球（原子団）の空間的配置が、cMOATとの結合に重要であると結論づけられる。

（倫理面への配慮）

我々のグループの研究には、倫理面の問題は発生しない。

C. 研究結果

cMOAT結合薬物18分子について、CAMDASプログラムにより、エネルギー極小配座集団を得た。続いて、活性の最も高い化合物1を基準として、SUPERPOSEプログラムを用いて分子重ね合わせを行った。化合物9、12、11、10との重ね合わせにより、3846配座から結合候補配座として、12配座を抽出することができた。

D. 考察

現在は、CAMDASによる立体配座集団の生成を終え、重ね合わせにより結合候補配座を絞り込んでいる段階で、はじめ4000近くあった配座を12にまで絞り込むことができた。今後はさらに3ないし4個の化合物との重ね合わせの計算を行い、結合候補配座をさらに絞り込み、3次元定量的構造活性相関解析手法として代表的なCoMFA解析を行い、結合配座を決定するとともに、cMOATと相互作用する薬物の3次元的な構造特徴を明らかにしていく予定である。

E. 結論

現在、血液脳関門・血液脳脊髄液関門に存在する薬物輸送担体（トランスポーター）蛋白質と薬物の相互作用を、立体構造化学的観点で解析する研究はほとんど無いと言って良い。本研究での、蛋白質側の立体構造情報がない場合の薬物の結合/活性配座の予測手法により、cMOAT結合薬物の3次元ファーマコフォア（結合に必須の官能基の空間的配置）をかなり解明することができ、さらに研究を進めることにより、薬物の脳内動態の予測及びコントロールを合理的に行うことが可能になると期待できる。

F. 健康危険情報

我々のグループの研究では、特に注意すべき危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hiroaki Gouda, Toshiaki Sunazuka, Satoshi Omura, and Shuichi Hirono

"Three-dimensional structure-activity relationship analysis between motilin and motilide using conformational analysis and a novel molecular superposing method"

Chem. Pharm. Bull., **48**(11), 1835-1837 (2000)

Hiroaki Gouda, Ken-ichi Yamazaki, Jun Hasegawa, and Shuichi Hirono

"Refinement of NMR structures of a-conotoxin MI using molecular dynamics simulation with explicit solvent water and a full molecular force field"

Chem. Pharm. Bull., **49**(3), 249-252 (2001)

Awwad A. Radwan, Hiroaki Gouda, Noriyuki Yamaotsu, Hidetaka Torigoe, and Shuichi Hirono

"Rational Procedure for 3D-QSAR Analysis using TRNOE Experiments and Computational Methods: Application to Thermolysin Inhibitors"

Drug Design and Discovery, in press (2001)

2. 学会発表

「グルタミン酸トランスポーターサブタイプに対する輸送阻害剤の結合配座モデルの探索」

（北里大・薬）○中込 泉、広野修一

第28回構造活性相関シンポジウム、京都（2000年10月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生科学研究費補助金（脳研究事業）
分担研究報告書

機能ゲノミクスによる血液脳関門における薬物輸送システム
の解明に関する研究

分担研究者 油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター助教授

研究要旨 最近発表されたヒトゲノム配列情報の概要版に加えて、マウスあるいはラットのゲノム情報も用いて血液脳関門に特異的な新規輸送担体遺伝子の同定を行うインフォマティクスシステムを構築し、ラットを用いたin vivo実験系を確立し、マイクロアレイによる発現プロファイル解析に着手した。

A. 研究目的

虚血性脳疾患に際しての脳機能障害は世界にも類を見ない高齢化社会を迎える我が国において早急な対策が必要とされる重要課題である。神経細胞に直接効果を示すような化合物の効果的な送達をはかるべく、血液脳関門(BBB)に存在する薬物輸送担体に注目し、BBB機能特性を利用した新規脳送達システムを開発することにより、新たな治療法を確立することにある。

