

論文の内容の要旨

論文題目 血液脳関門および腎近位尿細管に発現する新規カチオン性薬物トランスポーター
—MCT9/SLC16A9 の機能解析

氏名 小林 和正

【背景・目的】

中枢神経系には、アルツハイマー病、パーキンソン病ほかアンメットニーズが高い疾患があり、治療薬開発に対する期待も非常に高い。しかし、中枢神経系と血液との間には、脳毛細血管内皮細胞により構成される血液脳関門が存在し、医薬品の中枢移行を妨げる要因となる。これまで ABC トランスポーターである P-glycoprotein や BCRP、MPR4 による能動的くみ出しが、医薬品の

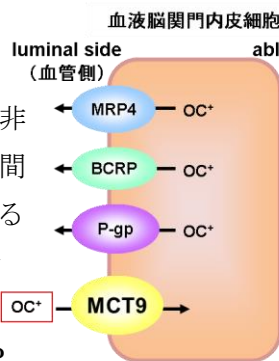


図1. 有機カチオンの中枢移行機構

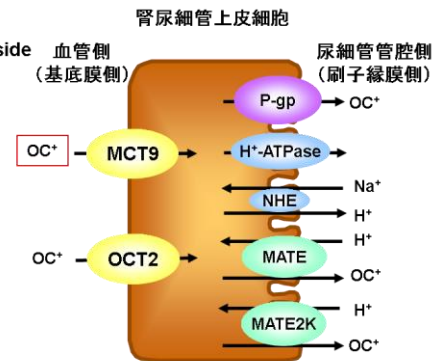


図2. 有機カチオンの尿細管分泌機構

中中枢移行を妨げる能動的関門機構として注目されてきた。その一方で、近年、clonidine などのカチオン性薬物の血液脳関門透過が飽和性を示す事例、脳細胞間液中薬物濃度が血漿中遊離型濃度を上回る事例が見いだされ、トランスポーターが介在した薬物の中枢移行が注目されている。当研究室の野崎は、パーキンソン症候群治療薬 amantadine の血液脳関門透過は飽和性を示し、他のカチオン性薬物によって阻害されることを見出しており、トランスポーターの関与が示唆する結果を報告している。血液中から肝臓や腎臓、消化管上皮細胞内へのカチオン性薬物の取り込み過程には OCT1/SLC22A1、OCT2/SLC22A2 が中心に機能していると考えられているが、血液脳関門には OCT の発現は認められないことから、OCT とは異なるトランスポーターの関与が示唆されていた。血液脳関門だけではなく、腎

排泄においても OCT とは異なる輸送機構の存在が示唆されているが、いずれも分子実体の解明には至っていない。本研究では、本薬物輸送機構に関わるトランスポーターを明らかにすることを目的とし、monocarboxylate transporter 9 (MCT9)/SLC16A9 の機能解析に取り組んだ。MCT9 は、①トランスクリプトーム解析により脳毛細血管内皮細胞ならびに腎近位尿細管に発現していること、②ゲノムワイド関連解析により、その SNP が尿酸・カルニチンの血漿中濃度と関連することが示唆され、アフリカツメガエル卵母細胞に、MCT9 cRNA をインジェクションした際に、カルニチンの細胞内からの排出が促進されることが報告されている。本研究では MCT9 の重要性を明らかにすることを目的として、以下の解析を行った。

【方法・結果】

1-1. Monocarboxy transporter 9 (MCT9)の組織分布および膜局在

Semi-quantitative PCR により、MCT9 のヒト組織分布を検討した。その結果、腎臓にもっとも発現が高く、卵巣、脳にも発現が認められた。Percoll を用いた密度勾配法により、マウス腎臓側底膜および刷子縁膜画分を調製し、MCT9 の発現を解析したところ、側底膜画分に MCT9 が高発現することが確認された。さらに、サルの脳毛細血管内皮細胞濃縮分画及び腎臓の粗膜画分において、MCT9 が強く発現していることも併せて見出した。ヒト腎臓および脳パラフィン切片を用いた免疫染色を行い、MCT9 の膜局在を決定した。MCT9 は脳では P-glycoprotein の膜局在と一致し、脳毛細血管内皮細胞の管腔側細胞膜に局在していること、腎臓では近位尿細管の側底膜側に発現していることを見出した。

1-2. Monocarboxy transporter 9 (MCT9)の基質スクリーニング

MCT9 の siRNA knock down (KD)により、細胞膜上の MCT9 の発現が低下すること、反対に、過剰発現 (OE) により、細胞膜上の発現量が増加することが確認された。パーキンソン病治療薬 amantadine や 経口禁煙補助薬 varenicline 他複数のカチオン性薬物の取り込み活性が MCT9 の蛋白量に応じて変化することを見出した(図 3)。

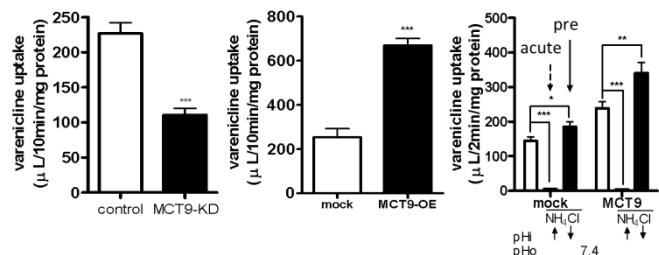


図3. MCT9-KDおよびOEにおけるvareniclineの取り込み試験およびプロトン勾配の影響

一方で、MCT9 の cRNA をインジェクションした MCT9 強制発現 oocytes においても、varenicline、sulpiride などカチオン性薬物の輸送活性が有意に増加することが確認された。塩化アンモニウム前処理による外向き H⁺勾配を負荷した条件下で、MCT9 強制発現 HEK293 細胞における varenicline の輸送活性が増加することも見出しており、MCT9 は H⁺/カチオン性薬物アンチポーターであることが示唆された。

1-3. MCT9-OE HEK293 細胞を用いた阻害剤探索

二十種類の化合物を用いて、MCT9 による varenicline の取り込みに対して、阻害効果を評価した。verapamil と olanzapine が MCT9 をそれぞれ K_i は 13.5±5.59、18.8±4.57 (μM)で阻害することを見出した。一方で、OCT 基質である TEA による阻害効果は認められなかった。MCT9 を阻害する濃度において、verapamil と olanzapine は OCT2 を阻害しないことを in vitro 試験により確認できた。以上より、TEA、verapamil と olanzapine を阻害剤として用いることで、OCT2 と MCT9 を区別できる阻害剤になり得ることが示唆された。

2.脳および腎臓における MCT9 の局在および機能解析

2-1. ヒト不死化脳毛細血管内皮細胞(hCMEC/D3)におけるカチオン性薬物取り込みの評価

hCMEC/D3では、ヒト血液脳関門のモデル細胞として、種々薬物の *in vitro* 輸送実験に用いられて来た。hCMEC/D3の細胞膜上に、内因性 MCT9 が発現していることを確認した。MCT9 siRNA-KD hCMEC/D3細胞を用いて、カチオン性薬物の取り込み活性を評価した。Varenicline のほか、 β 遮断薬 bisoprolol、第一世代型 H1 受容体拮抗薬 (diphenhydramine など) の取り込み活性が有意に低下した。さらに、塩化アンモニウム前処理により外向き H^+ 勾配を負荷した条件下では、対照群において顕著に varenicline の取り込み活性が増加することも確認された。

2-2. サルおよびマウス腎スライスを用いた MCT9 の機能解析

腎スライス実験は、腎臓の側底膜からのみの薬物の取り込みを評価でき、腎臓への薬物の蓄積を評価できる *ex vivo* の実験系である。マウスおよびカンクイアカゲザル腎臓から、腎切片を調製し、varenicline の腎スライスへの取り込みを評価した。Varenicline の取り込みは飽和性を示し、MCT9 阻害剤(verapamil)で強く阻害された

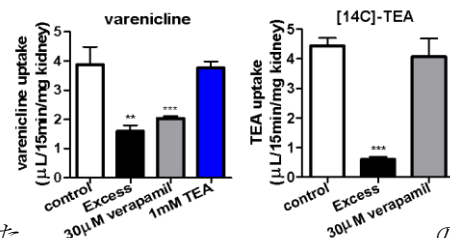


図4. カンクイアカゲザル腎スライスにおけるカチオン性薬物の取り込み

に対して、TEA による阻害の影響は受けなかった。反対に、TEA 自身の取り込みは、同条件で飽和し、verapamil の影響は受けなかった。以上の結果より、腎臓の側底膜側において、OCT2 でなく MCT9 を介して varenicline が細胞内に取り込まれることが示唆された。

3. 前立腺癌由来 PC3 細胞への抗がん剤取り込みにおける MCT9 の関与

近年、前立腺癌に対する開発段階の抗癌剤 YM155 の PC3 細胞への取り込みには OCT 以外のトランスポーターの関与が報告されてきた。そこで、MCT9-KD PC3 細胞を用いて、YM155 の取り込みを評価したところ、YM155 の取り込み活性は control 群と比較して顕著に低下した。さらに、YM155 の殺細胞効果を survivin 発現、caspase-3 および PARP の切断を指標に評価した結果、MCT9-KD 条件下において、survivin 発現低下および caspase-3 および PARP の切断が抑制されていることを見出した。以上の結果より、MCT9 は脳と腎臓のカチオン性薬物トランスポーターとしての役割だけでなく、癌細胞への抗癌剤の取り込み及び細胞増殖抑制効果にも関与していることが示唆された。

【まとめ・考察】

本研究により、MCT9 が多くのカチオン性薬物を基質とする有機カチオントランスポーターであることを明らかにした。OCT とは阻害剤選択性が異なること、またその基質選択性、輸送駆動力の観点から、MCT9 がこれまで薬物速度論的に存在が示唆されてきたトランスポーターの分子実体の 1 つであることが考えられる。検討した基質では、varenicline ほかに中枢作用型の医薬品、第一世代の H1 受容体拮抗薬など中枢神経系での有害事象に関連した薬物を含み、脳毛細血管内皮細胞の管腔側に局在していることから、MCT9 をターゲティングすることで、中枢神経系への薬物送達を促進することに貢献するものと考えられる。さらに、正常組織では、脳以外に腎臓での発現も認められ、OCT2 と並んで医薬品の腎排泄能力を決定する要因ともなり得る他、癌由来細胞にも発現し、一部の抗がん剤の取り込みにも働き、その感受性決定因子の一つとなることが示唆された。MCT9 の発現は様々な組織由来細胞株で幅広く確認されており、生理活性物質あるいはホルモンなどの内因性化合物の輸送に関与している可能性も高い。本研究の成果は、BBB を介した薬物の中枢移行性の克服、腎臓における薬物間相互作用の回避など医薬品創製及び適正使用に貢献するものと期待される。