

# 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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成14（2002）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 . . . . . 6

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 . . . . . 9

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 . . . . . 11

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 . . . . . 18

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 . . . . . 19

渡辺 泰雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷り (別刷り冊子)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

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** 血液脳関門・血液脳脊髄液関門に発現される有機アニオントランスポーターの寄与率の評価を行った。血液脳関門を介した排出輸送には Mdr1a と Mrp1 の両方が関与していた。また、脳側からの取り込み関わるトランスポーターとして、Oatp3、Oat3 が脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に局在していることを見出した。Willis 動脈輪、下行大動脈、くも膜におけるプロファイルと比較対照としたラット脳毛細結果の発現プロファイルの解析から、血液脳関門に高発現している Oatp14 を見出した。Oatp14 も同じく脳側細胞膜に局在していた。これらのトランスポーターが脳内からのアニオン系薬物の排泄に関わっているものと考えている。脈絡叢の刷子縁膜（脳脊髄液側）には、Oat3 が局在していることを見出した。Oat3 は、 $\beta$ -lactam 系抗生物質の脈絡叢の取り込みに関与している。cMOAT/Mrp2 の基質に対して、Ligand-Based Drug Design 法を用いて、その結合配座モデルを作成した。相関係数から判断して、最終的に一つのモデルが選択された。更に、ファーマコア情報と等高線図から、結合部位の物理化学的構造特徴が浮かび上がってきた。神経終末が付着した脳の単離神経を切片から摘出可能な新たな方法を駆使して、Mynert 神経系における神経終末の「脳型」の L 型の電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを見出し、生理学的機能として GABA の自発放出への関与、更には特異性を明らかにした。単一神経終末上の  $Ca^{2+}$  チャンネルの機能的役割について検討したところ、GABA 放出が促進されるためには、終末上の L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルが活性化されることが重要であることが示唆された。

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 紀夫（九州大学・大学院薬学研究科、教授）  
渡辺 泰雄（東京医科大学、助教授）

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用可能である。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漿からの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う観点から検証し、三次元構造活性相関から、脳移行性の優れた化合物を合理的に生み出す。(2) に関し

**B. 研究方法**

1) 血液脳関門に発現される有機アニオントランスポーターの解析  
脳内、脳室内投与を行い、脳内あるいは脳脊髄液からの estradiol 17 $\beta$  glucuronide (E217 $\beta$ G)の消失速度を in vivo で測定した。血液脳関門に発現される有機アニオントランスポーターを網羅的に解析するために、分担研究者の油谷の協力を得て、脳毛細血管内皮細胞の発現プロファイルの解析を行った。このとき、Willis 動脈輪、下行大動脈、くも膜におけるプロファイルと比較対照として検討した。その結果、Oatp14 が脳毛細血管内皮細胞に高発現していることを見出した。Oatp14 の遺伝子発現系を HEK293 細胞を宿主細胞として作製した。HEK293 を

用いた輸送実験は、常法に従い実験を行った。

2) 血液脳脊髄液関門に発現される有機アニオントランスポーターの解析

脈絡叢に発現する Oat3 について、免疫染色を行い、脈絡叢における局在を決定した。単離脈絡叢と遺伝子発現系をもちいた輸送実験を行った。研究で用いたモデルリガンドには、 $\beta$ -lactam系抗生物質である benzylpenicillin とペプチドトランスポーターの基質である glycyrsarcosine である。glycyrsarcosine の脳脊髄液からの排出に対しては、脳室内投与を行い、個体レベルでの検討を行った。

3) 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。

4) 単離神経標本を用いて、GABA 神経系の自発性 miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) を nystatin perforated patch recording 法で記録した。

5) ラット海馬 CA1 錐体細胞を機械的に単離し、GABA 作動性神経終末部が付着した“シナプスブートン標本”を作製する。次に膜電位固定下で1つの神経終末部を電気刺激し、単一神経終末由来の GABA 放出を記録する。神経終末静上の  $Ca^{2+}$  チャンネルサブタイプの同定は各種選択的阻害剤を用いて薬理的に評価する。

## C. 研究成果

Mdr1a ノックアウトマウス、Mrp1 ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析により、両トランスポーターが関門における E217 $\beta$ G の排出輸送に関わっていることを見出した。

ジーンチップを用いて、脳毛細血管内皮細胞、下行大動脈、Willis 輪の動脈、脳くも膜における約 25000 個のラット遺伝子あるいは EST の発現プロファイルを行い、Oatp14 を含む脳毛細血管に高発現する遺伝子を見出した。脳毛細血管内皮細胞の脳側膜に Oatp3、Oat3、Oatp14 が発現していることが確認された。Oatp14 の遺伝子発現系を作製し、基質を見出した。

Oat3 の脈絡叢での発現を RT-PCR、Western blot 法により明らかにした。免疫染

色を行った結果、Oat3 が脈絡叢刷子縁膜に局在していることを明らかにした。単離脈絡叢への benzylpenicillin の取り込みに対する阻害剤のプロファイルと遺伝子発現系を用いたプロファイルは一致した。また、速度論パラメーターも一致した。PEPT2 の典型的な基質である glycyrsarcosine を用いた輸送実験を行った。脳室内投与後、glycyrsarcosine も非常に速く消失する。glycyrsarcosine の消失は飽和性であるが、benzylpenicillin による阻害を受けない。反対に、benzylpenicillin の消失に対して glycyrsarcosine は阻害をかけないことを見出した。

cMOAT/MRP2 基質 18 化合物について、CAMDAS プログラムにより、CoMFA 解析に使用する訓練セット 16 化合物と検証セット 2 化合物のエネルギー極小配座集団を生成した。分子重ね合わせを行い、最終的に 2 個の結合配座モデルを構築した。CoMFA モデルの予測性の指標である相関係数  $q^2$  値を指標にして、配座モデルは 1 つに絞り込まれた。

L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル刺激薬である BAYK8644 は mIPSC の発火頻度を反復性に増強させた。N/P/Q-型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーは BAYK8644 による弧束核 GABA 神経系の自発性 mIPSC の発火頻度を部分的に抑制するが完全には抑制しなかった。L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーのうち nifedipine と nimodipine は著名に抑制したが、nifedipine や nilvadipine は何ら影響を与えなかった。

