

氏 名 ふじい しのぶ 藤井 忍

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 201 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 角膜上皮及び血液眼関門を介したアニオン性及びカチオン性薬物の輸送機構
(Characterization of the Carrier-Mediated Influx and Efflux Transport for Anionic and Cationic Drugs across the Corneal Epithelium and the Blood-Ocular Barrier)

論文審査委員
(主査) 教授 藤 秀人
(副査) 教授 酒井 秀紀
(副査) 教授 細谷 健一 (指導教員)

論文内容の要旨

感染症やアレルギー、緑内障などの外眼部あるいは前眼部疾患の治療には、簡便で安全性の高い点眼剤が広く用いられる。点眼された薬物は、眼表面において涙液と混合・希釈されて大部分が鼻涙管から眼外に排出され、一部が主に角膜を通過して眼組織へと移行する。角膜は、上皮、ポーマン膜、実質、デスメ膜および内皮の5層から形成される厚さ約0.5 mmの透明な無血管組織であり、タイトジャンクションを形成する角膜上皮の最表層が、点眼された薬物の角膜透過過程における主要なバリアと考えられる。一般的に点眼された薬物は、角膜を受動拡散で透過し、薬物の脂溶性の指標であるオクタノール/緩衝液分配係数(LogD)が2~3のとき角膜透過性が最大となる。血管のない角膜組織は、涙液及び房水を介して栄養物供給や老廃物排出を行うため、種々の輸送担体が存在し、角膜上皮に存在する輸送担体が薬物の取り込みに関与することが明らかとなってきた。

糖尿病網膜症のような後眼部疾患治療の場合、点眼投与では標的組織である網膜まで薬物を到達させることが難しいため、侵襲性の高い硝子体内投与が選択される。侵襲性の低い経口投与によって、全身循環血から後眼部へと薬物を到達させるには、血液房水関門(BAB)及び血液網膜関門(BRB)がバリアとして機能し、薬物の透過を制限している。前眼部に存在するBABの本体は虹彩血管内皮細胞及び毛様体無色素上皮細胞に存在するタイトジャンクションであり、房水の産生及び透明性維持に重要な役割を果たしている。BRBは神経組織である網膜の至適環境を保つため、血液側から網膜側への物質の透過を制限し、タイトジャンクションを持つ網膜毛細血管内皮細胞(inner BRB)と網膜色素上皮細胞(outer BRB)から成る。両関門はタイトジャンクションによって、細胞間隙を介した非特異的な物質の移行を制限している。必要な物質のBAB及びBRB透過は、経細胞輸送によるため、様々な輸送担体の存在が確認されており、その中には薬物の取り込み(influx)及び排出に関与するものがある。

したがって、薬物の眼内動態が良好な眼科用剤の開発には、角膜上皮、BAB及びBRBにおける薬物透過機構の解明が重要である。本研究では、点眼剤、経口剤など眼科用剤の開発に繋がる知見を得るため、外眼部及び前眼部の薬物療法において重要となる角膜上皮での薬物透過特性を明らかにすること、及び後眼部での全身循環血を介した薬物治療において鍵となる、BAB及びBRBの薬物透過特性を評価することを目的とした。

1. 角膜上皮培養細胞を用いた ketoprofen の透過機構の解明¹⁾

眼科手術後の炎症治療には非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が汎用される。NSAIDsであるketoprofenは、カルボキシル基を1つ持つモノカルボン酸化合物で、pKa 4.2、LogD 1.34であることから、物理化学的には生体膜を透過しにくい。しかし、ketoprofenをウサギに点眼すると、虹彩・毛様体においてもプロスタグランジン合成を阻害するという報告があり、良好な角膜透過性を持つと推察される。KetoprofenがpH分配仮説に基づく受動拡散により膜を透過するだけでなく、何らかの輸送担体に認識されるためと考え、本研究では、ウサギ角膜上皮細胞(RCECs)及び摘出角膜を用い、ketoprofenの角膜上皮透過特性、特に取り込み過程における輸送担体の関与を明らかにすることを目的とした。

RCECsを用い、放射性同位元素標識ketoprofenの透過及び取り込みを評価した。ウサギ摘出角膜及びRCECsのいずれにおいてもketoprofenは、細胞間隙透過マーカーであるsucroseより7~10倍高い透過性を示し、角膜を経細胞的に透過すると考えられた。RCECsを用い、ketoprofenの取り込み特性について解析した結果、ketoprofenはpH、温度、エネルギー依存的にRCECsに取り込まれた。KetoprofenのRCECsへの取り込みをEadie-Scatchard plot

