

氏名	たかはし ゆう 高橋 優
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲 第 5037 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	組織関門における L-type amino acid transporter 1 を介した pregabalin 輸送
論文審査委員	(主査) 登美 齊俊 教授 (博士(薬学)) (副査) 三澤 日出巳 教授 (博士(薬学)) 堀 里子 教授 (博士(薬学))

論文内容の要旨

【背景】

脳および胎児への物質移行は、それぞれ脳毛細血管内皮細胞を実体とする血液脳関門および合胞体栄養膜細胞を実体とする胎盤関門により制御される。組織関門は、必要な栄養素を選択的に取り込み、老廃物や有害物質は排出する。物質の脳および胎児移行性を理解する上で、組織関門透過機構の解明は重要である。脳および胎児にとって、神経伝達物質やタンパク質合成の原料となる中性アミノ酸は必須な栄養素であり、組織関門に発現する中性アミノ酸トランスポーターを介して供給される。中性アミノ酸トランスポーターのうち、L-type amino acid transporter (LAT) 1/SLC7A5 は、アミノ酸アナログであるパーキンソン治療薬 L-dopa や抗てんかん薬 gabapentin を Na⁺非依存的に輸送し、薬物トランスポーターとして組織薬物曝露にも関与する。アミノ酸トランスポーター同士は基質認識性が一部重複することから、LAT1 以外の中性アミノ酸トランスポーターも、アミノ酸アナログの薬物輸送機能を持つ可能性があるが、研究はほとんど進んでいない。

血液脳関門には、中性アミノ酸トランスポーターとして LAT1 および sodium-coupled neutral amino acid transporter (SNAT) 2/SLC38A2 が発現している。LAT1 は脳毛細血管内皮細胞脳側および血液側細胞膜に、SNAT2 は脳側細胞膜に局在する。胎盤関門では、合胞体栄養膜細胞母体側の刷子縁膜に LAT1、LAT2/SLC7A8、SNAT1/SLC38A1、SNAT2 および SNAT4/SLC38A4 が、胎児側の基底細胞膜には LAT3/SLC43A1 および LAT4/SLC43A2 がそれぞれ局在することが報告されている。組織への薬物移行には、まず血液中から組織関門に取り込まれるかが第 1 ステップであり、脳および胎児への薬物移行機構を理解する上で、特に脳血液側細胞膜および胎盤刷子縁膜に発現する LAT1、LAT2、SNAT1、SNAT2 および SNAT4 のアナログ薬物に対する基質認識性を明らかにすることは重要である。

本研究では、組織関門に発現する LAT および SNAT を介した薬物組織移行性を解明

するにあたり、脳および胎児で薬効や副作用を示しながらも、その組織移行機構が不明なアミノ酸アナログ薬物 **pregabalin** および **vigabatrin** に着目した。**Gabapentin** も含めたこれら 3 薬は、 γ アミノ酸アナログに分類される。**Caco-2** 細胞による **pregabalin** 取り込みが **gabapentin** で有意に阻害されたことから、**pregabalin** は **LAT1** で輸送される可能性が高い。また **Caco-2** 細胞による **vigabatrin** 取り込みが **SNAT** の基質である α -methylaminoisobutyric acid によって有意に阻害されたことから、**vigabatrin** は **SNAT** で輸送される可能性がある。**Gabapentin**、**pregabalin** および **vigabatrin** は全て抗てんかん薬であり、中枢で薬効を発揮しながら、めまいなどの中枢系副作用も引き起こす。また、妊婦服用時には胎児成長に影響を及ぼす可能性を示唆する報告がある。これら 3 薬はいずれも親水性化合物であることから、組織関門の透過にはトランスポーターの関与が示唆される。抗てんかん薬の薬効および副作用発現機構を理解する上で、その組織移行性に関与する分子の同定は重要である。