B. 研究方法

1. ラット脳血管内皮細胞における遺伝子発現プロファイルの解析

ラット脳血管内皮細胞を単離し、その遺伝子発現プロファイルをオリゴヌクレオチドアレイにより、解析する。大動脈内皮細胞におけるプロファイルと比較し、特性を検討した。

Rat_Aorta_S.DAT:SHRのAORTA
Rat_Aorta_W.DAT:WKYのAORTA
Rat_brain_A.DAT:SHのWillis輪
Rat_brain_B.DAT:WKのWillis輪
Rat_brain_E.DAT:WKYの脳表の細動脈

2. 機能ゲノミクス解析からの新規ABCトランスporter遺伝子の同定

InterPro release 2.0 (2000年10月リリース版)

は Pfam 5.5, PRINTS 27.0, PROSITE 16.25, ProDom 2000.1 そして最新の SWISS-PROT および TrEMBL データから構成されている。このリリースには 3204 エントリーが含まれ、767 種のタンパクドメイン, 2372 ファミリー, 50 の繰り返し配列 および 15 の翻訳後修飾部位の情報を有している。

ヒトゲノム配列概要版より予測された遺伝子の中から ABC 輸送タンパクファミリーに属すると思われる 58 遺伝子が全ゲノム配列中に存在することが可能となる。下記の URL で参照できる。

<http://www.ensembl.org/perl/domainview?domainentry=IPR003439>

3. 脳虚血時の遺伝子発現プロファイル解析

ラットを全脳虚血にした際に脳における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。NCBI の homoloGene を用いることにより、ヒト、ラット、マウスの間での遺伝子比較が可能である。

(倫理面への配慮)

本年度の研究計画ではヒト検体は使用しない。

C. 研究結果

1. ラット脳血管内皮細胞における遺伝子発現プロファイルの解析

GeneChip (Affymetrix社) を用いて大動脈、Willis輪の動脈、脳表細動脈における約8,000個のラット遺伝子の発現プロファイル解析を行い、Willis輪に特異的な遺伝子の単離を試みた。ラットU34Aアレイにより少なくとも18種類のABCトランスポーター遺伝子(表1)を解析し得たが、Willis輪特異的に発現を示す遺伝子は認められなかった。

2. 機能ゲノミクス解析からの新規ABCトランスポーター遺伝子の同定

概要版ヒトゲノム配列から遺伝子予測プログラムよりABC輸送担体に相同性を有する遺伝子が58種類認められた(表2参照)。これらの遺伝子について組織特異性などの詳細な解析を行っている。

3. 脳虚血時の遺伝子発現プロファイル解析

東京大学脳神経外科学教室との共同研究により、脳虚血時の遺伝子発現プロファイル解析に着手した。

D. 考察

BBBの機能特性を担う脳血管内皮細胞において特異的に発現を行っているABC輸送タンパクの同定を試みた。さらに多数の、最大25,000のラット遺伝子を解析することによりBBB特異性の高い新規のABCトランスポーターを同定する予定である。また、杉山研究室との共同によりマウスあるいはラットの脳毛細血管における発現プロファイル解析も開始する予定である。フィージビリティ・スタディとしてはヒト臍帯内皮細胞HUVECを用いて比較的発現が限定された新規遺伝子の同定に成功しており、脳血管に特異的な遺伝子の同定が期待される。一方マイクロダイセクション法の導入により、血管内皮細胞のみを組織切片から収集することが可能となるので、次年度からプロファイル解析へも応用してゆく。

Ensemblなどの遺伝子予測は計算機による

自動化されたものであるため、さらに詳細なアノテーションが必要と考えられた。ラットとヒト遺伝子の相同遺伝子の対応はラットの遺伝子配列情報がまだ不十分であるために不明な点が多いが、今後データを収集してゆく。

脳虚血時におけるBBBすなわち脳血管内皮細胞における発現プロファイル解析を進めてゆきたい。実験より得られた候補遺伝子について、ヒト脳組織における発現状況を組織染色あるいはin situハイブリダイゼーション法によって確認をとる。