単一 GABA 作動性神経終末部を電気刺激することで、GABA 作動性 evoked inhibitory postsynaptic current (eIPSC) が記録できた。この eIPSC の振幅は L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカー、あるいは P/Q 型 L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーより完全に抑制された。一方で、N 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーは無効であった。

## D. 考察

血液脳関門における有機アニオン系薬物の排出に Mdr1a、Mrp1 が関与していることが示唆された。関門における発現は RT-PCR、Western blot により確認したものの、局在に関しては不明である。ノックアウトマウスを用いた解析結果に基づくと、血液側膜に局在していることが期待されるが、この点については更なる検討が必要である。Mrp1 と基質選択性が類似している cMOAT/Mrp2 について結合配座モデルが、1 つに同定できた。重ね合わせにより得られたファーマコフォア情報と CoMFA 解析から得られた等高線図の情報を基に、

cMOAT/Mrp2 のリガンド結合部位の推定を行った結果、リガンド結合部位の物理化学的構造特徴が浮かび上がってきた。今後、このモデルのバリデーションを行うべく、例えば ACE 阻害剤のように、一群の類似した化学構造を有する化合物の中に、基質となるものならないものが存在するような化合物について予測性を検討することが必要である。血液脳関門の発現プロファイル、大動脈、Willis 動脈輪、くも膜についての発現遺伝子との比較により、関門特異的に発現される Oatp14 を見出した。これらの発現遺伝子との比較によるデータマイニングの有効性を示している。血液脳関門の脳側細胞膜に、Oatp3、Oat3、Oatp14 は局在していた。基質選択性を考慮すると、脂溶性の高いアニオン系化合物の脳内からのくみ出しには Oatp3、Oatp14 が、水溶性の高いアニオン系化合物については Oat3 が主として働いているものと考えられる。脈絡叢では Oat3 が水溶性の高いアニオン系薬物の脳脊髄液から脈絡叢への取り込みに関与しているものと考えている。特に Oat3 は  $\beta$ -lactam 系抗生物質の脳脊髄液からのくみ出しに働いているトランスポーターであり、その基質になるかどうかは脳脊髄液中の滞留性を決定する。しかも、Oat3 は  $\beta$ -lactam 系抗生物質の消失臓器である腎臓の側底膜に発現しており、腎臓内への取り込みにも関与している。つまり、脳脊髄液中と血漿中の両方の滞留性を決定するトランスポーターである。cMOAT/Mrp2 の結合配座モデルを確立したのと同様の手法を Oat3 に適用することで、体内・脳内の滞留性をコントロールしたより安全で効果的な抗生物質の開発に貢献できるのではないかと考えている。

現在ラットのゲノム情報はヒト、マウスに比較して不十分であり、アレイを用いて解析されたトランスポーター遺伝子は 22 遺伝子にすぎず、これまでにヒトで同定されている遺伝子の半数にも及ばない。ラットとヒト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、ヒト、マウス、ラットの間の比較データベースを構築していくことが必要である。

脳内で神経終末に存在する L 型  $Ca^{2+}$  チャネルは GABA や DA の自発的放出に関与し、神経調節失調時には、伝達物質の異常放出を誘発させ重篤な脳疾患を誘発させる。しかも、この自発的放出に関与する L 型  $Ca^{2+}$  チャネルは、いわゆる抹消型と異なり、 $Ca^{2+}$  チャネルブロッカーの親和性に相違を有することが明らかとなった。本標本およびフ

ォーカル刺激法の開発により、わずか  $1\ \mu\text{m}$  以下の微小シナプス前神経終末部からの伝達物質の放出機構やこれに対する各種中枢性刺激薬物の薬効の解明ができるようになった。フォーカル刺激時の  $Ca^{2+}$  チャネルサブタイプの活性動態と低頻度刺激時の活性動態を総括すると、本フォーカル刺激法による GABA 放出は放出増強モデルとして有用であることが示唆された。

## E. 結論

血液脳関門を介したアニオン系薬物のくみ出しに、Oatp3、Oatp14、Oat3、Mdr1a、Mrp1 が関与していることが示唆された。Oatp3、Oatp14、Oat3 が脳内から内皮細胞へ、Mdr1a、Mrp1 が内皮細胞から血液中への排出を行っているものと考えている。血液脳脊髄液関門では、Oat3 がアニオン系薬物の脳脊髄液中から脈絡叢内への取り込み過程に関与していることが示唆された。

脳毛細血管の発現プロファイルにより、脳毛細血管内皮細胞に高発現している遺伝子群を見出した。

cMOAT/MRP2 の基質の 3 次元ファーマコフォアをかなり解明することができた。本研究成果に基づいて、種々薬物の *in silico* screening が可能になるものと考えている。

「脳型」L 型  $Ca^{2+}$  チャネルに対する親和性は、「抹消型」と異なる。低頻度刺激による GABA 放出は N、P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルであるのに対して、高頻度刺激による放出増強には L、P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルが重要である。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagata Y, Kusuvara H, Endou H, Sugiyama Y. Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus. *Mol Pharmacol in press*

Sugiyama D, Kusuvara H, Shitara Y, Abe T, Sugiyama Y. Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab Dispos* 2002 30:220-223.

Shitara Y, Sugiyama D, Kusuvara H, Kato Y, Abe T, Meier PJ, Itoh T, Sugiyama Y. Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl (slc21a1)- and Oatp2