すると、二相性の濃度依存性があった。Michaelis-Menten 式を用い、非線形最小二乗法による解析を行ったところ、高親和性及び低親和性輸送過程の K_m 値は、それぞれ 0.559 mM 及び 23.8 mM であった。Ketoprofen の取り込みは、protonophore 及びモノカルボン酸トランスポーター (MCT) 阻害剤によって阻害され、20 mM モノカルボン酸系化合物によって減少したが、2 mM では変化がなかった。Organic anion transporter (oat) の基質や阻害剤、他の NSAIDs を 2 mM 以下の濃度で共存させると、ketoprofen の取り込みは減少した。さらに、MCT1 の基質である 20 mM benzoic acid は ketoprofen の低親和性の取り込み過程のみを阻害し、oat2 の基質である 1 mM indomethacin の共存によって高親和性の過程が完全に消失した。これまでに、ketoprofen が MCT1 及び oat2 の基質であり、RCECs には MCT1 が、ヒト角膜には OAT2 の存在が確認されている。以上の結果と、過去の報告を踏まえると、低親和性の輸送過程には MCT1 が関与し、高親和性の過程には oat2 が関わる可能性が高いと考えられた。

2. 血液眼関門を介した薬物輸送における P-glycoprotein の関与²⁾

P-Glycoprotein (P-gp) は、ATP を駆動力として様々な化合物の細胞外排出を行う膜タンパクである。これまでに、BRBにおけるP-gpの寄与は、血液脳関門 (BBB) よりも低いことが示唆されているが、その程度については明らかではない。BAB 及び BRB は、それぞれ 2 種類の細胞から形成され、P-gp の発現部位が複数あることから、in vivo でその寄与率を見積もることは難しい。そこで本研究では、P-gp をコードする遺伝子 *mdr1a* を knockout したラットを用いて、P-gp の基質である digoxin、quinidine 及び verapamil の BAB 及び BRB を介した房水及び網膜への取り込みを、BBB を介した脳への取り込みと比較するため、aqueous humor、retinal 及び brain uptake index (AHUI、RUI 及び BUI) を指標に解析した。さらに、integration plot 法を用い、*mdr1a* knockout ラット及び wild-type ラットにおける verapamil の房水、網膜及び脳への取り込みクリアランスから、P-gp 寄与率を評価した。

生体膜を受動拡散で透過する化合物群では、wild-type 及び *mdr1a* knockout ラットの組織取り込みに差はなく、RUI 及び BUI は脂溶性の増大とともに増加し、AHUI は脂溶性に関わらずほぼ一定の値を示した。Digoxin、quinidine 及び verapamil の房水及び脳への取り込みは、wild-type ラットに比べて *mdr1a* knockout ラットで高い値を示した。しかし、網膜への取り込みについてみると、digoxin は *mdr1a* knockout ラットで高い値を示したが、quinidine 及び verapamil では両ラットに差がなかった。さらに、両ラットの取り込みクリアランスから算出した verapamil の BRB 透過における P-gp 寄与率は 3% であり、同様に求めた BAB 及び BBB での P-gp 寄与率 (66% 及び 92%) に比べて、非常に小さいことが明らかとなった。つまり、quinidine 及び verapamil の BRB を介した透過には P-gp の影響が小さく、排出過程よりも取り込み過程の関与が大きいと考えられた。さらに、*mdr1a* knockout ラットを用いて P-gp 基質の組織取り込みに対する阻害剤の影響を評価した結果、digoxin、quinidine 及び verapamil の RUI 及び AHUI、並びに digoxin 及び quinidine の BUI は低下したが、verapamil の BUI は変化しなかった。したがって、BAB、BRB には digoxin、quinidine 及び verapamil を認識し influx 方向に働く輸送担体が存在し、verapamil を認識する influx トランスポーターの機能は、BRB と BBB で明確に異なることが示唆された。

3. 血液網膜関門における pravastatin の輸送機構の評価³⁾

スタチンには、血中コレステロールを低下させるだけでなく、血管内皮細胞に直接作用し血行動態を改善する作用がある。Pravastatin は臨床において他のスタチンで認められる中枢性の副作用がなく、糖尿病網膜症を改善すると報告されている。Pravastatin は、organic anion transporting polypeptide 1a4 (oatp1a4) の基質であり、oat3 にも認識される。Oatp1a4 及び oat3 はラット BRB 及び BBB に存在し、pravastatin は oatp1a4 及