E. 結論

最近発表されたヒトゲノム配列情報の概要版に加えて、マウスあるいはラットのゲノム情報も用いて新規輸送担体遺伝子の同定を行うインフォマティクスシステムを構築し、ラットを用いたin vivo実験系を確立した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Hippo Y, et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Research* 61: 889-895, 2001

Tsutsumi S, Kobune Y, Midorikawa Y and Aburatani H. Classification of Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling Analysis. *Genome Informatics* 11: 240-241, 2000

Suwa M, Sato T, Okouchi I, Mikoshiba M, Akiyama Y, Asai K, Matsumoto S, Tsutsumi S and Aburatani H. GeneDiscovery of G-Protein Coupled Receptors from Human Genome. *Genome Informatics* 11: 410-411, 2000

Ge X, Yonamine S, Mi Y, Tsutsumi S, Kobune Y, Aburatani H and Iwata S. A Physics-Inspired algorithm for information visualization with application to gene expression analysis. *Journal of the School of Engineering, The University of Tokyo, XLVII*: 89-103, 2000

Ishii M, Hashimoto Si, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T, Aburatani H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in the transcript profiling analysis. *Genomics* 68(2): 136-143, 2000

Murakami T, Mataki C, Nagao C, Umetani M, Wada Y, Ishii M, Tsutsumi S, Kohro T, Saiura A, Aburatani H, Hamakubo T and Kodama T. The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor α using DNA microarray analysis. (2000) *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press.

Mataki C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hamakubo T and Kodama T. (2000) A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor α . *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, in press

2. 学会発表

11th Genome Informatics Workshop (2000年12月、恵比寿)

Classification of Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling Analysis.

堤、油谷、ほか

Gene Discovery of G-Protein Coupled Receptors from Human Genome

諏訪、堤、油谷、ほか

第23回日本分子生物学会 (2000年12月、神戸)

ヒト Zn フィンガータンパク質クラスター (19q13.4)における新規遺伝子群のクローニング及び機能解析

又木、石井、堤、和田、油谷、浜窪、児玉

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 Affymetrix Rat U34A array により解析できる ABC 輸送タンパク遺伝子

下記の 18 遺伝子が ABC 輸送タンパク遺伝子に属すると確認された。

AB010466_s_at	AB010466 Rattus norvegicus mRNA for multidrug resistance-associated protein (MRP)-like protein-1 (MLP-1), complete cds
AB010467_s_at	AB010467 Rattus norvegicus mRNA for multidrug resistance-associated protein (MRP)-like protein-2 (MLP-2), complete cds
D86086_s_at	D86086 Rat mRNA for canalicular multispecific organic anion transporter(cMOAT), complete cds
L15079mRNA_s_at	L15079mRNA RATPGLYCO Rat p-glycoprotein mRNA, complete cds
M81855_at	M81855 Rat mdr mRNA sequence /cds=UNKNOWN /gb=M81855 /gi=205360 /ug=Rn.9679 /len=4254
X57523_at	X57523 R.norvegicus mtp1 mRNA /cds=(0,2224) /gb=X57523 /gi=56716 /ug=Rn.10763 /len=2664
X57523_g_at	X57523 R.norvegicus mtp1 mRNA /cds=(0,2224) /gb=X57523 /gi=56716 /ug=Rn.10763 /len=2664
X96394_at	X96394 R.norvegicus mRNA for multidrug resistance protein /cds=(0,325) /gb=X96394 /gi=1292883 /ug=Rn.10495 /len=813
AJ224120_at	AJ224120 Rattus norvegicus peroxisomal membrane protein Pmp26p (Peroxin-11) /cds=(138,878) /gb=AJ224120 /gi=3150212 /ug=Rn.14519 /len=1194
S66618_at	S66618 mdr1a=multidrug-resistance transporter P-glycoprotein [rats, mRNA Partial, 763 nt]
X90642mRNA_at	X90642mRNA RNMRPID1 R.norvegicus mRNA for multidrug resistance protein (ID:1)
AF019628_at	AF019628 Rattus norvegicus sulfonylurea receptor 2B mRNA, complete cds
AF087838_s_at	AF087838 Rattus norvegicus sulfonylurea receptor 2B (SUR2B) mRNA, complete cds
AF106563_s_at	AF106563 Rattus norvegicus P-glycoprotein-like ATP-binding cassette transporter mRNA, complete cds
M89906_at	M89906 RATCFTR Rattus norvegicus cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, partial cds
X63854_at	X63854 Rat mRNA for transporter polypeptide mtp2 /cds=(89,2200) /gb=X63854 /gi=56718 /ug=Rn.10372 /len=2426
D83598_at	D83598 Rat brain mRNA for sulfonylurea receptor, complete cds /cds=(270,4907) /gb=D83598 /gi=1377794 /ug=Rn.10528 /len=5000
L18948_at	L18948 Rattus norvegicus intracellular calcium-binding protein (MRP14) mRNA, complete cds /cds=(31,372) /gb=L18948 /gi=488156 /ug=Rn.6703
D90038_at	D90038 Rat liver 70-kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) mRNA /cds=(35,2014) /gb=D90038 /gi=220861 /ug=Rn.7024 /len=3303

