

Ⅲ－3 Novel カチオン輸送担体分子実体の解明と 遺伝子デリバリー法確立

富山大学・大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 講師 久保義行

【研究の背景と目的】

血液網膜関門 (BRB) に発現する verapamil 認識性 novel カチオン性薬物輸送機構の分子実体の解明は、新規薬物送達技術を開発する上で極めて重要である。有機カチオン性薬物の組織関門透過は、主に solute carrier (SLC) ファミリーに属するインフラックストランスポーターによって担われると考えられている。しかし、これまでの当研究室における発現解析と輸送解析の結果から、BRB の有機カチオン性薬物透過機構に、未知の BRB 透過輸送担体分子が関与することが強く示唆される。

初年度の研究にて、カチオン性輸送担体に共通するモチーフ配列を有するものの基質認識性が明確ではない、SLC ファミリーと細菌類カチオントランスポーターホモログ、マラリア原虫カチオントランスポーターホモログについて BRB の一つである内側血液網膜関門 (inner BRB; 網膜毛細血管内皮細胞を実体とする) における発現解析と、発現分子の輸送解析を一部実施した。BRB は inner BRB だけではなく、網膜色素上皮 (RPE) 細胞を実体とする外側血液網膜関門 (outer BRB) によっても構成されており、網膜への物質供給に役割を果たすことが明らかにされている。従って、inner BRB と (もしくは) outer BRB において発現する novel カチオン輸送担体は、網膜への物質供給を担う輸送担体の候補となりうる。そこで、本研究では、novel カチオン性薬物輸送担体候補分子群の探索を inner BRB と outer BRB 両面について実施することで、BRB の有機カチオン性薬物透過機構を分子の観点から解明することを目的とした。

【実験手法】

(A) BRB モデル細胞の培養

In vitro inner BRB モデル細胞として、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2) 細胞を用いた。TR-iBRB2 細胞は立ち上げてから少なくとも 2 回継代し、細胞形態および増殖速度に大きな変化がないことを確認後、実験に用いた。

In vitro outer BRB モデル細胞として、ラット初代培養 RPE 細胞を用いた。ラットから眼球を摘出し、5% ポビドンヨード液にて消毒し、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 138 mM NaCl, 5.6 mM

D-glucose, 0.44 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.22 mM Phenol red) で洗浄後, 40 U/mL testicular hyaluronidase と20 U/mL collagenase, 0.1 % trypsin を含有した HBSS にてインキュベート (37°C, 50分) した。RPE 細胞を眼球から採取し, 遠心すること (1,200 × g, 4°C, 10分) で回収した。ペレットを20 % ウシ胎児血清と抗生物質を含有したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM): F12で再懸濁後, 37°Cインキュベーター (5 % CO₂/air) にて培養後, 実験に用いた。

(B) 細胞及び網膜からの total RNA の回収および RT-PCR 法による mRNA 発現解析

培養した細胞が dish 中にて90-100 % コンフルエントに達していることを確認し, RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用い, 各細胞の total RNA を調製した。ラット網膜 total RNA は, 6 週齢雄性 Wistar ラット眼球から網膜を単離し, TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を調製した。

それぞれの total RNA をサンプルとし, oligo dT primer と ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した。なお, ReverTra Ace 非含有サンプルも作成した (RT (-) サンプル)。それぞれの cDNA を用い, ExTaq[®] polymerase (Takara shuzo) を polymerase として PCR を行った。各標的分子特異的な primer を設計し, 反応条件は94°Cで2分 denature 処理後, 94°Cで30秒, 55°Cで30秒, 72°Cで1分のインキュベートを30-40サイクル行い, 増幅産物を得た。PCR 増幅産物に対して 1/10量の10×DNA loading buffer (0.25 % BPB, 0.25 % xylene cyanol FF 及び50 % glycerol) を加え, ethidium bromide を含んだ 2 % agarose gel [2 % agarose, 0.6 µg/mL ethidium bromide を含む TAE buffer (40 mM Tris base, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA)] に loading し, TAE buffer を泳動バッファーとして Mupid 21 ミニゲル泳動槽 (Cosmo Bio) を用い100 V で45分泳動を行った。バンドの検出は Bio Printer (Bio Craft) を用いて行った。増幅産物は pGEM-Teasy vector (Promega) に組み込んだ後に ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて, 増幅産物の配列を確認した。

(C) アフリカツメガエル卵母細胞発現系による標的分子の基質輸送機能解析

標的遺伝子 open reading frame を complementary RNA (cRNA) 合成に最適化された pGEM-HE plasmid のマルチクローニングサイトへ組み込んだ。cRNA は RiboMAX[™] Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いて合成した。雌性アフリカツメガエル (Kato-S-Science) から卵巣を摘出し, collagenase A (Roche) 処理後, 濾胞細胞を除去することで oocyte を得た。Oocyte は SOS buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.5) を用いて培養した。培養1日後に標的分子 cRNA をマイクロインジェクター (Narishige) にて23 nL 注入し, 4日間さらに培養することで, oocyte へ標的分子タンパク質を発現させた。

ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) に [³H]verapamil (American Radiolabeled Inc.) などの各種放射性標識薬物・化合物を0.1-0.2 µCi/200 µL となるように溶解させ, tracer buffer とした。ND96へ oocyte を移し, 37°Cで20分プレインキュベーションし,

tracer buffer 中でインキュベーションすることで (37°C) 取り込み実験を行った。指定時間経過後、oocyte を 4°C ND96 で 4 回洗浄し、5% sodium dodecyl sulfate にて可溶化させた。可溶化液に 3 mL Monofluor (National Diagnostics Inc.) を加え攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (LSC6101, Aloka) にて放射活性を測定した。

(D) データ解析

塩基配列は GENETYX®-SV/RC version 10 (GENETYX Co.) にて解析した。Oocyte への薬物輸送活性は、oocyte/medium ratio で表した (Eq. 1)。

$$\text{Oocyte/medium ratio } (\mu\text{L/oocyte}) = \frac{\text{Radioactivity per oocyte (dpm/oocyte)}}{\text{Radioactivity in the medium (dpm/\mu\text{L})}} \quad \dots[\text{Eq. 1}]$$

実験データは平均値 ± 標準誤差 (Mean ± S.E.M.) で表した。比較検定には 2 群間の比較の場合には、unpaired Student's *t*-test を用いて有意差を検定した。3 群間以上の場合には one-way analysis of variance (ANOVA) で分散分析を行い、Dunnett's Test もしくは Tukey's Multiple Comparisons Test によって多重比較を行った。

【結果・考察】

A. BRB モデルにおける novel カチオン性薬物輸送担体候補分子の発現

Inner BRB および outer BRB モデルにおける novel カチオン性薬物輸送担体候補分子 mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。SLC ファミリーとして 10 分子、大腸菌トランスポーターホモログ (EstT) として 12 分子について解析した結果、① Inner BRB と outer BRB 共に発現する分子、② Inner BRB にのみ発現する分子、そして③ Outer BRB にのみ発現する分子、の 3 つに分類される mRNA 発現プロフィールが得られた (Table 1)。

Table 1 mRNA expression profile of novel organic cation drug transporter candidates at the inner and outer BRB.

Molecules	① Expressed at the inner and outer BRB	② Expressed at the inner BRB	③ Expressed at the outer BRB
SLC family	6 molecules	1 molecule	0
EstT	7 molecules	2 molecules	2 molecules

B. Novel カチオン性薬物輸送担体候補分子の open reading frame 単離と発現系構築

発現が示された分子について、発現系構築を目的とし、open reading frame (ORF) 単離を試みた。Inner BRB および outer BRB それぞれを total RNA ソースとして PCR 法にて検討した結果、計 14 分子 (SLC ファミリーについて 5 分子、EstT について 9 分子) の ORF 単離に成功した。また、これら

ORF は現在アフリカツメガエル卵母細胞発現系構築用プラスミドである pGEM-HE のマルチクローニングサイトに組み込み、cRNA 合成に成功している。

C. 輸送対象化合物の選定

カチオン性薬物トランスポーターの多くは含窒素官能基を認識し化合物を輸送すると考えられている。Verapamil は「Tertiary amine」と「Nitrile」を含有する。今回単離したクローンについて、verapamil を含めたカチオン性薬物・化合物の認識性を解明することは、分子実体決定後の網膜への薬物デリバリー応用への重要な知見に繋がる。そこで、verapamil とは異なる構造化合物として「Primary amine」と「Secondary amine」を含む spermine を始めとして、構造的特徴が異なる7化合物を選定し (Table 2), アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送実験に供した。

Table 2 Test compound for transport study

Compound	Functional group
Verapamil	<ul style="list-style-type: none"> • Tertiary amine • Nitrile
Spermine	<ul style="list-style-type: none"> • Primary amine • Secondary amine • No aromatic ring
Compound A	<ul style="list-style-type: none"> • Tertiary amine • Pyridine
Compound B	<ul style="list-style-type: none"> • Pyridinium
Compound C	<ul style="list-style-type: none"> • Ammonium • No aromatic ring
Compound D	<ul style="list-style-type: none"> • Primary amine • Organic amido • Carboxyl group
Compound E	<ul style="list-style-type: none"> • Amine (-) • No aromatic ring • Sulfate

D. 候補分子発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いた化合物輸送解析

アフリカツメガエル卵母細胞へ候補分子 cRNA を microinjection することで、候補分子を卵母細胞に発現させ、C. に記載した薬物・化合物の輸送評価した。過去にヒトホモログにおいて spermine などのポリアミン指向性を有する分子である SLC ファミリー分子 (Slc12a8) について [³H]spermine 輸送活性が示された (Fig. 1)。それ以外の分子について、各種化合物の輸送機構について評価した結果、各分子の特徴として Table 3 に示すような特徴が示された。また、この特徴から導き出される、「Verapamil 輸送候補分子」は SLC ファミリーに属する分子として 1 分子、EstT として 6 分子見出された。

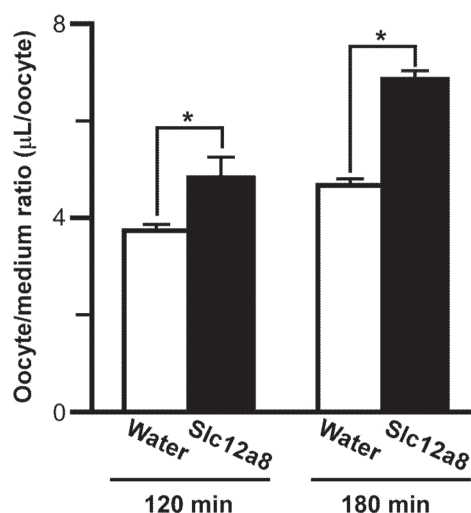


Figure 1 [³H]Spermine uptake by Slc12a8-expressing oocytes.

Uptake experiment was performed at 20 °C for 120 min and 180 min. Each column represents the mean ± S.E.M. (n=7-10). **p*<0.01, significant difference.

Table 3 Summary of transport study using candidate-expressing oocytes

Family	Molecule	Character
SLC family	Slc12a8	● 2級アミン指向性。
	Molecule A	● 2級アミンと脂肪族4級アンモニウム指向性。
	Molecule B	● 1-2級アミンと4級アンモニウム指向性。
	Molecule C	● 2-3級アミン指向性。
	Molecule D	● 芳香族4級アンモニウム指向性。
EstT	Molecule a	● 2級アミンと芳香族4級アンモニウム指向性。 ● 3級アミン認識性は低い。
	Molecule b	● 芳香族4級アンモニウム指向性。
	Molecule c	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性は低い。
	Molecule d	● 1-2級アミンと4級アンモニウム指向性。 ● アニオン性化合物指向性。
	Molecule e	● 4級アンモニウム指向性。
	Molecule f	● 3級アミン指向性。 ● 芳香族4級アンモニウム指向性。
	Molecule g	● 1-2級アミンと芳香族4級アンモニウム指向性を有する。 ● 3級アミン指向性は低い。
	Molecule h	● アニオン性化合物指向性。 ● アミン認識性は低い。
	Molecule i	● 1級アミン指向性。 ● 3級アミン認識性は低い。 (3級アミンが複数あると認識するという可能性はある)

【結論および展望】

本年度の解析から、BRBに存在する verapamil 認識型 novel 有機カチオン性輸送担体候補として、7分子見出された。アフリカツメガエル卵母細胞は両生類の細胞であることから、その分子を介した薬物輸送について、ほ乳類においてどのような様式であるか解析することで、「循環血液中に存在する薬物の網膜への移行に関与する」ことが明らかになると期待される。現在、cRNA合成用プラスミドに組み込んでいる候補分子 ORF について、ほ乳類細胞への発現系構築用のプラスミドである pcDNA4 プラスミドへの組み換えを行っており、次年度は本プラスミドを用いた発現系構築を試みる。Verapamil 輸送について、BRBを介し循環血液中から網膜への移行に関与すると考えられた分子について、RNA干渉法によってその寄与を評価する。その分子の寄与が示された場合は、本課題最終目標である「標的分子に対する抗体を用いたターゲティング法」を確立するため、候補分子を標的とした抗体作成に着手する予定である。