

20020918

厚生科学研究研究費補助金
こころの健康科学研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 杉山 雄一

平成15(2003)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 杉山 雄一	1
--	---

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 杉山 雄一	6
2. 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と相互作用する 薬物の立体配座解析と3次元構造特徴の抽出 広野 修一	8
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 油谷 浩幸	10
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 赤池 紀生	17
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 渡辺 泰雄	19

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

研究要旨 血液脳関門・血液脳脊髄液関門に存在する有機アニオントランスポーターとして、Oatp14, Oat3, Oatp3の機能解析を行った。Oatp14は有機アニオンに加えて甲状腺ホルモンを輸送することが明らかとなった。生理的にも、血液脳関門を介した甲状腺ホルモンの輸送に働いているものと推察される。一方、*in vivo/in vitro*の解析により、Oat3は血液脳関門を介した脳内からの水溶性有機アニオンの排出に、Oatp3は脈絡叢を介した脂溶性有機アニオンの排出に関与していることをそれぞれ明らかにした。Oat3の基質結合部位モデルについて、リガンド薬物の重ね合わせを行った結果、立体場+静電場+logPを考慮したモデルにより一義的に説明できることが明らかになった。脳に高発現しているABCトランスポーターとして、ヒトの40組織別の遺伝子発現プロファイルからABCトランスポーターにおいては、ABCA2、ABCC8を見出した。同様にラットについても、Abca2は脳内組織にほぼ限定された発現を示すことが分かった。虚血時における反応として、塩基性アミノ酸トランスポーターであるSLC7a1の発現が増加することを見出した。シナプスブートン標本ならびにフォーカル刺激により、単一シナプスでの解析を行ったところ、神経障害時にはGABAやグリシンでニューロンの脱分極、いわゆる興奮が発生することが明らかとなった。Thyrotropin-releasing hormone (TRH) の新規化合物であるtaltirelinの投与により、虚血による神経細胞死を抑制できること、あるいは免疫抑制薬であるサイクロスポリンにより脳梗塞巣を減少させることが明らかとなった。

広野修一（北里大学・薬学部、教授）

赤池紀生（九州大学・大学院医学系研究科、教授）

油谷浩幸（東京大学国際・産学共同研究センター教授）

渡辺泰雄（東京医科大学、助教授）

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。

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有機アニオントランスポーターの遺伝子発現系を作成し、輸送活性・阻害剤の特性を評価した。
- 2) ラット脳内に薬物を投与し、血液脳関門を介した脳内からの薬物排泄速度を測定した。更に、阻害剤を同時投与し、その効果を検討した。
- 3) ラット脳室から脈絡叢を単離し、バッファー中でインキュベーションし、刷子縁膜を介した輸送活性を評価した。
- 4) OAT3に対する8個のリガンド化合物に対して、立体配座集団を生成した後、各リガンドの構造的な特性を官能基で表現した。特性球同士の重なりが最良の重ね合わせを出力した。得られた3次元ファーマコフォアとCoMPAから得られた等高線図(立体相互作用、静電相互作用)の情報からOAT3のリガンド結合部位の推定を行った。
- 5) 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。虚血耐性を作ることにより遺伝子発現の変動を解析するために、4低血圧併用血管閉塞モデル変法により脳虚血モデルを作成した。
- 6) 心臓の運動を遠心性に抑制・制御する延髄迷走神経運動核ニューロンを色素DiIによって逆行性

に生体染色して同定後、本ニューロンを生体外へ単離摘出して、そのニューロンの生理学的膜特性の同定を行った。なおin vivo条件下、ニューロン軸索切断の数日後、障害ニューロンとコントロールの正常ニューロンを生体外に摘出して、これら両ニューロン群間で、障害の有無によりどのようにその細胞膜特性が変化するかを電気生理学的に調べた。

7) 小脳顆粒細胞の初代培養細胞を神経細胞が豊富な群、神経細胞とグリア細胞が共存した群、グリア細胞が豊富な群の三群とした。細胞死はカルセイン法で解析をおこなった。

8) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) の新規化合物であるtaltirelin、あるいは免疫抑制薬であるサイクロスポリン (CsA) をC57BL/6Jマウスの両側頸動脈を10分間結紮した後、再灌流し、直後あるいは5分後に静脈内投与した。

9) mdrl型P糖タンパク輸送系欠損マウスでMCAOモデルを作成し、検索をおこなった。すなわち、MCAOモデルは中大脳動脈に6-0シリコン製のフィラメントを30分間埋め込み、脳血流の完全な遮断を行なった。

C. 研究成果

1) Oatp14の遺伝子発現系を用いた輸送実験を行ったところ、過去Oatp familyの基質となる有機アニオンも基質とすることが明らかになった。更に、甲状腺ホルモンのうちthyroxine (T4) と不活性化代謝物であるreverse T3を非常によい基質とすることが明らかになった。ヒトOATP-Fでは、特にT4に対する特性が高いことが明らかになった。また、甲状腺切除によりoatp14の脳毛細血管での発現量は増加し、T3投与により低下した。

2) 免疫染色の結果、Oat3は脳毛細血管の脳側の細胞膜に局在していることが明らかになった。Oat3の基質となるp-アミノ馬尿酸(PAH)とbenzylpenicillin (PCG)の両薬物の消失を測定した。相互阻害実験を行うと、両化合物のKm値とKi値は、ほぼ一致した。

3) 過去、Oatp1と思われてきたが、PCR産物をアイソフォーム特異的な制限酵素で確認したところ、脈絡叢に発現しているmajorなアイソフォームはOatp3であることが明らかになった。Oatp familyの基質となるestradiol 17 β glucuronideとtaurocholateの脈絡叢への取り込みは、競合阻害を示した。また、Oatp3の阻害剤では阻害がかかるものの、Oat3の基質となる水溶性有機アニオンでは阻害がかからなかった。

4) CANDASで得られた複数化合物の配座集団のうち、活性の強い上位5化合物を用いて結合配座候補を2配座に絞り込んだ。こうして絞り込まれた2配座と残りの3化合物を重ね合わせ、各リガンド化合物について結合配座候補を選択し、2つの結合配座モデルを構築した。CoMFAを行った結果、予測性の指標で

ある相関係数 q^2 値に注目すると、立体場と静電場のみのタイプよりも立体場と静電場にlogPを考慮したタイプの方が高く、また結合配座候補2の方が高い q^2 値を示した。