LAT1 は大型中性アミノ酸に対する親和性($K_m \approx 10 \sim 50 \mu\text{M}$)が高く、血漿中アミノ酸濃度は K_m より高い。そのため、生体内では **LAT1** を介した輸送は飽和しており、アミノ酸濃度変動に影響を受ける可能性がある。例えば血中アミノ酸濃度は、高たんぱく食や分岐鎖アミノ酸(**BCAA**)サプリメントの摂取で大幅に増加するが、アミノ酸濃度の上昇によって **LAT1** を介したアナログ薬物輸送が減少し、薬効または副作用発現強度が変動する可能性がある。そのため、薬物動態的観点から薬効の最大化や副作用の軽減を見込んだ薬の適正使用法を提案するには、アミノ酸トランスポーターを介したアナログ薬物輸送と生体内基質の相互作用を解析することが重要である。

【目的】

本研究では、アミノ酸アナログ薬物の組織移行に果たす中性アミノ酸トランスポーターの役割を解明することを目的とし、以下の解析を行った。第 1 に、胎盤関門刷子縁膜において中性アミノ酸輸送に関与可能な **LAT** および **SNAT** を同定するため、各々のタンパク絶対発現量を定量した。第 2 に、組織関門に発現する **LAT** および **SNAT** について、**gabapentin**、**pregabalin** および **vigabatrin** を対象とした輸送活性スクリーニングを行った。第 3 に、**LAT1** 新規基質として見出された **pregabalin** について、脳移行性に果たす **LAT1** の役割と、それに対する内因性基質濃度変動の影響を解析した。

【方法】

ヒト妊娠満期胎盤およびラット妊娠 19.5 日目胎盤絨毛膜画分より調製した刷子縁膜における、**LAT** および **SNAT** のタンパク絶対発現量を定量的標的絶対プロテオミクスにより定量した。**LAT** および **SNAT** 発現 **HEK293** 細胞を用いて、**gabapentin**、**pregabalin** および **vigabatrin** のアミノ酸輸送に対する阻害効果および輸送活性を解析した。ヒト脳毛細血管内皮細胞の *in vitro* モデルである **hCMEC/D3** 細胞を用いて、

pregabalin の輸送特性を解析した。7 週齢雄 SD ラットに saline または BCAA/saline (Ile:Leu:Val = 100:200:100 mg/kg) を腹腔内投与し、その 60 分後に 30 mM pregabalin を大腿静脈より急速投与した。その 5.5 分後における脳/血漿間薬物濃度比($K_{p,brain}$)から pregabalin 脳移行性を評価した。Gabapentin、pregabalin および vigabatrin の細胞、脳および血漿中濃度は LC-MS/MS により定量した。なお、本研究は本学の薬学部研究倫理委員会(150421-2、171222-2、180427-4)および医学部倫理委員会(2011-250-2)に研究計画書を提出し、その内容が承認されたものである。

【結果】

1. 胎盤関門における LAT および SNAT タンパク絶対発現量プロファイル

ヒト満期胎盤およびラット妊娠 19.5 日目胎盤より精製した刷子縁膜を用いて、定量的標的絶対プロテオミクスにより LAT1、LAT2、SNAT1、SNAT2 および SNAT4 のタンパク発現量を測定した。ヒト刷子縁膜における LAT1、LAT2、SNAT1 および SNAT2 の発現量は、それぞれ 2.4、3.4、0.50 および 0.60 fmol/ μ g-protein であった。ヒト SNAT4 については、測定した 4 つの胎盤サンプルのうち、2 サンプルで定量下限(0.21 fmol/ μ g-protein)を下回り、測定できた 2 サンプルにおける発現量はそれぞれ 0.22 および 0.27 fmol/ μ g-protein であった。ラット刷子縁膜における LAT1、LAT2、SNAT1、SNAT2 および SNAT4 の発現量は、それぞれ 8.3、0.95、1.7、3.2 および 6.0 fmol/ μ g-protein であった。ヒトおよびラット胎盤刷子縁膜において、5 種類の LAT および SNAT のタンパク発現が示され、これらは、母体から胎児への中性アミノ酸供給に関与可能である。