び oat3 の両方に認識されてラット脳から排出されるとの報告があるが、BRB に関しては不明である。そこで、本研究では pravastatin の BRB における取り込み及び排出機構の解明を試みた。

Pravastatin の取り込み過程について検討した結果、RUI、BUI とともに、wild-type 及び mdr1a knockout ラットにおいて同程度の値を示し、生体膜を受動拡散によって透過する化合物群から求めた、脂溶性からの予想値よりも小さかった。Wild-type ラットを用いて網膜及び脳への取り込みに対する各種阻害剤の影響を検討したところ、pravastatin の RUI、BUI は、oatp1a4 の基質及び阻害剤により有意に低下した。したがって、pravastatin は P-gp に認識されないこと、BRB、BBB において取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能していること、pravastatin の取り込みには、少なくとも oatp1a4 が関与していることが示唆された。さらに pravastatin の BRB を介した排出機構について評価するため、ラット硝子体に投与した pravastatin の消失を microdialysis 法により解析した結果、pravastatin の消失速度定数は、bulk flow マーカーである D-mannitol の約 1.66 倍有意に高い値を示した。その消失の差は、oatp1a4 の基質である digoxin だけでなく、oat3 の阻害剤である benzylpenicillin によっても有意に低下したことから、pravastatin の BRB を介した消失には、oatp1a4 及び oat3 が関与していることが示唆された。したがって、pravastatin は BRB 及び BBB において、取り込み及び排出輸送担体に認識されて両方向に輸送されること、取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能していることがわかった。

結論

眼内の透明性を維持し眼内環境を一定に保つため、前眼部及び後眼部のバリアとして機能する角膜上皮及び BAB、BRB には、薬物を認識し、取り込み方向に働く輸送系があることが明らかとなった。さらに、P-gp の BRB での寄与率は BBB に比べ低い場合があること、化合物によっては、BRB、BBB とともに取り込み過程よりも排出過程が優位に働いていることが示された。本研究で得られた知見から、輸送担体を利用した眼科用剤の開発、特に BRB 及び BBB に存在する輸送担体の取り込みあるいは排出機能の差を利用することで、中枢性副作用を回避し、網膜、特に網膜内皮細胞をターゲットとした網膜疾患治療薬の開発に結び付くことが期待される。

参考文献

本要旨内容は、以下の論文にて公表した。

- 1) **Fujii S**, Hayashi H, Itoh K, Yamada S, Deguchi Y and Kawazu K. Characterization of the carrier-mediated transport of ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in rabbit corneal epithelium cells. **J Pharm Pharmacol**. 65: 171-180 (2013).
- 2) **Fujii S**, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Impact of P-glycoprotein on blood-retinal barrier permeability: Comparison of blood-aqueous humor and blood-brain barrier using mdr1a knockout rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 55: 4650-4658 (2014).
- 3) **Fujii S**, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Functional characterization of carrier-mediated transport of pravastatin across the blood-retinal barrier in rats. **Drug Metab Dispos**. 43: 1956-1959 (2015).

学位論文審査の要旨

外眼部・前眼部疾患の治療には、点眼剤が用いられ、点眼された薬物の一部が主に角膜を
通って眼組織へと移行する。角膜上皮の最表層がタイトジャンクションを形成し、点眼さ
れた薬物の角膜透過過程における主要なバリアとなっている。一般的に点眼された薬物は、
角膜を受動拡散で透過するが、角膜上皮に存在する輸送担体が薬物の取り込みに関与する
ことが明らかになってきた。後眼部疾患の治療において、全身循環血を介して後眼部へと
薬物を到達させるには、血液房水関門 (BAB) 及び血液網膜関門 (BRB) が持つタイトジ
ャンクションがバリアとなり、薬物の透過を制限している。両関門は、細胞間隙を介した
非特異的な物質の移行を制限し、必要な物質のみを経細胞輸送によって透過させるため、
様々な輸送担体を発現しており、その中には薬物の取り込み及び排出に関与するものがあ
る。本研究では、眼内動態が良好な眼科用剤の開発に役立つ知見を得るため、角膜上皮、
BAB 及び BRB における薬物輸送機構の解明を目的とした。本研究の内容の骨子及び審査
結果は次のとおりである。