5) ヒトの40組織別の遺伝子発現プロファイルからABCトランスポーターにおいては、ABCA2、ABCC8が脳に特異的に発現していた。同様にラットについても、Abca2は脳内組織にほぼ限定された発現を示すことが分かった。

6) 遺伝子機能情報を付加し、トランスポーターとしての機能が認められる遺伝子として、U34Aセットの約8000個のうち77個のプロープが認められた。この中でSlc7a1は脳虚血群で有意な発現の変動を示していた。この遺伝子は1,2回虚血時双方で同様な上昇を示していた。

7) 神経障害により迷走神経運動核ニューロンの細胞内Cl⁻濃度の上昇が惹起された。その結果、中枢抑制性伝達物質であるGABAやグリシンでニューロンの脱分極、いわゆる興奮が発生することがわかった。すなわち、神経障害によって抑制性伝達物質の効果が抑制より興奮へと変化した。この障害による細胞内Cl⁻濃度の上昇は、Na⁺-K⁺-Cl⁻トランスポーターの活性が、障害により異常にたかまり、逆にK⁺-Cl⁻トランスポーターの作用が低下した結果発生したものである。また、このような抑制物質によるニューロンの興奮現象は、幼若動物のニューロンでもみられるところから、障害により、ニューロンの性質が幼若期の状態に先祖がえりすることがわかった。また古くから、アコニチンによる循環障害がよく知られているが、その原因の一つがアコニチンの迷走神経運動核ニューロンへの作用であることも明らかとなった。

8) LPSやアシドーシス下でグリア細胞からのTNF α の産生は経時的に著明であり、細胞障害と関連性を有していた。しかし、グルタミン酸誘発細胞障害は観察されたがTNF α の産生はグリア細胞が存在しても低値であった。抗TNF α 抗体はLPS誘発の細胞障害にのみ効果的であった。

9) 神経細胞の損傷は遅発性細胞死として虚血施行一週間後に海馬のCA1領域を中心に発現した。taltirelinを投与した群では約75%以上の細胞が生き残っていた。taltirelinを投与したマウスの脳内TRH受容体の変動を考察した。taltirelinを静脈内投与60分後に断頭をして脳内のTRH受容体結合動態を検索した。Vehicleを投与した群と比較するとTを投与した群はいずれもKd値の有意な増加が認められた。すなわち、これらの結果はtaltirelinが脳内へ移行し脳保護効果を発現したものである。

10) 免疫抑制薬のCsAについて、上記と同様に2V0のC57BL/6Jマウスを用いて検索をおこなった。CsA投与量を増量させることにより、脳梗塞巣の減少が認められたが死亡する動物も増量した。すなわち、CsAは脳虚

血の状態で脳への移行が可能となり、脳保護効果も発現されるが、むしろ、毒性発現が強く生じることが示唆された。そこで、CsAの「毒性」が中枢神経系においても発現するか否かを確認するため、mdrl欠損マウスでMCAOモデルを作成し、検索をおこなった。再灌流後、CsAを投与した。CsA1mg/kg投与群の脳梗塞巣は有意に減少していたが、10mg/kg投与群では明らかに脳梗塞巣の増強が認められた。

D. 考察

1) Oatp14が脳毛細血管に高発現していること、ならびに血中甲状腺レベルに応じた発現変動の方向性を考慮すると、脳内への甲状腺ホルモンの供給に働いているものと推測される。特に、ヒトorthologでは甲状腺ホルモンに対する特異性が高いことから、関門を介した甲状腺ホルモンの輸送機構としての位置づけられるものと期待される。これまで、甲状腺ホルモンの中枢移行メカニズムについては明らかにされていなかった。甲状腺ホルモンが中枢神経系の発達に重要であることを考えると、非常に画期的な発見であると考えている。

2) 脳毛細血管を介した水溶性有機アニオンのくみ出し機構の特性が、Oat3と類似していることを見出した。局在や阻害剤の選択性を考慮すると、脳側から内皮細胞内への取り込み過程にはOat3が関与しているものと推測される。

3) 単離脈絡叢を用いて解析したところ、脈絡上皮細胞の刷子縁膜を介した輸送過程は、水溶性有機アニオンと脂溶性の有機アニオンと異なる輸送メカニズムであることを確認した。遺伝子発現系とのパラメーターとの比較では必ずしも一致していないが、阻害剤の選択性などを考慮すると、Oatp3により脂溶性有機アニオンの取り込み機構は説明できるものと考えられる。

4) 今回の結果は迷走神経運動核ニューロンの細胞体でみられた現象であり、本ニューロンを支配する上位の障害された弧束核ニューロン神経終末部からの抑制性伝達物質の遊離がどうなっているのか今のところ明らかではない。よって今後、弧束核ニューロンの終末部1個のみを電気生理学的に選択的に刺激できる「フォーカル刺激」法を新たに開発して、研究を行う必要がある。

5) 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している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。大動脈、Willis動脈輪、くも膜についての遺伝子発現との比較による、データマイニングは有効と考えられた。また、脳虚血の実験にて、トランスポーター遺伝子で発現が上昇するものが認められた。

6) 脳内グリア細胞を介す免疫系は明らかに、神経保護作用に関して強い影響を及ぼしているが、サイトカイン療法を施行するには脳治療独自の療法を考案する必要がある。さらに、免疫調整薬の脳機能改善作用はBB欠損モデルでの成績を検討せねばならない。

E. 結論

1) Oatp14/OATP-Fは甲状腺ホルモン、特にT4に対して特異的なトランスポーターである。現在のところ、脳内への甲状腺ホルモンの供給に関与しているものと考えている。

2) Oat3は脳毛細血管内皮細胞の脳側の局在し、PAHやPCGを含めた水溶性有機アニオンの脳側細胞膜から内皮細胞内への取り込みに働いている。

3) Oatp3は脈絡叢刷子縁膜に局在し、脂溶性有機アニオンの脳脊髄液から上皮細胞内への取り込みに働いている

4) 結合配座候補2（立体場+静電場+logP）のモデルをOAT3の結合配座モデルとして提案する。logPの寄与率が0.39であることから、リガンドの疎水性がOAT3との結合に重要な役割を果たしていると考えられる。

5) ヒトの組織別の遺伝子発現プロファイル、およびヒト・ラットのゲノム情報の比較から、脳内組織に特異的に発現するABCトランスポーターを選出した。また、脳虚血の*in vivo*実験系と遺伝子発現プロファイルデータから、脳虚血にて発現が変動するトランスポーター遺伝子を抽出した。