表 2 Ensembl により予測された遺伝子のなかで Interpro に対する検索の結果、ABC 輸送タンパク (IPR003439) にヒットするゲノム配列

Gene ID	Genome location	No.	Gene ID	Genome location	No.
ENSG0000001626	chr7 121.4 MBase	2	ENSG00000099566	chr21 12.6 MBase	1
ENSG0000004732	chr16 26.0 MBase	1	ENSG00000099911	chr22 13.8 MBase	1
ENSG0000004846	chr7 21.0 MBase	8	ENSG00000100294	chr22 40.0 MBase	1
ENSG0000005339	chr16 6.2 MBase	1	ENSG00000101126	chr20 53.5 MBase	1
ENSG0000005471	chr7 89.8 MBase	8	ENSG00000101626	chr18 7.4 MBase	1
ENSG0000006071	chr11 17.8 MBase	3	ENSG00000101630	chr18 7.4 MBase	1
ENSG00000023839	chr10 108.8 MBase	4	ENSG00000101986	chrX 160.1 MBase	2
ENSG00000033050	chr7 158.0 MBase	4	ENSG00000102382	chrX 69.7 MBase	2
ENSG00000042889	chr21 40.4 MBase	2	ENSG00000102397	chrX 72.6 MBase	1
ENSG00000051100	chr6 49.0 MBase	5	ENSG00000102849	chr16 0.3 MBase	1
ENSG00000061820	chr13 99.0 MBase	2	ENSG00000103153	chr16 3.4 MBase	2
ENSG00000064687	chr19 72.3 MBase	2	ENSG00000103183	chr16 0.5 MBase	1
ENSG00000067149	chr4 0.1 MBase	1	ENSG00000103222	chr16 21.0 MBase	2
ENSG00000067596	chr17 46.6 MBase	1	ENSG00000103263	chr16 22.7 MBase	1
ENSG00000069431	chr12 22.7 MBase	7	ENSG00000103898	chr15 18.5 MBase	2
ENSG00000070557	chr17 74.1 MBase	1	ENSG00000106767	chr9 121.0 MBase	1
ENSG00000072501	chrX 46.9 MBase	2	ENSG00000106906	chr9 106.6 MBase	2
ENSG00000072790	chr3 2.0 MBase	2	ENSG00000106920	chr9 107.4 MBase	2
ENSG00000072870	chr16 22.9 MBase	20	ENSG00000107296	chr9 141.3 MBase	2
ENSG00000073734	chr2 176.2 MBase	2	ENSG00000108055	chr10 121.1 MBase	1
ENSG00000074249	chr16 57.6 MBase	4	ENSG00000108846	chr17 54.7 MBase	3
ENSG00000078067	chr3 210.8 MBase	3	ENSG00000108981	chr17 74.5 MBase	1
ENSG00000080342	chr18 7.5 MBase	1	ENSG00000109429	chr4 92.6 MBase	1
ENSG00000080458	chr6 36.2 MBase	2	ENSG00000109513	chr4 153.9 MBase	2
ENSG00000080469	chr6 36.2 MBase	2	ENSG00000110065	chr11 61.9 MBase	1
ENSG00000081098	chr3 163.4 MBase	1	ENSG00000111304	chr12 133.9 MBase	2
ENSG00000081911	chr1 265.3 MBase	2	ENSG00000111927	chr6 31.5 MBase	2
ENSG00000082008	chr7 157.8 MBase	4	ENSG00000114770	chr3 208.9 MBase	3
ENSG00000085563	chr7 89.7 MBase	6	ENSG00000115256	chr2 168.7 MBase	2
ENSG00000088455	chr13 99.1 MBase	2	ENSG00000115391	chr2 176.3 MBase	1
ENSG00000091262	chr16 21.0 MBase	5	ENSG00000115407	chr2 224.8 MBase	2
ENSG00000091311	chr16 23.1 MBase	5	ENSG00000115482	chr2 102.8 MBase	1
ENSG00000092812	chr1 264.3 MBase	2	ENSG00000115657	chr2 229.6 MBase	1
ENSG00000096429	chr6 34.2 MBase	3	ENSG00000116725	chr1 221.7 MBase	1
ENSG00000097054	chr1 105.5 MBase	2	ENSG00000117528	chr1 106.2 MBase	2
ENSG00000099565	chr21 12.3 MBase	1			