- (Slc21a5)-mediated transport. *Pharm Res* 2002 19: 147-153.
- 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.* 2002 300:746-53.
- Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 2002 78:43-54.
- Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res.* 2002 62:233-40.
- Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H. Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene*, in press 2002
- Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR alpha activation and ROS production. *Am. J. Physiol.* 2002 282: G338-48.
- Takabe W, Kodama T, Hamakubo T, Tanaka K, Suzuki T, Aburatani H, Matsukawa N, Noguchi N. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome-type subunits in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001 276:40497-501.
- Saiura A, Mataka C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Harihara Y, Hamaubo T, Yamaguchi T, Hasegawa G, Naito M, Makuuchi M, Kodama T. A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means of DNA microarray analysis. *Transplantation.* 2001 72:320-9.
- Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: Expression profiles analysis using oligonucleotide array. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001 92: 257-68.
- Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scrierrous gastric cancer cells with highly metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res.* 2001 61: 889-95.
- Radwan AA, Gouda H, Yamaotsu N, Torigoe H, Hirono S. Rational procedure for 3D-QSAR analysis using TRNOE experiments and computational methods: application to thermolysis inhibitors. *Drug Design Discovery* 2001 17: 265-81.
- Yamaotsu N, Suga M, Hirono S. Molecular dynamics simulation of calmodulin-trifluoperazine complex in aqueous solution. *Biopolymer* 2001 58:410-21.
- Yoshii F, Nakamura T, Hirono S, Shimizu Y, Hoshi T, Ando M, Hagiwara H. Conformational analysis and selection of odor-active conformers: Synthesis of molecules designed for the lily-of-the-valley (Muguet)-type odor. *Helvetica Chiica Acta* 2001 84:2051-63.
- Akaike N, Murakami N, Katsurabayashi S, Jin YH, Imazawa T. Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron. *Neuroscience Res.* in press
- Mirua I, Miyamoto K, Nakamura K, Watanabe Y. Hydrogen peroxide induced chemokine production in the glia-rich cultured cerebellar granule cells under acidosis. *Life Sci* 2002 70: 821-31.
- Watanabe Y, Wang ZM, Rhee JS, Lawlor GF, Ishibashi H, Akaike N. Inhibitory effects of 1,4-DHP antagonists on synaptic GABA release modulated by BAY-K8644 in Mechanically dissociated rat substantia innominata. *Life Sci.* in press, 2002
- Yamada Y, Watanabe Y, Zhang J, Haraoka J, and Ito H. Changes in cortical and cerebellar bcl-2 mRNA levels in the developing hydrocephalic rat (LEW-HYR) as measured by a real time quantified RT-PCR. *Neuroscience*, in press, 2002.

## 2. 学会発表

- Kusuhara H. and Sugiyama Y. Transporter and efflux systems - liver, kidney and brain 4th International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and other Alternative Methods for Drug Delivery Research
- Kusuhara H., He Z., Nagata Y., Abe, T. and Sugiyama Y. Expression of organic anion transporting polypeptide 3 in the choroid plexus. 4th International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and other Alternative Methods for Drug Delivery Research
- 黒田美咲、楠原洋之、永田吉載、杉山雄一

脈絡叢を介した脳脊髄液からのβラクタム系抗生物質の排出輸送機構の解析 第16回日本薬物動態学会

永田吉範、楠原洋之、何仲貴、杉山大介、設楽悦久、関根孝治、鈴木洋史、遠藤仁、杉山雄一 有機アニオン化合物の脈絡叢への取り込み過程に占める有機アニオントランスポーターの寄与率の定量的評価 第16回日本薬物動態学会

楠原洋之、杉山雄一 医薬品開発における薬物トランスポーター寄与率評価の重要性：特異的阻害剤を用いたアプローチ 第16回日本薬物動態学会

李映周、楠原洋之、鈴木洋史、杉山雄一 Role of Mrp1 in the elimination of organic anions across the blood-cerebrospinal fluid barrier 第16回日本薬物動態学会

永田吉範、楠原洋之、杉山雄一 シメチジンの脈絡叢取り込み過程に関するトランスポーターの寄与率の算出 第17回日本薬剤学会年会

加納、堤、西村、油谷、広田、広瀬 遺伝子発現量情報に基づくクラスターの比較とその可視化法に関する研究 情報計算化学生物学会2001年大会

Katsura, Tsusumi, Aburatani, Iwata Selective relevant genes from microarray data with multiple classes. Joint Cold Spring Harbor laboratory/ Welcome Trust Conference 'GENOME INFORMATICS'

西村、加納、堤、油谷、広田、広瀬 没入型多面ディスプレイを利用した時系列遺伝子発現量解析と可視化に関する研究 第6回VR学会

加納、堤、西村、油谷、広田、広瀬 比較マップによる遺伝子クラスター群の可視化 第6回VR学会

加納、堤、緑川、広瀬、油谷 Visualization for comparison between gene clusters generated from different sources. 2nd Cold Spring Harbor Meeting on Computational Biology.

川原、王、武笠、古屋、前田、豊田、浜窪、油谷、児玉、桐野 Sequential gene expression analysis in delayed neuronal death and induced ischemic tolerance following global cerebral ischemia in rats. 第13回日本脳循環代謝学会総会

油谷 ゲノム情報とトランスクリプトーム情報の統合 第24回日本分子生物学会

今井利恵、広野修一 立体配座解析および分子重ね合わせ法によるトランスポーター"MOAT/MRP2"に対するリガンド化合物の共通三次元構造特徴の抽出 第29回構造活性相関シンポジウム

Hirono S, Nakagome I. Three-dimensional structure activity relationships of drugs that induce a cardiovascular side effect: the prolongation in the QT interval. World Chemistry Congress.

赤池 第75回日本薬理学会年会

赤池 第79回日本生理学会年会

#### H.知的財産権の出願・登録状況

なし

## 厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

### 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・血液脳脊髄液関門に発現される有機アニオントランスポーターの寄与率の評価を行った。脳内投与後の E217βG の排出に、一部排出ポンプである Mdr1a、Mrp1 が関与していることを見出した。また、ジーンチップを用いた網羅的な解析により、Oatp14 が脳毛細血管内皮細胞に高発現していることを見出した。免疫染色により、脳毛細血管内皮細胞の脳側の細胞膜に Oatp14 が局在していることを見出した。更に Oatp3、Oat3 の脳毛細血管内皮細胞への局在も同じく、脳側の細胞膜であることを見出した。脈絡叢では Oat3 は、脈絡上皮細胞の刷子縁膜に局在していた。単離脈絡叢を用いた輸送実験を行った。benzylpenicillin が Oat3 により脈絡叢内へ取り込まれることを明らかにした。glycylsarcosine との相互阻害実験から、benzylpenicillin の脈絡叢内への取り込みが PEPT2 によるものではないことを明らかにした。

#### A.研究目的

血液脳関門・血液脳脊髄液関門は、血液中から脳内へ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モデルでは、薬物の脳内濃度が著しく上昇することが報告されている。一方、アニオン性薬物についても、脳内・脳脊髄液内からの排出にトランスポーターが関与していることが示されているものの、その分子の実体は明らかにされていない。薬物、とく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。本研究は、関門におけるアニオン性薬物の輸送機構を明らかにすることを目的として、遺伝子欠損動物あるいはトランスポーターに選択的な阻害剤を用いた既知トランスポーターの個体レベルでの寄与率の評価、またジーンチップを用いた網羅的な解析による新規トランスポーターの探索を行った。