2. 中性アミノ酸トランスポーターを対象としたアミノ酸アナログ薬物の輸送活性スクリーニング

組織関門におけるタンパク発現が見出された LAT1、LAT2、SNAT1、SNAT2 および SNAT4 について、アナログ薬物 gabapentin、pregabalin および vigabatrin を対象とした輸送活性スクリーニングを行った。まず、LAT および SNAT 発現細胞を用いて、基質アミノ酸取り込みに対する各薬物の阻害効果を検討した。1-5 mM gabapentin 添加により LAT1 および SNAT4 が、1-5 mM pregabalin 添加により LAT1、SNAT2 および SNAT4 が、5 mM vigabatrin 添加によって SNAT4 が、それぞれ有意に阻害された。薬物添加時に阻害効果が示されたトランスポーターは、少なからずその薬物に対して親和性を有すると考え、その薬物を各トランスポーターの基質候補とした。ただし gabapentin が LAT1 の基質となることは既知であり、候補から除外した。

薬物による阻害効果が示された SNAT2、SNAT4 および LAT1 について、各 10 μ M における薬物取り込み実験を行った。SNAT2 発現細胞による pregabalin 取り込み、SNAT4 発現細胞による vigabatrin、pregabalin、および gabapentin 取り込みは、全て mock 細胞による取り込みと同程度か、または有意に低かった。したがって、SNAT2

および SNAT4 は、vigabatrin、pregabalin、および gabapentin を基質認識する可能性は低い。一方、LAT1 発現細胞における pregabalin 取り込みは、mock 細胞による取り込みと比較して有意に高く、LAT1 が基質認識することが示された。LAT1 を介した pregabalin 輸送の K_m 値は、288 μM であった。

3. 血液脳関門における LAT1 を介した pregabalin 脳移行性解析

ヒト血液脳関門における pregabalin 輸送を担うトランスポーターを同定するため、ヒト脳毛細血管内皮細胞モデル hCMEC/D3 細胞を用いた pregabalin 輸送実験を行った。hCMEC/D3 細胞における pregabalin 取り込みは、 Na^+ 非依存的に 5 分まで継時的に上昇し、その K_m 値は 854 μM であった。Pregabalin 取り込みは、system L の典型的基質および阻害剤である 1 mM Leu、1 mM His、1 mM BCH 添加でほぼ完全に阻害された。さらに LAT1 選択的阻害剤である 10 μM JPH203 添加によってもほぼ完全に阻害され、hCMEC/D3 細胞における pregabalin 取り込みに LAT1 が関与することが示唆された。血液脳関門における pregabalin 取り込みに果たす LAT1 の寄与を評価するため、LAT1 ノックダウン hCMEC/D3 細胞を作成した。LAT1 siRNA 導入により、LAT1 mRNA 発現は非導入群と比較して 80%以上減少し、pregabalin 取り込みにおいても非導入群と比較して 75%減少した。以上の結果より、hCMEC/D3 細胞における pregabalin 取り込みには LAT1 の寄与が大きいことが示された。

ラットへの BCAA 腹腔内投与(BCAA 投与群)により、血漿中 BCAA 濃度は有意に上昇した。Pregabalin の脳/血漿間薬物濃度比($K_{p,\text{brain}}$)を用いて脳移行性を評価したところ、BCAA 投与群の $K_{p,\text{brain}}$ は sham 群と比較して有意に低く、pregabalin 脳移行性は血漿中 LAT1 基質濃度の変動の影響を受けることが示された。

【考察】

ヒトおよびラット胎盤関門の実体である合胞体栄養膜細胞の刷子縁膜において LAT1、LAT2、SNAT1、SNAT2 および SNAT4 タンパク質が定量できた。先行研究では、ヒトおよびラット血液脳関門脳毛細血管における LAT1 のタンパク発現が定量されている。したがって、これら 5 つのトランスポーターが、脳または胎児への中性アミノ酸分布に関与可能である。本研究では、このうち LAT1 のみがアナログ薬物 pregabalin を基質認識することを明らかにした。

ヒト脳毛細血管内皮細胞 in vitro モデルである hCMEC/D3 細胞における pregabalin 輸送特性は、LAT1 のものとよく一致した。さらに、LAT1 選択的阻害剤添加および LAT1 ノックダウンにより、有意に pregabalin 輸送活性が低下したことから、脳毛細血管内皮細胞への pregabalin 取り込みには LAT1 の寄与が大きいことが示された。