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

障害神経細胞に対する有効治療薬および薬物輸送システムを開発するための細胞レベルにおける研究

分担研究者 赤池 紀生 九州大学大学院医学研究院 教授

研究要旨 降圧作用を発現する延髄孤束核ニューロンと、このニューロンを制御する興奮性入力について検討した。その結果、ニューロンにはnon-NMDA受容体が、興奮性のグルタミン酸作動性神経終末にはATPとバニロイド両受容体が共存し、降圧の促進を行う共に降圧と痛みの発現との間にクロストークの存在が示唆された。

A. 研究目的

中枢循環調節に重要な役割をもつ孤束核のNTS領域ニューロンそのものの特性とこのNTSニューロンの活動を制御している興奮性神経終末部の生理機能を解明する。

B. 研究方法

ラットNTSニューロンを機械的に単離し、単離ニューロンにグルタミン酸作動性興奮性神経終末部が付着した「シナプス・ブートン標本」を作成し、これらの細胞活動をパッチ電極で電圧固定下に記録する。

C. 研究結果

大動脈弓圧受容体から発する降圧神経を蛍光色素のDi-Iで生体染色し、その投射を受けるNTSニューロンはnon-NMDA受容体を多く発現していた。また、NTSニューロンを制御する興奮性のグルタミン酸作動性神経終末部にはバニロイド受容体(VR-1)が存在し、カプサイシンの投与によってグルタミン酸の放出が増加した。このため、迷走神経が活性化され、血管拡張に引き続き、血圧降下が生じることが示唆された。また、ATPが作用するP2X受容体も本神経終末部に存在して、グルタミン酸の放出を増加した。これらVR-1とATP両受容体の間には相互干渉がみられた。

D. 考察

延髄には血液脳関門が十分に発達していないか、あるいはないといわれていることから、血液中のカプサイシンは直接、孤束核領域に侵入して、降圧作用を起こすと考えられる。またVR-1とP2X受容体の共存は、血圧調節機構と痛みのクロストークの存在を示唆するが、詳細は今後の検討を待たねばならない。

E. 結論

降圧作用を発現する延髄孤束核ニューロンには、non-NMDA受容体が多く存在する。また、本ニューロ

ンを制御する興奮性神経終末にはバニロイド(VR-1)とATP両受容体が共存して、ともに孤束核ニューロンを活性化させ、減圧をもたらすことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

赤池 紀生、村上 信哉、桂林 秀太郎 中枢微小抑制性シナプス前神経終末部のフォーカル刺激、第74回日本薬理学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