6) 神経障害によって抑制性伝達物質の効果が抑制より興奮へと変化することが明らかとなった。このような抑制物質によるニューロンの興奮現象は、幼若動物のニューロンでもみられるところから、障害により、ニューロンの性質が幼若期の状態に先祖がえりすることがわかった。また古くから、アコニチンによる循環障害がよく知られているが、その原因の一つがアコニチンの迷走神経運動核ニューロンへの作用であることも明らかとなった。

7) 脳内細胞環境系に影響をおよぼす物質は脳保護効果を有するものがある。しかし、脳内移行性が亢進することによる「中枢毒性」の発現も新たに考慮すべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- 1) Sugiyama Y, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y Functional characterization of rat brain specific organi

- c anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* submitted
- 2) Sugiyama Y, Kusuhara H, Lee YJ, Sugiyama Y
Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17 β estradiol-D-17 β -glucuronide (E217 β G) across the blood-brain barrier *Pharm Res*, in press
 - 3) Lee YJ, Kusuhara H, Sugiyama D, Sugiyama Y
Do Mrp proteins play any role in the elimination of organic anions across the blood-cerebrospinal fluid barrier? *J Pharm Sci*, in press
 - 4) Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama D, Sugiyama Y.
Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 306:51-8.
 - 5) Kusuhara H, He Z, Nagata Y, Nozaki Y, Ito T, Masuda H, Meier PJ, Abe T, Sugiyama Y. Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus *Pharm Res* 2003 20: 720-7.
 - 6) Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 305: 1087-97
 - 7) Mizuno, N. and Sugiyama, Y Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin* 2002 17: 93-108
 - 8) Oda A, Hirono S The introduction of atom types and calculations of new parameters for charge equilibrium method *J Comp Chem* in press
 - 9) Tanaka M, Orii T, Gomi T, Kobayashi H, Kanki M, Hirono S Clinical examination of vanomycin measurement method on hemodialysis patient *Yakugaku Zasshi* 2002 122: 269-75
 - 10) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics*. in press
 - 11) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002 506 (Pt A):673-6
 - 12) Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsushita N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma 1 ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol*. 2002 37 Suppl 14:62-6.
 - 13) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushita N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE* 2002 8: (5) 330-339.
 - 14) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2002 193: 299-318.
 - 15) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray. *Transplantation*. 2002 73: 1480-1486.
 - 16) 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* 2002 62: 233-240.
 - 17) Aburatani H. Understanding cancer through gene expression profiling. *Int Congress Series* 2002 1246: 261-70
 - 18) Murakami N, Ishibashi H, Katsurabayashi S, Akaike N. Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 2002 951: 121-9.
 - 19) 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-K 8644 in mechanically dissociated rat substantia innominata. *Life Sci*. 2002 71: 1103-13.
 - 20) Matsumoto N, Komiyama S, Akaike N. Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *J Physiol*. 2002 541: 511-20.
 - 21) Jang IS, Jeong HJ, Katsurabayashi S, Akaike N. Functional roles of presynaptic GABA(A) receptors on glycinergic nerve terminals in the rat spinal cord. *J Physiol*. 2002 541: 423-34.
 - 22) Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N. Reduction of KCC2 expression and GABA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci*. 2002 22: 4412-7.
 - 23) Kanemoto Y, Ishibashi H, Matsuo S, Oyama Y, Akaike N. Modification of NMDA responses by tri-n-butyltin in rat brain neurons. *Br J Pharmacol*. 2002 136: 201-6.
 - 24) Doi A, Kakazu Y, Akaike N. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in GABAergic presynaptic boutons of rat central neurons. *J Neurophysiol*. 2002 87 :1694-702.
 - 25) Kanemoto Y, Ishibashi H, Doi A, Akaike N, Ito Y. An electrophysiological study of muscarinic and nicotinic receptors of rat paratracheal ganglion neurons and their inhibition by Z-338. *Br J Pharmacol*. 2002 135: 1403-14.
 - 26) Akaike N, Murakami N, Katsurabayashi S, Jin

- YH, Imazawa T. Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron. *Neurosci Res.* 2002 42: 187-95.
- 27) Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, Nagahama H, Yoshimura K, Hidaka K, Matsuda M, Takeuchi H, Misumi Y, Nakayama K, Yamamoto T, Akaike N, Hirata M, Nakayama K. Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *EMBO J.* 2002 21: 1004-11.
- 28) Yamanaka H, Doi A, Ishibashi H, Akaike N. Aconitine facilitates spontaneous transmitter release at rat ventromedial hypothalamic neurons. *Br J Pharmacol.* 2002 135: 816-22.
- 29) Doi A, Ishibashi H, Jinno S, Kosaka T, Akaike N. Presynaptic inhibition of GABAergic miniature currents by metabotropic glutamate receptor in the rat CNS. *Neuroscience.* 2002 109: 299-311.
- 30) Ueno T, Okabe A, Akaike N, Fukuda A, Nabekura J. Diversity of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons. *J Biol Chem.* 2002 277: 4945-50.
- 31) Urayama A, Yamada S, Kimura R, Zhang J, Watanabe Y. Neuroprotective effect and brain receptor binding of taltirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone (TRH)analogue, in transient forebrain ischemia of C57BL/6J mice. *Life Sci* 2002 72: 601-7.
- 32) Yamada Y, Watanabe Y, Zhang J, Haraoka J, 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* 2002 114, 165-71.
- 33) Hamano H, Noguchi M, Fukui H, Issiki A, Watanabe Y. Regulation of brain cell environment on neuronal protection: role of TNF α in glial cells. *Life Sci* 2002 72: 565-74,
- 34) Matsumoto S, Isshiki A, Watanabe Y, Wieloch T. Restricted clinical efficacy of cyclosporine A on rat transient middle cerebral artery occlusion. *Life Sci* 2002 72: 591-600.