#### B.研究方法

1) 血液脳関門・血液脳脊髄液関門に発現される Mrp1 の関与

血液脳関門を介して排出される estradiol 17β glucuronide (E217βG) をモデル薬物として用いた。Mrp1 ノックアウトマウスを用いて、脳内投与後あるいは脳室内投与後の脳内・脳脊髄液内濃度の時間推移を測定した。Mdr1a ノックアウトマウスを用いて、静脈

内投与後、脳内投与後の E217βG の濃度推移を測定した。

2) 血液脳関門に発現される有機アニオントランスポーターの解析

血液脳関門に発現される有機アニオントランスポーターを網羅的に解析するために、分担研究者の油谷の協力を得て、脳毛細血管内皮細胞の発現プロファイルの解析を行った。この研究で見出された Oatp14 の遺伝子発現系を HEK293 細胞を宿主細胞として作製した。HEK293 を用いた輸送実験は、常法に従い実験を行った。

3) 血液脳脊髄液関門に発現される有機アニオントランスポーターの解析

脈絡叢に発現する Oat3 について、免疫染色を行い、脈絡叢における局在を決定した。単離脈絡叢と遺伝子発現系をもちいた輸送実験を行った。研究で用いたモデルリガンドには、β-lactam 系抗生物質である benzylpenicillin、ペプチドトランスポーターの基質である glycylsarcosine である。glycylsarcosine の脳脊髄液からの排出に対しては、脳室内投与を行い、個体レベルでの検討を行った。

#### C.研究結果

1. 血液脳関門における薬物輸送

1) 静脈内投与後、E217βG の脳内濃度は Mdr1a ノックアウトマウスでは、Wild-type の 1.5 倍に増加したが、Mrp1 ノックアウトマウスでは差が見られなかった。反対に脳内に投与した場合、Mdr1 ノックアウトマウスでは Wild-type と差が見られなかった



ものの、Mrp1 ノックアウトマウスでは脳内からの消失が約50%に減少した。

2) 血液脳関門に有機アニオントランスポーターOatp3、Oat3、Oatp14が発現していることが確認された。免疫染色を行ったところいずれの有機アニオントランスポーターも、脳毛細血管内皮細胞の脳側膜に発現していることが確認された。Oatp14については、まだ基質が同定されていなかったことから、遺伝子発現系を作製し、輸送実験を行った。OATP familyの典型的な基質となるE217βGの細胞内への取り込みが顕著に増加していた。

2. 血液脳脊髄液関門における薬物輸送  
単離脈絡叢を用いて、脳脊髄液中から脈絡叢内への取り込み過程に関わる有機アニオントランスポーターについて解析を行った。

1) benzylpenicillinの取り込み過程  
benzylpenicillinの単離脈絡叢への取り込み過程は、先に検討したOatpとは異なるといわれていた。1999年に我々が報告したOat3の発現をRT-PCR、Western blot法により明らかにした。免疫染色を行った結果、Oat3が脈絡叢刷子縁膜に局在していることを明らかにした。単離脈絡叢へのbenzylpenicillinの取り込みに対する阻害剤のプロファイルと遺伝子発現系を用いたプロファイルは一致した。また、速度論パラメーターも一致した。

2) glycyrsarcosineの取り込み過程  
脳脊髄液中からはペプチドも排出される。最近、PEPT2と呼ばれるdi-, tri-peptideを基質とするトランスポーターの発現が示された。PEPT2はβ-lactam系抗生物質を基質とすることから、先のOat3との関係に興味を持たれる。そこで、PEPT2の典型的な基質であるglycyrsarcosineを用いた輸送実験を行った。脳室内投与後、glycyrsarcosineも非常に速く消失する。glycyrsarcosineの消失は飽和性であるが、benzylpenicillinによる阻害を受けない。反対に、benzylpenicillinの消失に対してglycyrsarcosineは阻害をかけないことを見出した。

#### D. 考察

血液脳関門における有機アニオン系薬物の排出にMdr1a, Mrp1が一部関与していることが示唆された。関門における発現はRT-PCR、Western blotにより確認したものの、局在に関しては不明である。ノックアウトマウスを用いた解析結果に基づく、血液側膜に局在していることが期待されるが、この点については更なる検討が必要である。一方、脳側における脳内から内皮細胞中へ

の取り込み過程であるが、Oatp3、Oat3、Oatp14が候補トランスポーターである。Oat3とOatp3、Oatp14とは阻害剤の選択性などが異なり、寄与率の評価が可能である。昨年度の研究により、E217βGの脳内からの排出に対する有機アニオントランスポーターの寄与率の評価を行っている。その結果によると、unknownなトランスポーターの寄与率が全体の40%程度あり、これがOatp3、Oatp14により説明されるものと考えている。阻害剤の選択性を更につめ、両者の寄与率を評価できる系を確立し、関門輸送で重要なトランスポーターを明らかにしていくことが必要である。

脈絡叢においても、Oat3が機能していることが示された。水溶性の高いアニオン性薬物はOat3が脈絡叢への取り込みに関わっている。PEPT2の寄与はほとんど見られなかった。β-lactam系抗生物質の場合、Oat3の関与が大きい。抗生物質を髄膜炎治療に用いる場合には、脳脊髄液からの排出速度が、脳室内濃度を決定する主要因となる。別の研究で、Oat3が腎側底膜に局在していることも見出している。つまり、Oat3の基質となるということは、脳脊髄液、血漿中両方からの排出が速くなるということであり、薬効にとってデメリットである。

#### E. 結論

脳内からの脂溶性の高いアニオン性薬物の排出には、Mdr1a, Mrp1, Oatp3, Oatp14が、水溶性のアニオン系薬物の排出にはOat3が関与している。脳脊髄液中からの水溶性アニオン性薬物の排出にはOat3が関与している。特に、β-lactam系抗生物質の場合、Oat3に認識されることは、脳脊髄液中の滞留性、血漿中の滞留性を下げる要因となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagata Y, Kusuvara H, Endou H, Sugiyama Y. Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus. *Mol Pharmacol in press*  
Sugiyama D, Kusuvara H, Shitara Y, Abe T, Sugiyama Y. Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab*

Dispos 2002 30:220-223.