Pregabalin 脳移行性評価実験より、sham 群における $K_{p,\text{brain}}$ は 0.032 mL/g-brain であった。この値はラット脳血漿体積(0.015 mL/g-brain)よりも高く、pregabalin が脳内へ移行したことが示唆される。一方、BCAA 投与群における $K_{p,\text{brain}}$ は 0.021

mL/g-brain であった。BCAA 投与に伴う LAT1 を介した pregabalin 輸送活性の変動を、LAT1 基質である大型中性アミノ酸 8 種類(Phe, Leu, Ile, Trp, Tyr, His, Val および Met) の LAT1 への親和性(K_m)と血漿中濃度($C_{pl,sham}$ または $C_{pl,bcaa}$)から以下の式を用いて予測した; 輸送活性(%)= $100 \times 1 / [1 + \sum (C_{pl,sham}$ または $C_{pl,bcaa} / K_m)]$ 。その結果、競合するアミノ酸が存在しない場合の LAT1 を介した pregabalin 輸送活性を 100%とすると、sham 群での輸送活性は 4.0%、BCAA 投与群では 2.4%と見積もられた。したがって、LAT1 輸送活性は理論上 41%低下すると計算され、BCAA 投与により pregabalin 脳移行性が低下したと合致した。以上より、血液脳関門を介した pregabalin 脳移行には、LAT1 が関与し、血漿中大型中性アミノ酸濃度変動の影響を受けることが示唆された。ヒトにおいても高たんぱく食の摂取が、大型中性アミノ酸の血漿中濃度を約 1.5 倍上昇させることが報告されている。この場合の LAT1 輸送活性は、先述の式より 2.9% から 1.9%にまで減少すると見積もられる。したがって、LAT1 を介した pregabalin 脳移行性は、食事の影響を受ける可能性がある。Pregabalin 経口単回投与時における浮動性めまいの発生率は、絶食時服用に比べて食後服用の方が低い。Pregabalin の副作用発現部位は脳であることから、食事中のアミノ酸によって血液脳関門における LAT1 が飽和し、pregabalin 脳移行性が制限された可能性がある。よって、脳内 pregabalin 濃度の急激な変動を避けるには、食後服用の方が望ましいと考える。

ラットを用いた pregabalin 脳移行性評価の結果より、LAT1 は pregabalin の血液から脳への取り込みに寄与することが示唆された。LAT1 は、脳毛細血管の両側細胞膜に発現することから、pregabalin の脳からの排出にも関与する可能性が高い。大型中性アミノ酸の脳間質液中濃度は、血漿中濃度よりも顕著に低い。そのため、LAT1 のタンパク発現量が脳毛細血管の細胞膜両側で大きく変わらないとするならば、LAT1 を介した pregabalin の脳からの流出クリアランス(CL_{out})は、脳への流入クリアランス(CL_{in})よりも大きいと考えられる。実際に、先行研究におけるラット脳微小透析解析において、定常状態における CL_{out} と CL_{in} の比である脳/血漿間非結合型薬物分配係数($K_{p,uu,brain}$)は、pregabalin で 0.10 と報告されており、 CL_{out} は CL_{in} よりも 10 倍大きい。

LAT1 は、血液脳関門だけでなく、胎盤関門刷子縁膜においても発現している。妊婦による pregabalin 服用は胎児出生不全リスクを上昇させるとの報告があり、胎盤関門に発現する LAT1 が一部寄与している可能性がある。また LAT1 は、脊髄にも発現している。Pregabalin は神経障害性疼痛治療薬として、脊髄後角における鎮痛作用も示す。脊髄への薬物移行は、脊髄血管内皮細胞を実体とする血液脊髄関門によって制御されることから、血液脊髄関門における pregabalin 透過に LAT1 が関与する可能性がある。胎児および脊髄における副作用/薬効発現機序を理解する上で、その各組織関門における pregabalin 移行に果たす LAT1 の役割を解明することは重要であり、今後の課題である。