和文

- 1) 広野修一 「Computer-Aided Structure-Based Drug Design 入門 -創薬におけるBioinformaticsの応用-」 *臨床病理*, 50(1), 45-51 (2002)
- 2) 油谷浩幸 DNAチップの医療への応用 *Medicina* 39(3): 444-448 2002
- 3) 油谷浩幸 遺伝子発現プロファイリング解析による癌の個性診断 *医学のあゆみ* 201(9) 687-692, 2002
- 4) 油谷浩幸 がんの機能ゲノミクス解析 *埼玉医科大学雑誌* 29(1):85-91, 2002
- 5) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将

来について *MEDICAL CORNER* 111(3) : 4-7, 2002

- 6) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来 *総合臨床* 51(10):2901-2, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願2002-279194 「有機陰イオントランスポーターOatp14又はOATP-Fの発言細胞及びその利用方法」 杉山雄一、楠原洋之、杉山大介、古谷利夫 (出願)

S. Hirono, K. Iwase, Method of superposing molecular conformations of compounds, *US Patent*, 6,070,127, 2000

研究要旨 血液脳関門・血液脳脊髄液関門において異物排泄に働いているトランスポーターの同定を試みた。遺伝子発現系を用いた解析の結果、Oatp14ならびにそのヒトorthologであるOATP-Fは、甲状腺ホルモンであるthyroxineの輸送活性が非常に高いことを見出した。免疫染色の結果、Oat3が脳毛細血管の脳側細胞膜に局在していることを明らかにした。BEI法を用いて、脳内からの*p*-アミノ馬尿酸とbenzylpenicillinなどの水溶性有機アニオンの排出の解析を行ったところ、Oat3の遺伝子発現系を用いて得た結果と一致しており、Oat3が水溶性有機アニオンの排出に関与していることが示唆された。脈絡叢刷毛縁膜の有機アニオントランスポーターはOatp1と考えられてきたが、PCR産物をアイソフォーム特異的な制限酵素で確認したところ、脈絡叢に発現しているmajorなアイソフォームはOatp3であることが明らかになった。Oatp familyの基質となるestradiol 17β glucuronideとtaurocholateの脈絡叢への取り込みは、競合阻害を示した。また、Oat3の基質となる水溶性有機アニオンでは阻害がかからなかったことから、Oat3は遺伝子発現系ではOatp3の基質も輸送するが、in vivoではその寄与率は非常に小さく、脂溶性有機アニオンの脈絡叢への取り込みはOatp3が主として働いていることが示唆された。

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。本研究では、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機能解析ならびにその寄与率の評価を行うことを目的とした。

B.研究方法

1) Oatp14の機能解析

単離脳毛細血管内皮細胞から調製したRNAをジーンチップにかけ、高発現していることを見出したOatp14の遺伝子発現系を哺乳類細胞（HEK293）を用いて構築した。また、そのヒトorthologであるOATP-Fについても同じくHEK293細胞を用いて構築した。

(2) 血液脳関門を介した水溶性有機アニオン化合物の排出輸送機構の解析

ラット脳内に薬液を投与し、投与後の脳内薬物残存率を経時的に測定した。イヌリンをリファンレス

とし、投与量の補正を行った。評価薬物の消失に対して、阻害効果を検討し、トランスポーターの寄与率評価を行った。

(3) 単離脈絡叢を用いた輸送評価

Oatp3の遺伝子発現系を哺乳類細胞を用いて構築した。更に、免疫染色により、単離脈絡叢の刷毛縁膜に局在していることから、ラット脳室から脈絡叢を単離し、輸送実験に用いた。

C.研究結果

1) Oatp14の機能解析

遺伝子発現系を用いた輸送実験を行ったところ、過去Oatp familyの基質となる有機アニオンも基質とすることが明らかになった。更に、甲状腺ホルモンのうちthyroxine (T4) と不活性代謝物であるreverse T3を非常によい基質とすることが明らかになった。ヒトOATP-Fでは、特にT4に対する特性が高いことが明らかになった。また、甲状腺切除によりOatp14の脳毛細血管での発現量は増加し、T3投与により低下した。

(2) 血液脳関門を介した水溶性有機アニオン化合物の排出輸送機構の解析

免疫染色の結果、Oat3は脳毛細血管の脳側の細胞膜に局在していることが明らかになった。Oat3の基質となる*p*-アミノ馬尿酸(PAH)とbenzylpenicillin (PCG)の両薬物の消失を測定した。相互阻害実験を行うと、両化合物のKm値とKi値は、ほぼ一致した。

(3) 単離脈絡叢を用いた輸送評価

過去、Oatp1と思われてきたが、PCR産物をアイ

ソフォーム特異的な制限酵素で確認したところ、脈絡叢に発現しているmajorなアイソフォームはOatp3であることが明らかになった。Oatp familyの基質となるestradiol 17 β glucuronideとtaurocholateの脈絡叢への取り込みは、競合阻害を示した。また、Oatp3の阻害剤では阻害が見られるのに対して、Oat3の基質となる水溶性有機アニオンでは阻害がかからなかった。

D.考察

Oatp14が脳毛細血管に高発現していること、ならびに血中甲状腺レベルに応じた発現変動の方向性を考慮すると、脳内への甲状腺ホルモンの供給に働いているものと推測される。特に、ヒトorthologでは甲状腺ホルモンに対する特異性が高いことから、関門を介した甲状腺ホルモンの輸送機構としての位置づけられるものと期待される。これまで、甲状腺ホルモンの中枢移行メカニズムについては明らかにされていなかった。甲状腺ホルモンが中枢神経系の発達に重要であることを考えると、非常に画期的な発見であると考えている。

脳毛細血管を介した水溶性有機アニオンのくみ出し機構の特性が、Oat3と類似していることを見出した。局在や阻害剤の選択性を考慮すると、脳側から内皮細胞内への取り込み過程にはOat3が関与しているものと推測される。

同じく単離脈絡叢を用いて解析したところ、脈絡上皮細胞の刷子縁膜を介した輸送過程は、水溶性有機アニオンと脂溶性の有機アニオンとで異なる輸送メカニズムであることを確認した。遺伝子発現系とのパラメーターとの比較では必ずしも一致していないが、阻害剤の選択性などを考慮すると、Oatp3により脂溶性有機アニオンの取り込み機構は説明できるものと考えられる。

E.結論

1. Oatp14/OATP-Fは甲状腺ホルモン、特にT4に対して特異的なトランスポーターである。現在のところ、脳内への甲状腺ホルモンの供給に関与しているものと考えている。

2. Oat3は脳毛細血管内皮細胞の脳側の局在し、PAHやPCGを含めた水溶性有機アニオンの脳側細胞膜から内皮細胞内への取り込みに働いている。

3. Oatp3は脈絡叢刷子縁膜に局在し、脂溶性有機アニオンの脳脊髄液から上皮細胞内への取り込みに働いている。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

- 1) Sugiyama Y, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier. J. Biol. Chem. submitted
- 2) Sugiyama Y, Kusuhara H, Lee YJ, Sugiyama Y Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17 β estradiol-D-17 β -glucuronide (E217 β G) across the blood-brain barrier Pharm Res, in press
- 3) Lee YJ, Kusuhara H, Sugiyama D, Sugiyama Y Do Mrp proteins play any role in the elimination of organic anions across the blood-cerebrospinal fluid barrier? J Pharm Sci, in press
- 4) Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama D, Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. J Pharmacol Exp Ther 2003 306:51-8.
- 5) Kusuhara H, He Z, Nagata Y, Nozaki Y, Ito T, Masuda H, Meier PJ, Abe T, Sugiyama Y. Expression and functional involvement of organic anion transporting polypeptide subtype 3 (Slc21a7) in rat choroid plexus Pharm Res 2003 20: 720-7.
- 6) Hasegawa M, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y. Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat. J Pharmacol Exp Ther 2003 305: 1087-97
- 7) Mizuno, N. and Sugiyama, Y Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. Drug Metabol Pharm acokin 2002 17: 93-108