Shitara Y, Sugiyama D, Kusuhara H, Kato Y, Abe T, Meier PJ, Itoh T, Sugiyama Y. Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl (slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport. *Pharm Res* 2002 19: 147-153.

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.* 2002 300:746-53.

Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 2002 78:43-54.

## 2. 学会発表

Kusuhara H. and Sugiyama Y. Transporter and efflux systems - liver, kidney and brain 4th International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and other Alternative Methods for Drug Delivery Research

Kusuhara H., He Z., Nagata Y., Abe, T. and Sugiyama Y. Expression of organic anion transporting polypeptide 3 in the choroid plexus. 4th International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and other Alternative Methods for Drug Delivery Research

黒田美咲、楠原洋之、永田吉載、杉山雄一 脈絡叢を介した脳脊髄液からのβラクタム系抗生物質の排出輸送機構の解析 第16回日本薬物動態学会

永田吉載、楠原洋之、何仲貴、杉山大介、設楽悦久、関根孝治、鈴木洋史、遠藤仁、杉山雄一 有機アニオン化合物の脈絡叢への取り込み過程に占める有機アニオントランスポーターの寄与率の定量的評価 第16回日本薬物動態学会

楠原洋之、杉山雄一 医薬品開発における薬物トランスポーター寄与率評価の重要性：特異的阻害剤を用いたアプローチ 第16回日本薬物動態学会

李映周、楠原洋之、鈴木洋史、杉山雄一 Role of Mrp1 in the elimination of organic anions across the blood-cerebrospinal fluid barrier 第16回日本薬物動態学会

永田吉載、楠原洋之、杉山雄一 シメチジンの脈絡叢取り込み過程に関するトランスポーターの寄与率の算出 第17回日本薬剤学会年会

## 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おり、広範な基質特異性をもっている。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、当研究室で開発されたLigand-Based Drug Design手法（高温分子動力学法を利用した自動配座解析プログラムCAMDAS）&官能基特性に基づく異種分子の重ね合わせ手法SUPERPOSE))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）を推定した。さらに三次元定量的構造活性相関（3D-QSAR）の一手法であるCoMFA（比較分子場解析）を行い、cMOATに対するリガンド化合物の三次元構造特徴を明らかにするとともに、cMOATのリガンド結合部位モデルを検討した。

**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、CoMFA解析に使用する訓練セット16化合物と検証セット2化合物のエネルギー極小配座集団を生成した。続いて、訓練セットのうち、結合親和性が高い上位9化合物に関して、SUPERPOSEプログラムを用いて分子重ね合わせを行い、結合配座候補を2配座に絞り込んだ。この2配座に対して残りの化合物を重ね合わせ、各化合物について次のCoMFA解析に用いる結合配座候補を選択し、2個の結合配座モデルを構築した。さらに、この2個の結合配座モデルに関して活性との相関を調べ、最終的な結合配座を決定するために、CoMFAを行った。訓練セットでのCoMFAモデルの予測性の指標である相関係数 $q^2$ に注目すると、全体的に結合配座候補2の方が $q^2$ 値が高かった。また、この2個のCoMFAモデルを用いて検証セットによる予測性の検証を行った結果、検証セットでのCoMFAモデルの予測性の指標であるpredictive  $r^2$  値が高かったのは、訓練セットと同様、結合配座候補2のモデルであり、このモデルでは標準誤差も全体的に小さかった。

## D. 考察

本研究では、結合配座候補2のlogPを考慮したタイプが $q^2$ 値、predictive  $r^2$ 値ともに最良の値を示したことから、このモデルをcMOATの結合配座モデルとして提案する。

さらに、重ね合わせにより得られたファーマコフォア情報（活性発現に必要な官能基の空間配置情報）とCoMFA解析から得られた等高線図（立体相互作用と静電相互作用）の情報を基に、cMOATのリガンド結合部位の推定を行った結果、リガンド結合部位の物理化学的構造特徴が浮かび上がってきた。

## 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（結合に必要な官能基の空間的配置）をかなり解明することができた。本研究で得られた情報は、薬物動態的に有利な薬を創出するうえで重要であり、得られた結合配座モデルとcMOATのリガンド結合部位の情報を用いて、種々の化合物の*in Silico* スクリーニングが可能になると考えられる。さらに、本手法は血液脳関門・血液脳脊髄液関門に存在するトランスポーターの研究にもすぐに応用可能であり、この分野での研究成果が期待できる。

## 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無い。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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*, 17(3), 265-281 (2001)  
Noriyuki Yamaotsu, Masaki Suga and Shuichi Hirono  
Molecular Dynamics Simulation of Calmodulin-Trifluoperazine Complex in Aqueous Solution  
*Biopolymer*, 58(4), 410-421 (2001)  
Fumiko Yoshii, Tomoko Nakamura, Shuichi Hirono, Yumiko Shimizu, Takashi Hoshi, Masayoshi Ando, and Hisahiro Hagiwara  
Conformational Analysis and Selection of Odor-Active Conformers: Synthesis of Molecules Designed for the Lily-of-the-Valley (Muguet)-Type Odor  
*Helvetica Chimica Acta*, 84, 2051-2063 (2001)

### 2. 学会発表

- 「立体配座解析および分子重ね合わせ法によるトランスポーター“cMOAT/MRP2”に対するリガンド化合物の共通三次元構造特徴の抽出」  
（北里大・薬）○今井梨恵、広野修一  
第29回構造活性相関シンポジウム、徳島（2001年11月）  
S.Hirono, I. Nakagome  
"THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS OF DRUGS THAT INDUCE A CARDIOVASCULAR SIDE EFFECT; THE PROLONGATION IN THE QT INTERVAL"  
World Chemistry Congress, Brisbane, AUSTRALIA, 1-6 July, 2001

## 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、データベースを構築した。ラット脳毛細血管を始めとする発現プロファイル解析から血管脳関門に特異的に発現するトランスポーター遺伝子が同定された。脳虚血モデルにおいての変動についても解析したが、有意な変動を示すものは認められていない。薬物動態関連遺伝子についてのオリゴヌクレオチドマイクロアレイの作成に着手した。今後のラットの遺伝子情報の拡充と共に、脳脊髄液関門に発現する輸送担体遺伝子についても同定を進めていく予定である。