脳保護効果を有する「脳環境系」調節因子による脳蘇生法を開発するための研究

分担研究者 渡辺 泰雄 東京医科大学薬理学講座 助教授

研究要旨 本研究は脳機能障害時での血液脳関門の機能特性および新規脳保護法を検索した。①脳機能障害モデル動物を作成し、Ca拮抗薬の薬効検索から脳虚血時の血液脳関門の異常を示唆した。②脳環境系を考慮した新規脳機能障害治療法として細胞外マトリックス調節物質の薬理効果を検索し、コンドロイチン硫酸化合物であるCS-PEや、キノコの抽出液であるCJ-01に脳保護効果を有することを見出した。

A.研究目的

本研究は①脳循環を1回もしくは2回連続遮断し虚血状態を作成し、2種のCa拮抗薬による薬効から血液脳関門（BBB）の機能特異性を明らかにすることを目的とした。さらに、②細胞外マトリックス（ECM）の脳保護における役割を明確にするためにECM調節薬と考えられる物質の薬効を検索し考究した。

B.研究方法

1) 脳虚血の作成法は4VO法に従った。虚血時間は10分間として連続虚血は初回虚血1時間後に施行した。2) 記憶障害の検索は8字迷路法にて行った。3) nimodipine (Nim)、amlodipineは初回虚血前30分に腹腔内投与とした。②1) 培養細胞は、神経細胞が豊富な群、神経細胞とグリア細胞が混在した群、グリア細胞が豊富な群の三群とした。2)細胞障害は新規蛍光マルチプレートに接種した細胞にCalcein AM (最終濃度5 μM)添加後75分間incubateして測定した。3) 細胞外TNFαはELISA法、アポトーシスは蛍光法で測定した。4) LPSあるいはGluやアンドーシスの処置前後にCS、CS-PEあるいはCJ-01を添加した。（本研究は東京医科大学動物実験委員会の許可を得て行われた。）

C.研究結果

①虚血群に字迷路検索での正選択数の著名な減少、誤選択数の著名な増加が確認された。一方、Ca拮抗薬投与群では、一回虚血において、いずれの投与群も対照群と比較して統計的に有意な差を見出す結果は得られなかったが、連続虚血では、対照群と比較してNim投与で有意な改善効果認められた。②LPSは細胞外TNFαを急激に増量させた。他の刺激因子は細胞死を生じさせる割合は高いが細胞外TNFα量の増量の程度は低かった。一方、ECM調製機能を有すると思われるCS-PEやCJ-01は用量依存的な刺激因子誘発脳細胞死の阻害効果が観察された。

D.考察

①Nimの投与により連続虚血誘発の記憶障害が改善された結果はNimがBBBを透過することによって神経保

護効果を発現したものと思われる。②CS-PEやCJ-01は脳機能障害時発現時にECMを介する脳環境系調節作用により保護効果を有することが示唆された。

E.結論

本研究の成果は、連続虚血で誘発されるBBBの薬物移行性での以上を見出し、且つECM調整作用物質を応用した新しい脳保護治療法への発展性wしさを示している。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文

Taya K., Watanabe Y., Kobayashi H. and Fujiwara M. Nimodipine improved the disruption of spatial induced by cerebral ischemia. *Physiology & Behavior* 70:19-25,2000
Okita M., Watanabe Y., Taya K., Utsumi H. and Hayashi T. Presynaptic L-type Ca²⁺ channel on excessive dopamine release from rat caudate putamen. *Physiology & Behavior* 68:641-649, 2000

Miura I., Miyamoto K., Nakamura K., Watanabe Y. Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis. *Life Science* 68, in press,2001

2. 学会発表

福井秀公, 濱野裕子, 野口 将, 本間豊彦, 渡辺省五, 一色淳, 渡辺泰雄細胞環境系調節物質の脳細胞障害に対する神経保護作用の検索; 新規脳蘇生法への試み 第18回日本蘇生学会