H.知的財産権の出願・登録状況

特願2002-279194 「有機陰イオントランスポーター-Oatp14又はOATP-Fの発現細胞及びその利用方法」 杉山雄一、楠原洋之、杉山大介、古谷利夫 (出願)

基質多選択的有機アニオントランスポーター（OAT3）と相互作用する薬物の立体配座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 教授

研究要旨 Oat3は血液脳関門ならびに血液脳脊髄液関門に発現し、有機アニオンの中枢からのくみ出しに働く。薬物動態的に有利な創薬分子デザインや、種々の化合物のin silicoスクリーニングを可能にするため、当研究室で開発したLigand-Based Drug Design手法（高温分子動力学法を利用した自動配座プログラムCAMDAS）&官能基特性に基づく異種分子の重ね合わせ手法を用いて、化合物が実際にOat3に結合している構造（結合配座）を推定した。更に、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、Oat3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、Oat3リガンド結合部位モデルを検討した。CAMDASで得られた複数化合物の配座集団の各配座同士を自動的に並進、回転運動させて特性球同士の重なりが最良の重ね合わせを出力した結果、活性の強い上位5化合物を用いて結合配座候補を2配座に絞り込んだ。重ね合わせで得られた2つの結合配座モデルに対しSYBYL6.8 QSARモジュールのCoMFAを行ったところ、相関係数 q^2 値から判断し、結合配座候補2（立体場+静電場+logP）のモデルの方をOAT3の結合配座モデルとして提案する。

A.研究目的

有機イオントランスポーターに属するorganic anion transporter 3 (OAT3) は腎臓、肝臓、脳、眼に存在し、特に脳からの有機アニオンの排出や解毒に重要な役割をしていると言われている。OAT3の立体構造は未知であるため、OAT3-薬物相互作用様式をリガンド分子群の3次元構造特徴の観点から解析し、その情報を用いた合理的分子設計を行なうことにより、脳内薬物濃度の調節が可能であると思われる。

B.研究方法

OAT3に対する8個のリガンド化合物に対して、立体配座集団を生成するために、CAMDASを用いてマルチコピー分子動力学計算を、MMFF94s力場から静電項を除いた中性力場を適用して温度1200Kで1ns行った。次に得られた立体配座集団の中から結合配座を選択するために、SUPERPOSEを用いた。この重ね合わせ手法では、分子内にある原子団（官能基）を疎水性（HP）、水素結合供与性（HD）、水素結合受容性（HA）、水素結合供与/受容性（DA）、ハロゲン（HL）の5種類に大別し、それをある一定の大きさを持った球（官能基特性球）として表現する。次にCAMDASで得られた複数化合物の配座集団の各配座同士を自動的に並進、回転運動させて特性球同士の重なりが最良の重ね合わせを出力する。重ね合わせから得られた3次元ファーマコフォアとCoMFAから得られた等高線図（立体相互作用、静電相互作用）の情報からOAT3のリガンド結合部位の推定を行った。

C.研究結果・考察

CAMDASで得られた複数化合物の配座集団の各配座同士を自動的に並進、回転運動させて特性球同士の重なりが最良の重ね合わせを出力した結果、活性の強い上位5化合物を用いて結合配座候補を2配座に絞り込んだ。こうして絞り込まれた2配座と残りの3化合物を重ね合わせ、各リガンド化合物について結合配座候補を選択し、2つの結合配座モデルを構築した。さらに、最終的な結合配座を決定するために、重ね合わせで得られた2つの結合配座モデルに対しSYBYL6.8 QSARモジュールのCoMFAを行った。CoMFAで用いたフィールドは立体場+静電場のみの場合と、立体場+静電場にlogPを加えた場合の2つの解析を行った。

2つの結合配座モデルを用いてCoMFAを行った結果、予測性の指標である相関係数 q^2 値に注目すると、立体場と静電場のみのタイプよりも立体場と静電場にlogPを考慮したタイプの方が高く、また結合配座候補2の方が高い q^2 値を示した。

D.結論

結合配座候補2（立体場+静電場+logP）のモデルをOAT3の結合配座モデルとして提案する。logPの寄与率が0.39であることから、リガンドの疎水性がOAT3との結合に重要な役割を果たしていると考えられる。

E.健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Oda A, Hirono S The introduction of atom types and calculations of new parameters for charge equilibrium method *J Comp Chem* in press
- 2) Tanaka M, Orii T, Gomi T, Kobayashi H, Kank e M, Hirono S Clinical examination of vanomycin measurement method on hemodialysis patient *Yakugaku Zasshi* 2002 122: 269-75

- 3) 広野修一 「Computer-Aided Structure-Based Drug Design 入門 -創薬におけるBioinformatics の応用-」 *臨床病理*, 50(1), 45-51 (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況

S. Hirono, K. Iwase, **Method of superposing molecular conformations of compounds**, *US Patent*, **6,070,127**, 2000

厚生科学研究費補助金（こころの健康 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（東京大学国際・産学共同研究センター教授）

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およびデータベースを構築した。ラット脳毛細血管をはじ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トランスポーター遺伝子についての変動も解析した。Slc7a1 の発現が脳虚血後に変動していることが認められた。

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)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 機能に十四あう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。

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 Wistar Rat 12 週齢雄 10 匹を用いて下記の手技により進めた。

- 1) ネンブタール 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 RNA を調製した。

トータル RNA10 μ g を用いて Biotin 標識 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いただいた。

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製した (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

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った。また、ヒトの ABC トランスポーターの遺伝子とアミノ酸相同性比較において、15 個の遺伝子がヒト・ラットに共通して GeneChip のプローブとして存在した(表1)。ヒトの40組織別の遺伝子発現プロファイルから ABC トランスポーターにおいては、ABCA2、ABCC8 が脳に特異的に発現していた。同様にラットについても、Abca2 は脳内組織にほぼ限定された発現を示すことが分かった。