#### 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) および脳脊髄液関門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。脳実質内の毛細血管においては内皮細胞間の tight junction が発達し、fenestration を欠如しており、BBB 機能に重要な役割を果たしている。脳毛細血管に選択的に発現するトランスポーター遺伝子を同定することにより、血液脳関門を介する薬物輸送機構を解明する。

行大動脈、くも膜におけるプロファイルと比較対照として検討した。

組織の採取は Wister Rat 12 週齢雄 10 匹を用いて下記の手技により進めた。

- 1) ネブタール 0.4ml を腹腔内注射後、断頭した。
- 2) Willis 輪・くも膜；キレート剤入り PBS 内に脳組織を浸し、断頭後 15 分以内で実体顕微鏡下くも膜・Willis 輪を別々に採取した。
- 3) 大動脈；下行大動脈起始部より 1cm の部分を採取し、キレート剤入り PBS 内にて周囲結合組織を剥離。断頭後、10 分以内に完了した。

血管採取後、直ちに破碎装置破碎槽内にて液体窒素により凍結し、10 匹分の検体を蓄積後、凍結プレス破碎装置 (Cryopress, マイクロテック・ニチオン社製) を用いてエアハンマーにて粉碎した粉末状検体に ISOGEN (ニッポンジーン) を加え定法によりトータル RNA を調製した。

トータル RNA 10  $\mu$ g を用いて Biotin 標識

#### B.研究方法

##### 1. ラット脳毛細血管内皮細胞における遺伝子発現プロファイルの解析

ラット脳毛細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した。Willis 動脈輪、下

cRNAを作成し、ラットU34アレイA,B,Cを用いて総計25,000の遺伝子あるいはEST(Expressed Sequence Tag)に関する発現プロファイルを解析した。

## 2. 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海馬における遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。予め短時間の虚血を行い、虚血耐性を作ることにより遺伝子発現に変動が見られるかについても検討を試みた。モデルの作製には東京大学脳神経外科学教室川原信隆講師から研究協力を頂いた。

雄性 Wistar ラットを用いて4低血圧併用血管閉塞モデル変法により2分ないし6分の一過性脳虚血を作成した(1回虚血群)。2回虚血群では、6分虚血3日前に2分虚血ないし sham 手術を行った。7日後に HE 染色にて海馬 CA1 領域の残存生存神経細胞数を計測した。1回虚血群、2回虚血群ともに、虚血後5分から48時間まで *in situ* freezing 法にて脳を凍結し、海馬 CA1 領域を microdissection した。各群6-10匹のラットより RNA を抽出し、GeneChip (Affymetrix) ラット U34A アレイを用いておよそ8000個のラット遺伝子発現プロファイルを解析した。

(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

凍結プレス破碎装置の利用により良質な RNA が得られた(図1)。また、脳毛細血管については脳組織からの良質な RNA の調製が困難であったが、血管単離操作の熟練により改善された。

GeneChip (Affymetrix社)を用いて脳毛細血管、下行大動脈、Willis輪の動脈、脳くも膜における約25,000個のラット遺伝子あるいはESTの発現プロファイル解析を行い、脳毛細血管に特異的な遺伝子の単離を行った(図2)。ラットU34アレイにより少なくとも22種類のABCトランスポーター遺伝子が解析される(表)。毛細血管あるいはWillis輪に特異的に発現を示す遺伝子を解析中であり、脳毛細血管に高発現する遺伝子が認められている(図3)(楠原、未発表データ)。

### 2. 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。1回虚血時にはトランスポーター遺伝子の発現変動は明らかに認められなかった。

## 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輸送タンパク遺伝子の同定を試みた。杉山研究室との共同によりラットの脳毛細血管における発現プロファイル解析を行い、BBBへの発現が特異的なトランスポーター遺伝子が特定された(楠原ら、未発表データ)。大動脈、Willis動脈輪、くも膜についての発現遺伝子との比較によるデータマイニングが有力であることが示されたわけであり、データ解析をさらに継続する必要がある。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、脳脊髄液関門の解明などには必要となる可能性があり、次年度のプロファイル解析へも応用してゆく。

現在ラットのゲノム情報はヒト、マウスに比較して不十分であり、アレイを用いて解析されたトランスポーター遺伝子は22遺伝子に過ぎず、これまでにヒトで同定されている遺伝子の半数にも及ばない。ゲノム情報の充実と共に今回解析した25,000のラット遺伝子あるいはESTの中から新たなトランスポーター

遺伝子が同定されることが期待される。一方、より網羅的なアレイの開発が望まれ、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。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。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、ヒト、マウス、ラットの間での比較データベースも構築していく予定である。

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さらに進めてゆきたい。1回虚血の条件下では発現が大きく変動するトランスポーター遺伝子は認められなかったが、虚血耐性が出現する2回虚血実験でのデータ解析の結果が待ち望まれる。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ことが必要である。

今後、種々の病態や薬剤投与時のトランスポーター遺伝子の変動をモニタリングするためには、専用のアレイシステムの開発が必要であろうと考えられる。

## 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、データベースの作製に着手した。

今後、今回確立したラットを用いた脳虚血モデルの *in vivo* 実験系をはじめとして、種々の病態あるいは薬剤投与時の輸送担体遺伝子の発現変動について検討する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

## 1. 論文発表

Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Research* 62(1): 233-240, 2002

Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H.: Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene*, in press 2002

Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 282(2):G338-48. 2002

Takabe W, Kodama T, Hamakubo T, Tanaka K, Suzuki T, Aburatani H, Matsukawa N, Noguchi N. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome  $\alpha$ -type subunits in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(44):40497-501, 2001

Saiura A, Mataka C, Murakami T, Umetani M, Wada Y, Kohro T, Aburatani H, Harihara Y, Hamakubo T, Yamaguchi T, Hasegawa G, Naito M, Makuuchi M, Kodama T. A comparison of gene expression in murine cardiac allografts and isografts by means dna microarray analysis1. *Transplantation*. 72(2):320-9. 2001

Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of Transcriptional Regulation by Transforming Growth Factor- $\beta$ : Expression Profile Analysis Using Oligonucleotide Arrays. *Jpn J Cancer Res.* 92(3): 257-268. 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

## 2. 学会発表

情報計算化学生物学会 2001 年大会 (7/25-27、駒場) 遺伝子発現量情報に基づくクラスタの比較とその可視化手法に関する研究

加納、堤、西村、油谷、広田、廣瀬

Joint Cold Spring Harbor laboratory/ Welcome Trust Conference 'GENOME INFORMATICS'  
(8/8-12, Hinxton, UK) Selecting relevant genes from microarray data with multiple classes.