ウサギ角膜上皮培養細胞 (RCECs) を用いた ketoprofen の透過機構の解明

Ketoprofen は、ウサギ摘出角膜及び RCECs において細胞間隙透過マーカーより 7~10
倍高い透過性を示し、角膜上皮を経細胞的に透過した。Ketoprofen は pH, 温度, エネル
ギー依存的に RCECs に取り込まれ、Eadie-Scatchard plot が二相性を示したことから、高
親和性及び低親和性輸送過程の存在が示唆された。モノカルボン酸トランスポーター
(MCT1) の基質である 20 mM benzoic acid は、ketoprofen の低親和性の取り込み過程の
みを阻害し、organic anion transporter (oat2) の基質である 1 mM indomethacin の共存
により高親和性の過程が完全に消失したことから、ketoprofen の RCECs への取り込み
には MCT1 と oat2 が関わる可能性が高いと考えられた。

血液眼関門を介した薬物輸送における P-glycoprotein (P-gp) の関与

P-gp をコードする遺伝子 *mdr1a* を knockout したラットを用い、P-gp の基質である
digoxin, quinidine 及び verapamil の BAB 及び BRB を介した房水及び網膜への取り込み
を、BBB を介した脳への取り込みと比較した。生体膜を受動拡散で透過する化合物群では、
両ラットの組織取り込みに差はなかった。Digoxin, quinidine 及び verapamil の房水及び
脳への取り込みは、wild-type ラットに比べて *mdr1a* knockout ラットで高い値を示した。
しかし、網膜への取り込みは、digoxin は *mdr1a* knockout ラットで高い値を示したが、

quinidine 及び verapamil では両ラットに差がなかった。両ラットの取り込みクリアランスから算出した verapamil の BRB 透過における P-gp 寄与率 (3%) は, BAB 及び BBB での P-gp 寄与率 (66%及び 92%) に比べて, 非常に小さかった。つまり, quinidine 及び verapamil の BRB を介した透過には P-gp の影響が小さく, 排出過程よりも取り込み過程の関与が大きいと考えられた。Mdr1a knockout ラットを用いて P-gp 基質の組織取り込みに対する阻害剤の影響を評価した結果, BAB, BRB には digoxin, quinidine 及び verapamil を認識し取り込み方向に働く輸送担体が存在し, verapamil を認識する取り込み側に働く輸送担体の機能は, BRB と BBB で明確に異なることが示唆された。

血液網膜関門における pravastatin の輸送機構解明

スタチンには, 血管内皮細胞に直接作用して血行動態を改善する作用があり, pravastatin は臨床において中枢性の副作用がなく, 糖尿病網膜症を改善する。Pravastatin は, organic anion transporting polypeptide 1a4 (oatp1a4) 及び oat3 に認識されてラット脳から排出されるが, BRB に関しては不明なことから, pravastatin の BRB における取り込み及び排出機構解明を目的とした。Wild-type 及び mdr1a knockout ラットを用いて pravastatin の網膜及び脳への取り込みを評価した結果, pravastatin は P-gp に認識されず, BRB, BBB において少なくとも oatp1a4 によって取り込まれるが, 取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能していることが示唆された。Pravastatin の BRB を介した排出機構については, BRB に発現する oatp1a4 及び oat3 が関与していることが示された。

以上申請者は, 標的組織への薬物移行性を改善する方法のひとつとして, 前眼部及び後眼部のバリアとして機能する角膜上皮, BAB 及び BRB に発現している輸送担体を利用することが可能であることを明らかとした。申請者が明らかとした角膜上皮, BAB 及び BRB における薬物輸送機構は, 眼科用剤を開発する上で有用な知見と判断される。

主査及び副査は, 藤井忍氏に面接試験を行うとともに論文内容について審査を行い, 博士 (薬科学) を授けるに値すると判定した。

- Fujii S, Hayashi H, Itoh K, Yamada S, Deguchi Y, Kawazu K. Characterization of the carrier-mediated transport of ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in rabbit corneal epithelium cells. **J Pharm Pharmacol.** 65: 171-180 (2013).
- Fujii S, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Impact of P-glycoprotein on blood retinal barrier permeability: Comparison of blood-aqueous humor and blood-brain barrier using mdr1a knockout rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 55: 4650-4658

(2014).

- Fujii S, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Functional characterization of carrier-mediated transport of pravastatin across the blood-retinal barrier in rats. **Drug Metab Dispos.** 43: 1956-1959 (2015).