2. 脳虚血時の遺伝子発現プロファイル解析

遺伝子機能情報を付加し、トランスポーターとしての機能が認められる遺伝子として、U34A セットの約 8000 個のうち 77 個のプローブが認められた。この中で Slc7a1 は脳虚血群で有意な発現の変動を示していた。この遺伝子は 1,2 回虚血時双方で同様な上昇を示していた。

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している 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。大動脈、Willis 動脈輪、くも膜についての遺伝子発現との比較による、データマイニングは有効と考えられた。また、脳虚血の実験にて、トランスポーター遺伝子で発現が上昇するものが認められた。

E. 結論

ヒトの組織別の遺伝子発現プロファイル、およびヒト・ラットのゲノム情報の比較から、脳内組織に特異的に発現する ABC トランスポーターを選出した。また、脳虚血の *in vivo* 実験系と遺伝子発現プロファイルデータから、脳虚血にて発現が変動するトランスポーター遺伝子を抽出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions. *Physiol Genomics*. 2003 in press
- 2) Higuchi A, Shimmura S, Ishii M, Aburatani H, Tsubota K. Serum- and serum deprivation-induced transcriptional profiles of cultured conjunctival epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 506(Pt A):673-6
- 3) Nakajima A, Wada K, Katayama K, Saubermann L, Osawa E, Nagase H, Ueno N, Matsushashi N, Aburatani H. Gene expression profile after peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligand administration in dextran sodium sulfate mice. *J Gastroenterol*. 2002 37 Suppl 14:62-6. 2002
- 4) Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASES* 8: 330-9
- 5) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002 193: 299-318
- 6) Saiura A, Kohro T, Yamamoto T, Izumi A, Wada Y, Aburatani H, Sugawara Y, Hamakubo T, Taniguchi T, Naito M, Kodama T, Makuuchi M. Detection of an up-regulation of a group of chemokine genes in murine cardiac allograft in the absence of interferon-gamma by means of DNA microarray1. *Transplantation*. 2002 73: 1480-6
- 7) 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

総説

- 1) 油谷浩幸 DNA チップの医療への応用 *Medicina* 39(3): 444-448 2002
- 2) 油谷浩幸 遺伝子発現プロファイリング解析による癌の個性診断 *医学のあゆみ* 201(9) 687-692, 2002
- 3) 油谷浩幸 がんの機能ゲノミクス解析 *埼玉医科大学雑誌* 29(1):85-91, 2002
- 4) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来について *MEDICAL CORNER* 111(3) : 4-7, 2002
- 5) 油谷浩幸 ヒトゲノムプロジェクトの現況と将来

来 総合臨床 51(10):2901-2, 2002

- 6) Aburatani H. Understanding cancer through gene expression profiling. (review) **International Congress Series** 1246: 261-270, 2002

2. 学会発表

- 1) The 3rd Cherry blossom symposium. “Cancer Classification by Gene Expression Profiling.”
- 2) 第3回 Sun Bioinformatics セミナー「トランスクリプトーム解析のための生命情報の統合ーシステム生物学へー」
- 3) 第34回日本臨床検査自動化学会特別企画講演「システム生物学へのパラダイムシフトートランスクリプトームからの疾病解析ー」
- 4) 第61回日本癌学会総会シンポジウム「ゲノム科学とがん研究」トランスクリプトーム解析からがんのシステム生物学へ
- 5) Toxicogenomics International Forum 2002, “Understanding cancer through gene expression profiling”
- 6) Rad-genomics「発現プロファイル解析と疾病研究」
- 7) 学術創成研究第4回シンポジウム「高感度 DNA マイクロアレイによる遺伝子機能解析」

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1. ABC Transporter : Human-Ratの対応付け

Hs	Rn
ABCA2	Abca2
ABCB1	Abcb1a
ABCB11	Abcb11
ABCB4	Abcb4
ABCB6	Abcb6
ABCC1	Abcc1a
ABCC5	Abcc5a
ABCC6	Abcc6
ABCC8	Abcc8
ABCC9	Abcc9
ABCD3	Abcd3
ABCF1	Abcf1
ABCF2	Abcf1
ABCG1	Abcg1
TAP2	Tap2