福井秀公, 福井容子, 金子麻衣, 一色淳, 渡辺泰雄脳細胞環境因子としての細胞外マトリックスを考慮した脳保護機構、第53回日本薬理学会西南部会

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Morita N., Kusahara H., Sekine T., Endou H., Sugiyama Y.	Characterization of rat organic anion transporter 2.	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics		submitted	
Adachi Y., Suzuki, H., Sugiyama Y.	Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein	Pharmaceutical Research		submitted	
Sugiyama D., Kusahara H., Abe T., Meier P.J., Sekine T., Endou H., Suzuki H., Sugiyama Y.	Characterization of the efflux transport of 17 β -estradiol-D-17 β -glucuronide from the brain across the blood-brain barrier	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics		in press	
Kusahara H., Sugiyama Y.	Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier.	Drug Discovery Today	6	206-212	2001
Kusahara H., Sugiyama Y.	Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier.	Drug Discovery Today	6	150-156	2001
Sugiyama Y. and Kato Y.	Tissue-selective drug delivery utilizing transporters and receptors	Biomaterials and Drug Delivery toward New Millenium		383-393	2000
Taya K., Watanabe Y., Kobayashi H. and Fujiwara M.	Nimodipine improves the disruption of spatial cognition induced by cerebral ischemia.	Physiology & Behavior	70	19-25	2000
Okita M., Watanabe Y., Taya K., Utsumi H. and Hayashi T	Presynaptic L-type Ca ²⁺ channel on excessive dopamine release from rat caudate putamen .	Physiology & Behavior	68	641-649	2000
Miura I., Miyamoto K., Nakamura K., Watanabe Y.	Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis	Life Science	68	in press	2001
Hippo, Y., Yashiro, M., Ishii, M., Taniguchi, H., Tsutumi, S., Hirakawa, K., Kodama, T., Aburatani, H.	Differential gene expression profiles of scirrhou gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes.	Cancer Reser	61	889-895	2001
Tsutumi, S., Kobune, Y., Midorikawa, Y., Aburatani, H.	Classification of hepatocellular carcinoma by gene expression profiling analysis.	Genome Informatics	11	240-241	2000
Suwa M., Sato T., Okouchi I., Mikoshiba M., Akiyama Y., Asai K., Matsumoto S., Tsutum S., Aburatani H.	Gene discovery of G-protein coupled receptors from human genome	Genome Informatics	11	410-411	2000
Ge X., Yonamine S., Mi Y., Tsutumi S., Kobune Y., Aburatani H., Iwata S.	A physics-inspired algorithm for information visualization with application to gene expression analysis.	Journal of the School of Engineering	XL VII	89-103	2000
Ishii M., Hashimoto S., Tsutumi S., Wada Y., Matushima K., Kodama T., Aburatani H.	Direct comparison of genechip and SAGE on the quantitative accuracy in the transcrit profiling analysis	Genomics	68	136-143	2000
Murakami T., Mataka C., Nagao C., Umetani M., Wada Y., Ishii M., Tsutsumi S., Kohro T., Saiura A., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T.	The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor a using DNA microarray analysis	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis		in press	2000
Mataka C., Murakami T., Umetani M., Wada Y., Ishii M., Tsutsumi S., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T.	A novel zinc finger protein mRNA in human umbilical vein endothelial cell is profoundly induced by tumor necrosis factor a.	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis		in press	2000
Gouda H., Sunazuka T., Omura S., Hirono S.	Three-dimensional structure-activity relationship analysis between motilin and motilide using conformational analysis and a novel molecular superposing method.	Chemical & Pharmaceutical Bulletin	48	1835-1837	2000

Gouda H., Yamazaki K., Hasegawa J., Hirono S.	Refinement of the NMR structures of α -conotoxin MI using molecular dynamics simulation with explicit solvent water and a full molecular force field	Chemical & Pharmaceutical Bulletin	49	249-252	2001
Radwan A.A., Gouda H., Yamaotsu N., Torigoe H., Hirono S.	Rational procedure for 3D-QSAR analysis using TRNOE experiments and computational methods: application to thermolysin inhibitors	Drug Design and Discovery		in press	2001