【結論】

本研究により、LAT1 の新規基質薬物として pregabalin を見出した。LAT1 は、脳、胎盤、脊髄等の組織関門に発現しているため、それら組織への pregabalin 移行に関与する可能性が高い。本研究ではさらに、血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞への pregabalin 取り込みに LAT1 が大きく寄与することを明らかにし、pregabalin 脳移行における LAT1 の関与を示唆する結果を得た。Pregabalin の脳移行性に関与する分子の同定は、その薬効および副作用発現機構の解明に繋がる重要な知見である。また、本研究では、LAT1 基質アミノ酸の血漿中濃度上昇に伴う pregabalin 脳移行性の低下も明らかにした。食事やサプリメント摂取によって血漿中アミノ酸濃度は変動するため、これらが pregabalin 脳移行性および薬効/副作用発現強度に影響する可能性がある。これらは、pregabalin の安全かつ有効な使用法の提案につながる有益なエビデンスである。

論文審査結果の要旨

中性アミノ酸アナログ薬物である pregabalin は、脳において薬効や副作用を発現する。また、妊婦が pregabalin を服用した場合には、胎児成長への影響が懸念されている。しかし、pregabalin の脳および胎児移行機構は不明であった。組織関門で保護される脳や胎児への薬物移行を理解する上で、トランスポーターの基質認識に基づいた組織関門透過機構の解明は重要である。

本研究の第一の意義は、アミノ酸トランスポーターのような、内因性基質選択性が高い栄養素のトランスポーターを介した薬物輸送を明らかにしたことである。薬物トランスポーターとして既知である、有機イオントランスポーターや ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターによる基質認識性だけでは、pregabalin の体内動態は説明できないため、さらなる薬物トランスポーターの同定が課題であった。本研究を通じて、中性アミノ酸トランスポーターLAT および SNAT の 5 サブタイプのうち、LAT1 を介したアミノ酸アナログ薬物 pregabalin の基質認識を明らかにした。これにより、血液脳関門および胎盤関門に発現する LAT1 が、脳および胎児への pregabalin 移行に関与する可能性を提示することができた。今後アミノ酸アナログ薬物の動態を理解する際には、既知の薬物トランスポーターに加え、アミノ酸トランスポーターの基質認識性に基づいた解析が肝要であると考えられる。

本研究の第二の意義は、pregabalin の脳移行に関与する輸送分子を同定したことである。血液脳関門の実体である脳毛細血管における LAT1 を介した pregabalin 輸送を明らかにした本研究は、pregabalin の薬効および副作用発現機構解明の端緒となる重要な知見である。さらに申請者は、LAT1 を介した薬物輸送クリアランスが、血漿中 LAT1 基質アミノ酸濃度変動に影響されやすいことを見出した。生体内アミノ酸濃度は

アミノ酸サプリメントや医薬品の服用、一部の疾患によって変動することが報告されている。今後の臨床的発展として、サプリメントや医薬品と pregabalin の併用による薬物相互作用や、疾患による pregabalin 脳移行性への影響を明らかにすることで、薬物動態の観点から pregabalin のより安全かつ有効な使用法の提案が期待される。

博士論文発表会においては、自らの研究に関する周辺知識および研究成果を明快に説明していた。また、自らの研究成果について深く洞察した上で導かれた自身の見解を明確に示していた。試問においても申請者の応答は概ね妥当であった。

以上より、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値のあるものと認める。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

Y Takahashi, T Nishimura, K Higuchi, S Noguchi, Y Tega, T Kurosawa, Y Deguchi, M Tomi: Transport of pregabalin via L-type amino acid transporter 1 (SLC7A5) in human brain capillary endothelial cell line, *Pharm Res*, 35:246 (2018)

【参考論文】

Y Takahashi, T Nishimura, T Maruyama, M Tomi, E Nakashima: Contributions of system A subtypes to α -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat, *Amino acids* 49:795–803 (2017)

T Nishimura, R Yagi, M Usuda, K Oda, M Yamazaki, S Suda, Y Takahashi, F Okazaki, Y Sai, K Higuchi, T Maruyama, M Tomi, E Nakashima: System A amino acid transporter SNAT2 shows subtype-specific affinity for betaine and hyperosmotic inducibility in placental trophoblasts, *Biochim Biophys Acta*, 1838:1306–1312 (2014)