図2. ラット脳血管 ABC膜輸送蛋白質の遺伝子発現

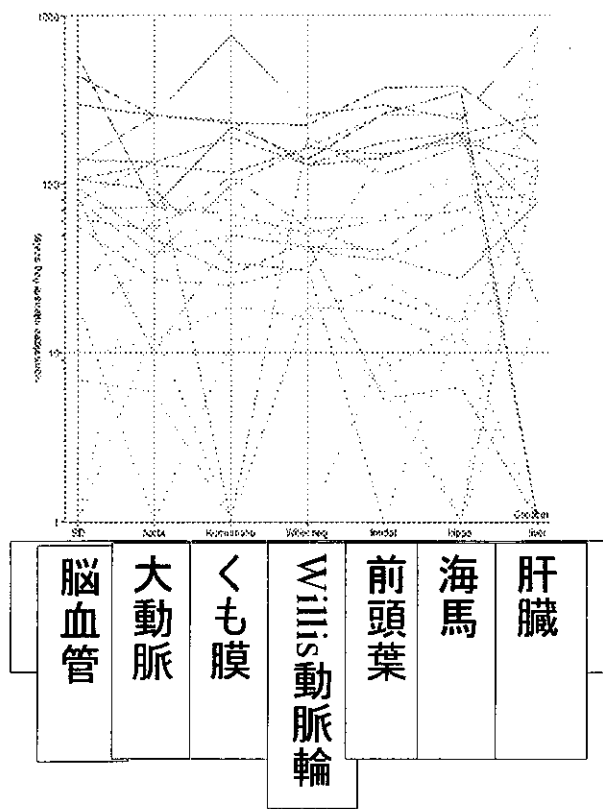
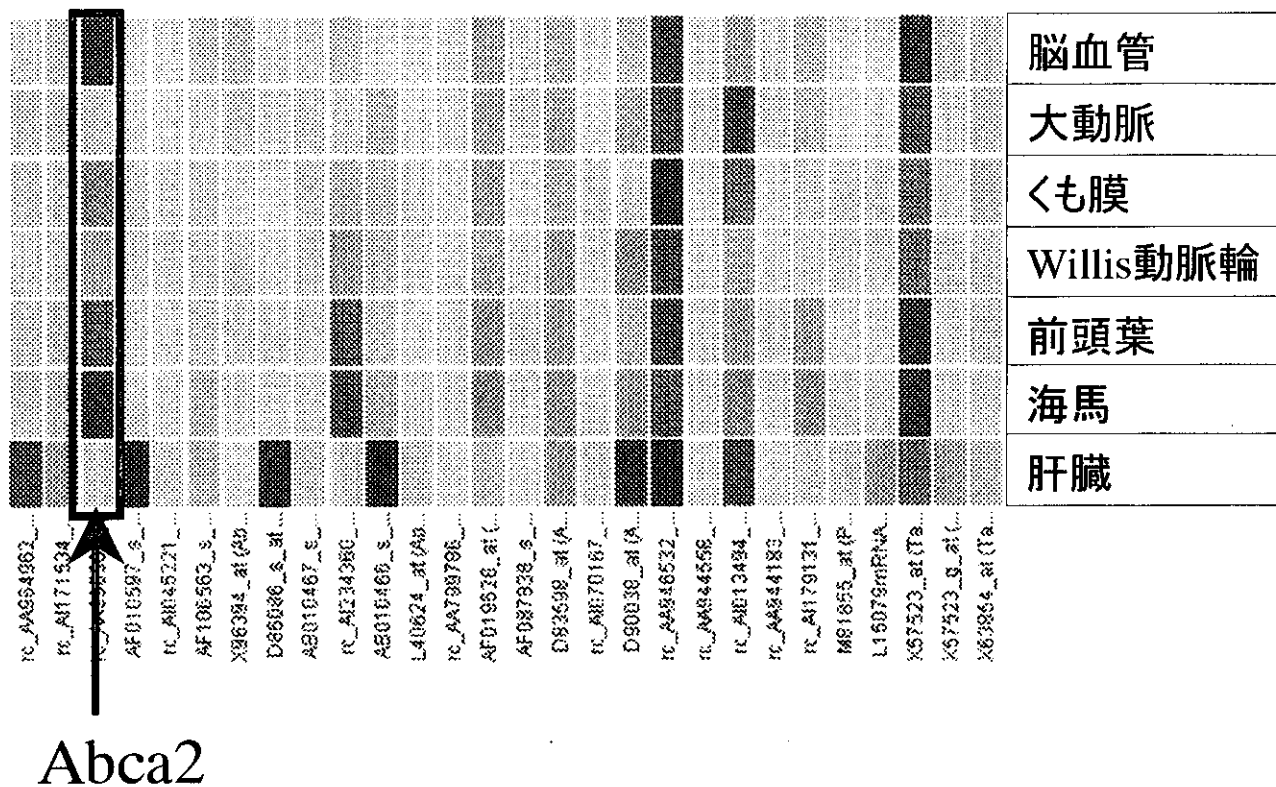
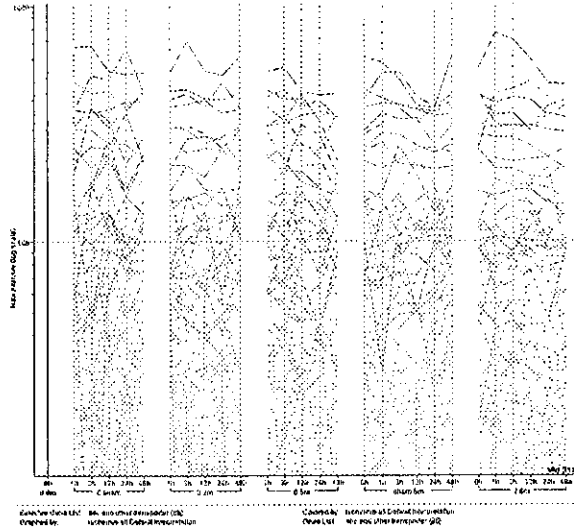
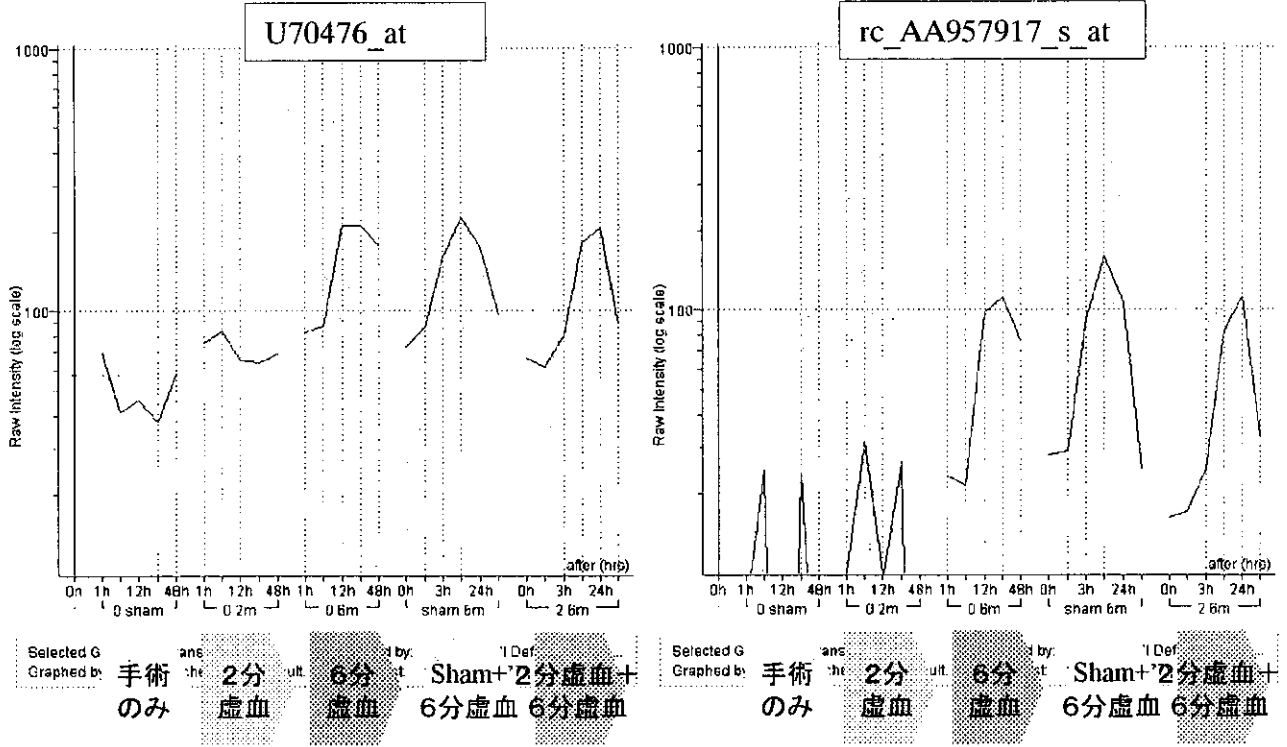