葛、堤、油谷、岩田

第6回 VR学会 (9/19-21)

没入型多面ディスプレイを利用した時系列遺伝子発現量解析と可視化に関する研究

西村、加納、堤、油谷、広田、廣瀬

比較マップによる遺伝子クラスター群の可視化

加納、堤、西村、油谷、広田、廣瀬

2<sup>nd</sup> Cold Spring Harbor Meeting on Computational Biology (9/28-30, CSH)

Visualization for comparison between gene clustered generated from different sources

加納、堤、緑川、廣瀬、油谷

第13回日本脳循環代謝学会総会 (10/18-19、新横浜)

Sequential gene expression analysis in delayed neuronal death and induced ischemic tolerance following global cerebral ischemia in rats

川原、王、武笠、古屋、前田、豊田、浜窪、油谷、児玉、桐野

第24回日本分子生物学会 (12/7-11、横浜)

ワークショップ「ポストシーケンス時代の染色体分子生物学におけるデータマイニング」  
ゲノム情報とトランスクリプトーム情報の統合 油谷

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図1 各部位の血管から調製したRNA

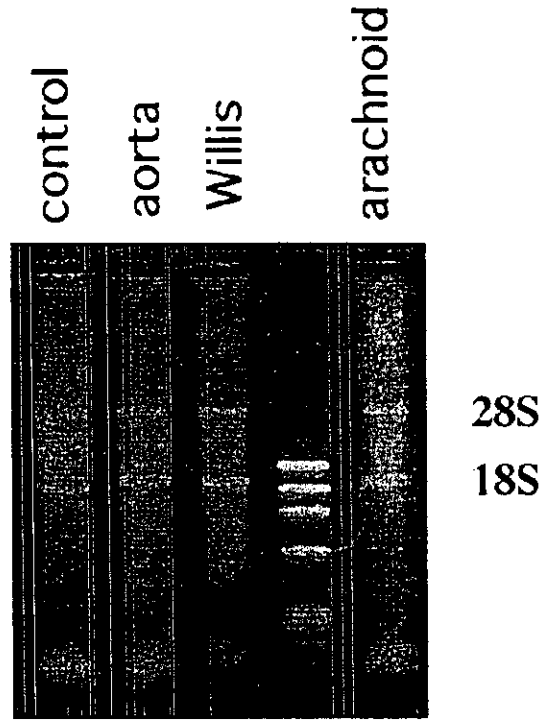


図2 検体間の発現の変動  
average difference 値についてスキャタープロットで表示した。

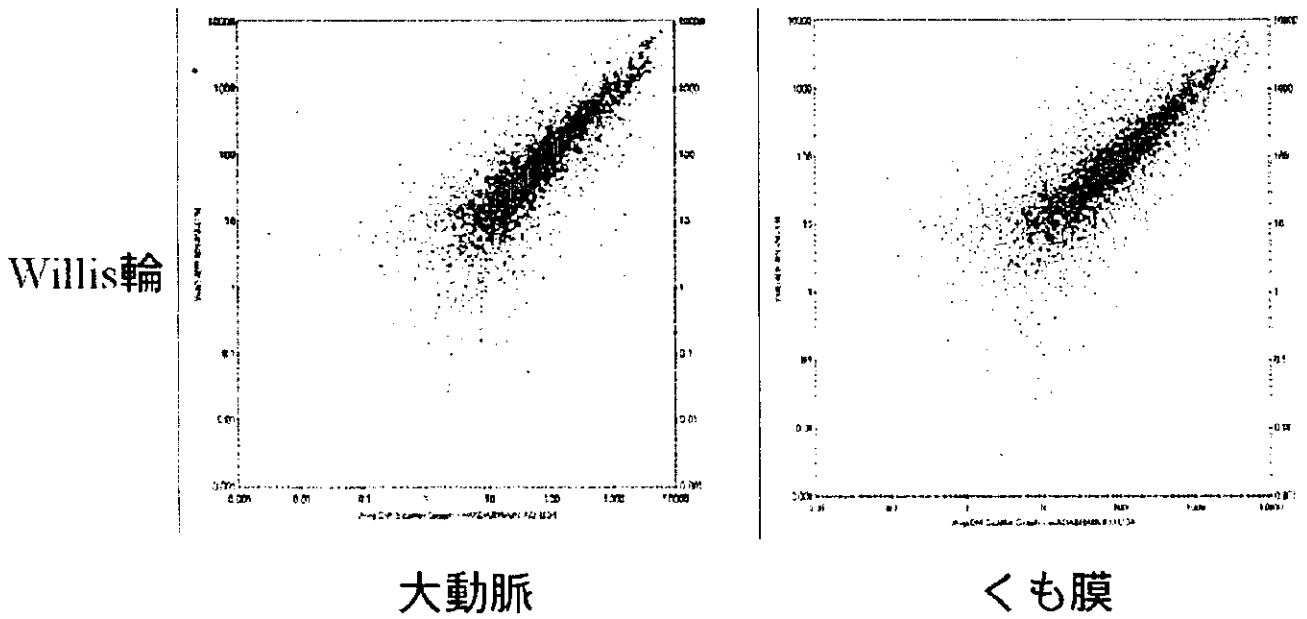


図3 トランスポーター遺伝子の血管部位別発現

	ao/a	willis	kumo	SD
AF087339mRNA#1 s at : 0				
AF087339mRNA#2 f at : 0				
AF106563 s at : 0				
D17469 at : 0				
D83598 at : 0				
L15079mRNA s at : 0				
L40624 at : 0				
M34842 at : 0				
M64986 at : 0				
M81855 at : 0				
rc AA891738 at : 0				
rc AA893905 at : 0				
rc AA893905 g at : 0				
rc AA899253 at : 0				
rc A1639190 at : 0				
S66618 at : 0				
S79939 at : 0				
U15138 at : 0				
X63854 at : 0				
X66369 at : 0				
rc AA850048 at : 0				
rc AA850733 at : 0				
rc AA925872 at : 0				
rc AA943576 at : 0				
rc AA944183 at : 0				
rc AA944264 at : 0				
rc AA944451 at : 0				
rc AA944536 at : 0				
rc AA946071 at : 0				
rc AA955948 at : 0				
rc AA957083 at : 0				
rc AA997184 at : 0				
rc AA997710 at : 0				
rc AA998140 at : 0				
rc A1009946 at : 0				
rc A1011116 at : 0				
rc A1030392 at : 0				
rc A1030445 at : 0				
rc A1030799 at : 0				
rc A1045221 at : 0				
rc A1059440 at : 0				
rc A1059498 at : 0				
rc A1070117 at : 0				
rc A1070137 at : 0				
AA848626 at : 0				
rc AA817860 at : 0				
rc AA818139 at : 0				
rc A1070411 at : 0				
rc A1071999 at : 0				
rc A1103100 at : 0				
rc A1169105 at : 0				
rc A1170715 at : 0				
rc A1171879 at : 0				
rc A1175040 at : 0				
rc A1177120 f at : 0				
rc A117368 at : 0				
rc A1179131 at : 0				
rc A1229416 at : 0				
rc A1230013 at : 0				
rc A1232999 at : 0				
rc A1234835 at : 0				
rc A1235192 at : 0				

表 GeneChip により解析される ABC トランスポーター遺伝子

Probe Set	Chip	Gene Symbol	Map Location	Fn.
rc_A1175063_at	RG-U34C	ABCA1		Fn.55270
rc_A1171534_at	RG-U34C			Fn.55270
rc_AA964962_at	RG-U34B			Fn.6579
rc_AA998560_at	RG-U34B	Abca2		
rc_A1045221_at	RG-U34B	ABCB1/ Pgy1	4q12	Fn.54380
X57523_at	RG-U34A	ABCB2/ Tap1	20	Fn.10763
X57523_g_at	RG-U34A	ABCB2/ Tap1	20	
X63854_at	RG-U34A	ABCB3/ Tap2	20	Fn.10372
L15079mRNA_s_at	RG-U34A	ABCB4/ Pgy3	4q11-q12	Fn.9679
AF106563_s_at	RG-U34A	ABCB6		Fn.54408
AF010597_s_at	RG-U34A	Abcb11		Fn.14539
X96394_at	RG-U34A	LOC64052		Fn.10495
D86086_s_at	RG-U34A	ABCC2/ Cmoat		
AB010467_s_at	RG-U34A	ABCC3		Fn.29977
rc_A1234360_at	RG-U34C	ABCC5/ mrp5		Fn.19957
L40624_at	RG-U34A	Sur		Fn.11187
rc_AA799786_s_at	RG-U34A	Sur		Fn.11187
AF019628_at	RG-U34A	Sur2		
AF087338_s_at	RG-U34A	Sur2		
D83598_at	RG-U34A	Sur2		Fn.10528
rc_A1070167_at	RG-U34B	Abcd2		
D90038_at	RG-U34A	Abcd3	2	
rc_AA946532_at	RG-U34A	Abcd3	2	
rc_AA944558_at	RG-U34B	Abcf1		
rc_A1013494_at	RG-U34B	Abcf1		
rc_A1235192_at	RG-U34C	ABCF2		Fn.25523
rc_AA944183_at	RG-U34B	Abcg1		
rc_A1179131_at	RG-U34C	Abcg1		Fn.8398
rc_A1009456_at	RG-U34B			Fn.22789
rc_A1169668_at	RG-U34C			Fn.9387
rc_A1234835_at	RG-U34C	abca7?		Fn.25281
rc_A1235339_at	RG-U34C			Fn.25318

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 紀夫 九州大学大学院医学研究院 教授

**研究要旨** 神経細胞には多数の神経終末が投射している。今回、その中の一つの神経終末からの GABA 放出のみを記録できる新規 *in vitro* モデル（フォーカル刺激法）を開発し、単一神経終末上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの機能的役割について検討した。その結果 GABA 放出が促進されるためには、終末上の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが活性化されることが重要であることを示唆した。

**A.研究目的**

多数ある神経終末部の1つを選択的に電気刺激する“フォーカル(焦点)刺激法”を開発し、単一神経終末レベルの L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルサブタイプを同定する。

**B.研究方法**

ラット海馬 CA1 錐体細胞を機械的に単離し、GABA 作動性神経終末部が付着した“シナプスブートン標本”を作製する。次に膜電位固定下で1つの神経終末部を電気刺激し、単一神経終末由来の GABA 放出を記録する。神経終末上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルサブタイプの同定は各種選択的阻害剤を用いて薬理学的に評価する。

**C.研究結果**

単一 GABA 作動性神経終末部を電気刺激することによって、GABA 作動性 evoked inhibitory postsynaptic current (eIPSC)が記録できた。この eIPSC の振幅 (amplitude) は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカー（ニルバジピン）、あるいは P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカー ( $\omega$ -AgTxGIVA)により完全に阻害された。一方で、N 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカー ( $\omega$ -CgTxGIVA)は無効であった。

**D.考察**

本標本およびフォーカル刺激法の開発により、わずか  $1\ \mu\text{m}$ 以下の微小シナプス全神経終末部からの伝達物質の放出機構（細胞内情報伝達系も含む）やこれに対する各種

中枢性薬物の薬効が解明できるようになった。

フォーカル刺激時の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルサブタイプの活性動態と低頻度刺激時の活性動態と低頻度刺激時の活性動態を総括すると、本フォーカル刺激法による GABA 放出は放出増強モデルとして有用であることが示唆された。

**E.結論**

低頻度刺激による GABA 放出は N, P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性に依存するが、高頻度刺激による放出増強には、L, P/Q 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性が重要であると結論した。

**F.健康危険情報**

なし

**G.研究発表**

1. 論文発表

Akaike N, Murakami N, Katsurabayashi S, Jin YH, Imazawa T. Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron. *Neuroscience Res. in press*

2. 学会発表

第75回日本薬理学会年會

第79回日本生理学会年會

**H.知的財産権の出願・登録状況**

なし