

[別紙2]

## 審査結果の要旨

氏名 小林 和正

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、医薬品の中枢移行性は厳密に制御されている。これまで ABC トランスポーターである P-glycoprotein や BCRP、MPR4 による能動的汲み出しが、医薬品の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。近年、clonidine など一部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や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。当研究室においても、パーキンソン症候群治療薬 amantadine の血液脳関門透過が飽和性を示すことや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されている。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機構には OCT1/SLC22A1、OCT2/SLC22A2 が中心的な役割を果た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ものの、血液脳関門と腎臓のいずれにおいても、その分子実体は解明されていない。申請者は、脳毛細血管内皮細胞ならびに腎近位尿細管に発現が認められている monocarboxylate transporter 9 (MCT9)/SLC16A9 に関して、第1章では、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、血液脳関門・腎近位尿細管において細胞内への取り込みに働くことを示唆する結果を得た。また、第2章では、がん由来細胞において抗がん剤の取り込みに関与することを示唆する結果を得た。以下に研究の概略を示す。

### 【Monocarboxy transporter 9 (MCT9)の組織分布および膜局在】

申請者は、Semi-quantitative PCR による MCT9 の組織発現プロファイル解析から、MCT9 が腎臓に高発現するほか、脳においても発現していることを見出した。さらに、パラフィン切片を用いた免疫染色より、MCT9 がヒト脳において脳毛細血管内皮細胞の管腔側細胞膜に、ヒト腎臓において近位尿細管の側底膜側に局在することを明らかにした。したがって、MCT9 は血液脳関門および腎近位尿細管に発現し、機能していることが期待される。

#### 【MCT9 基質および阻害剤の探索】

申請者は、MCT9 の siRNA knock down (KD) により、HEK293 細胞に発現する細胞膜上の MCT9 が control と比較して低下すること、反対に過剰発現 (OE) により、細胞膜上の MCT9 が増加することを見出し、パーキンソン病治療薬 amantadine や 経口禁煙補助薬 varenicline ほか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明らかにした。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 control と比較して有意に増加することが確認された。Varenicline、amantadine に関しては当研究室の OCT2 発現 HEK293 細胞を用いた取り込み試験の結果より、OCT2 の基質にならないことを見出しており、MCT9 選択的な基質であることが期待される。さらに、塩化アンモニウム前処理による外向き H<sup>+</sup>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より、MCT9 は H<sup>+</sup>/カチオン性薬物アンチポーターであることが示唆され、過去の知見の未知カチオン性薬物トランスポーターの特徴と一致していた。MCT9 阻害剤スクリーニングの検討から、verapamil と olanzapine がそれぞれ K<sub>i</sub> は 13.5±5.59、18.8±4.57 (μM) で MCT9 を阻害することを見出した。一方で、各阻害剤の K<sub>i</sub> 値では OCT 基質である TEA の取り込みは阻害されなかった。以上より、verapamil と olanzapine が、MCT9 を阻害する濃度において、OCT2 を阻害しないことから、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。

#### 【脳および腎臓における MCT9 の機能解析】

ヒト不死化脳毛細血管内皮細胞 (hCMEC/D3) の細胞膜上において、MCT9 は内因性に発現しており、MCT9 siRNA-KD hCMEC/D3 細胞において、細胞膜上の MCT9 の発現量および 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 control と比較して有意に低下した。さらに、塩化アンモニウム前処理により外向き H<sup>+</sup>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した。以上より、hCMEC/D3 に発現する MCT9 は、varenicline をはじめとするカチオン性薬物の輸送に関与することが示唆された。マウスおよびカニクイザルの腎臓から調整した腎切片を用いた varenicline 取り込み試験では、基質の過剰量による飽和性が認められ、MCT9 阻害剤 (verapamil) で強く阻害されることが見出されたことより、MCT9 を介した varenicline 取り込みが示唆された。一方で、varenicline の取り込みは TEA 過剰量によって阻害されなかった。反対に、TEA 自身の取り込みは、TEA 過剰量で飽和し、verapamil の影響は受けなかった。以上より、申請者は、腎臓の側底膜側において、varenicline は OCT2 でなく MCT9 を介して細胞内に取りこまれることを見出した。

#### 【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。申請者は、MCT9-KD PC3細胞を用いて、YM155の取り込みを評価し、YM155の取り込み活性がcontrol群と比較して顕著に低下することを見出した。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明らかにした。以上より、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。

以上、本研究から、MCT9は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が明らかになり、血液脳関門および腎近位尿細管を介した薬物輸送に重要な役割を果たす可能性があることが示唆された。OCTとは阻害剤選択性が異なる点や、その基質選択性や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可能性が高いと考えられる。検討した基質の中には、vareniclineほか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が含まれており、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。腎臓では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ことも期待される。さらに、MCT9は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になり得ることが示唆された。本研究で申請者が解明した成果は、医薬品創製及び適正使用に貢献するものと期待される。以上を考慮し、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。