図3. ラット脳虚血による膜輸送蛋白質の遺伝子発現変動

Transporter (77 Probesets)



Solute carrier family 7 member A1 (amino acid transporter cationic 1)



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・大学院医学系研究科、教授

研究要旨 心臓の運動を遠心性に抑制・制御する延髄迷走神経運動核ニューロンに障害を与え、生理学的膜特性の同定神経細胞には多数の神経終末が投射している。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で、神経障害時における細胞膜特性の変化を明らかにすることを目的とした。神経障害によって抑制性伝達物質の効果が抑制より興奮へと変化することが明らかとなった。このような抑制物質によるニューロンの興奮現象は、幼若動物のニューロンでもみられるところから、障害により、ニューロンの性質が幼若期の状態に先祖がえりすることがわかった。また古くから、アコニチンによる循環障害がよく知られているが、その原因の一つがアコニチンの迷走神経運動核ニューロンへの作用であることも明らかとなった。

A.研究目的

神経細胞には多数の神経終末が投射している。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で、神経障害時における細胞膜特性の変化を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

心臓の運動を遠心性に抑制・制御する延髄迷走神経運動核ニューロンを色素DiIによって逆行性に生体染色して同定後、本ニューロンを生体外へ単離摘出して、そのニューロンの生理学的膜特性の同定を行った。なおin vivo条件下、ニューロン軸索切断の数日後、障害ニューロンとコントロールの正常ニューロンを生体外に摘出して、これら両ニューロン群間で、障害の有無によりどのようにその細胞膜特性が変化するかを電気生理学的に調べた。

C.研究結果

神経障害により迷走神経運動核ニューロンの細胞内Cl⁻濃度の上昇が惹起された。その結果、中枢抑制性伝達物質であるGABAやグリシンでニューロンの脱分極、いわゆる興奮が発生することがわかった。すなわち、神経障害によって抑制性伝達物質の効果が抑制より興奮へと変化した。この障害による細胞内Cl⁻濃度の上昇は、Na⁺-K⁺-Cl⁻トランスポーターの活性が、障害により異常にたかまり、逆にK⁺-Cl⁻トランスポーターの作用が低下した結果発生したものである。また、このような抑制物質によるニューロンの興奮現象は、幼若動物のニューロンでもみられるところから、障害により、ニューロンの性質が幼若期の状態に先祖がえりすることがわかった。また古くから、アコニチンによる循環障害がよく知られ

ているが、その原因の一つがアコニチンの迷走神経運動核ニューロンへの作用であることも明らかとなった。

D.考察

今回の結果は迷走神経運動核ニューロンの細胞体でみられた現象であり、本ニューロンを支配する上位の障害された弧束核ニューロン神経終末部からの抑制性伝達物質の遊離がどうなっているのか今のところ明らかではない。よって今後、弧束核ニューロンの終末部1個のみを電気生理学的に選択的に刺激できる‘フォーカル刺激’法を新たに開発して、研究を行う必要がある。

E.結論

神経障害によって抑制性伝達物質の効果が抑制より興奮へと変化することが明らかとなった。このような抑制物質によるニューロンの興奮現象は、幼若動物のニューロンでもみられるところから、障害により、ニューロンの性質が幼若期の状態に先祖がえりすることがわかった。また古くから、アコニチンによる循環障害がよく知られているが、その原因の一つがアコニチンの迷走神経運動核ニューロンへの作用であることも明らかとなった。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Murakami N, Ishibashi H, Katsurabayashi S, Akaike N. Calcium channel subtypes on single GABAergic presynaptic terminal projecting to rat hippocampal neurons. Brain Res. 2002 951: 121-9.
- 2) 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-K 8644 in mechanically dissociated rat substantia innominata. *Life Sci.* 2002 71: 1103-13.
- 3) Matsumoto N, Komiyama S, Akaike N. Pre- and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels during metabolic inhibition of rat hippocampal CA1 neurons. *J Physiol.* 2002 541: 511-20.
 - 4) Jang IS, Jeong HJ, Katsurabayashi S, Akaike N. Functional roles of presynaptic GABA(A) receptors on glycinergic nerve terminals in the rat spinal cord. *J Physiol.* 2002 541: 423-34.
 - 5) Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N. Reduction of KCC2 expression and GABA(A) receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci.* 2002 22: 4412-7.
 - 6) Kanemoto Y, Ishibashi H, Matsuo S, Oyama Y, Akaike N. Modification of NMDA responses by tri-n-butyltin in rat brain neurons. *Br J Pharmacol.* 2002 136: 201-6.
 - 7) Doi A, Kakazu Y, Akaike N. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in GABAergic presynaptic boutons of rat central neurons. *J Neurophysiol.* 2002 87 :1694-702.
 - 8) Kanemoto Y, Ishibashi H, Doi A, Akaike N, Ito Y. An electrophysiological study of muscarinic and nicotinic receptors of rat paratracheal ganglion neurons and their inhibition by Z-338. *Br J Pharmacol.* 2002 135: 1403-14.
 - 9) Akaike N, Murakami N, Katsurabayashi S, Jin YH, Imazawa T. Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron. *Neurosci Res.* 2002 42: 187-95.
 - 10) Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, Nagahama H, Yoshimura K, Hidaka K, Matsuda M, Takeuchi H, Misumi Y, Nakayama K, Yamamoto T, Akaike N, Hirata M, Nakayama K. Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *EMBO J.* 2002 21: 1004-11.
 - 11) Yamanaka H, Doi A, Ishibashi H, Akaike N. Aconitine facilitates spontaneous transmitter release at rat ventromedial hypothalamic neurons. *Br J Pharmacol.* 2002 135: 816-22.
 - 12) Doi A, Ishibashi H, Jinno S, Kosaka T, Akaike N. Presynaptic inhibition of GABAergic miniature currents by metabotropic glutamate receptor in the rat CNS. *Neuroscience.* 2002 109: 299-311.
 - 13) Ueno T, Okabe A, Akaike N, Fukuda A, Nabekura J. Diversity of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons. *J Biol Chem.* 2002 277: 4945-50.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし