

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	明石 知也
主論文題名： 神経障害性疼痛治療薬の血液脊髄関門透過機構とその薬効発現に与える影響			
(内容の要旨) 【背景】 脊髄血管内皮細胞は細胞間で密着結合することで blood-spinal cord barrier (BSCB, 血液脊髄関門)を形成し、血液から物質の移行を制限する。また、細胞膜上にトランスポーターを発現し組織内に必要な栄養素を選択的に取り込み、組織外へ老廃物や有害物質を排出する機能を持つ。脊髄を標的とする薬物にとって、BSCB 透過機構を明らかとすることは、その薬効を発揮する過程や条件を理解するために不可欠である。 脊髄を標的臓器とする医薬品として、末梢性神経障害性疼痛治療薬として用いられる $\alpha\delta$ リガンド (ガバペンチノイド) が挙げられる。ガバペンチノイドは、脊髄後角における一次求心性神経終末における電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha\delta$ サブユニットに特異的に結合する。ガバペンチノイドの結合によりカルシウムイオンの流入を抑制し、興奮性神経伝達物質の過剰放出を抑制することで、疼痛抑制効果を発揮する。よって、ガバペンチノイドは、標的である脊髄後角におけるシナプスにて作用を発揮するためには、血液から BSCB を通過し脊髄組織へ移行する必要がある。現在、末梢神経障害性疼痛に使用されているガバペンチノイドとして、pregabalin (商品名：リリカ) の他に、2019年に承認された mirogabalin (商品名：タリージェ) が挙げられる (図1)。Pregabalin 及び mirogabalin の pH7.4 における LogD はそれぞれ-1.35 及び-1.28 と親水性が高いため、BSCB 透過のためにはトランスポーターを介した移行機構が必要である。血液脳関門 (BBB) ヒト脳微小血管内皮細胞 hCMEC/D3 細胞において pregabalin は LAT1 により輸送されることが報告されている。また、pregabalin は OCTN1 の基質でもあり、小腸からの吸収において OCTN1 の寄与があることが報告されている。Mirogabalin については、PEPT1、PEPT2、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質であること、LAT1 非基質であることが報告されている。しかしながら、BSCB における両化合物の輸送機構は未だ不明である。BSCB においてガバペンチノイド輸送を担うトランスポーターの情報、薬効に直結する因子であるため、基質認識性を明らかにする研究が必要である。 基質薬物との併用投与や内因性基質の濃度上昇により BSCB におけるトランスポーターが飽和した場合、ガバペンチノイドの脊髄移行性が変動を受ける可能性がある。Pregabalin の脳移行性は、LAT1 基質である分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の血漿中濃度上昇により低下することが報告されている。これは、BCAA の血漿中濃度は LAT1 基質親和性 (K_m) よりも高いため輸送が飽和しており、BCAA の血漿中濃度変動により LAT1 残存活性が変化することによる。Pregabalin は BSCB においても LAT1 の影響を受ける可能性がある一方、mirogabalin の中枢移行に関する情報はない。Pregabalin 及び mirogabalin を服用する患者は薬効及び中枢性副作用をモニターし、患者毎に適切な用量を設定する必要がある。抗末梢性神経障害性疼痛の標的としての脊髄への移行に関して、併用薬投与や内因性基質の変動が pregabalin 及び mirogabalin の脊髄移行及び薬効に及ぼす影響を評価することは、薬物動態的視点から薬効の最大化を提案するための重要な知見となる。 【目的】 本研究では、末梢性神経障害性疼痛治療薬 pregabalin 及び mirogabalin の BSCB 透過に果たすトランスポーターの役割と、それらが薬効に与える影響を解明することを目的とし、以下の解析を行った。第1に、BBB モデル細胞株を用いて mirogabalin トランスポーターの同定を行った。第2に、pregabalin 及び mirogabalin の BSCB を介した脊髄移行において、トランスポーター阻害が与える影響を <i>in vivo</i> 及び脊髄血管内皮初代培養細胞を用いた <i>in vitro</i> 実験系で評価した。第3に、BSCB におけるトランスポーター阻害が pregabalin 及び mirogabalin の薬効に与える影響を評価した。			

【方法】

Mirogabalin を輸送するトランスポーターのスクリーニングのため、ラット脳微小血管内皮細胞 TR-BBB13 細胞及びヒト脳微小血管内皮細胞 hCMEC/D3 細胞における mirogabalin 輸送を評価した。次に、トランスポーターの一過性発現 HEK293 細胞における mirogabalin の輸送特性を解析した。BSCB において pregabalin あるいは mirogabalin を輸送する候補トランスポーターの基質を7週齢雄 SD ラットに腹腔内投与し、血漿中濃度を上昇させてトランスポーター活性を低下させた状態において、pregabalin 及び mirogabalin 静脈内投与5.5分後の見かけの脊髄/血漿濃度比 ($V_{d,spinal\ cord}$) を評価した。ラット脊髄を単離し、puromycin 添加培地で培養することで脊髄血管内皮初代培養細胞を調製し、pregabalin 及び mirogabalin の輸送特性を解析した。また、トランスポーター活性が低下した条件における pregabalin 及び mirogabalin 静脈投与時の鎮痛効果を、oxaliplatin 誘発ラット cold allodynia モデルを用いて tail immersion test により評価した。

【結果】

1. BBB モデル細胞を用いた mirogabalin を輸送するトランスポーターの同定

現在、BSCB モデルとして汎用される細胞株は存在しないために、BSCB 機能評価の障壁が高い。そこで、まず BBB モデルとして使用される TR-BBB13 細胞及び hCMEC/D3 細胞を用いて、mirogabalin を輸送するトランスポーターの同定を行った。両細胞における mirogabalin 取り込みは 10 mM mirogabalin 添加によって有意に低下したことから、担体介在性の輸送系の関与が示された。TR-BBB13 細胞における mirogabalin 取り込みは、OCTN2 阻害剤である 1 mM pyrilamine、1 mM verapamil、1 mM quinidine、及び 1 mM L-carnitine を添加することにより有意に減少した。hCMEC/D3 細胞における mirogabalin 取り込みは OCTN2 阻害剤である 1 mM L-carnitine にて有意に減少し、hOCTN2 siRNA 導入により OCTN2 mRNA 発現が 52%減少した条件において、mirogabalin 取り込みは有意に 36%減少した (図2)。以上の結果より、TR-BBB13 細胞及び hCMEC/D3 細胞における pregabalin 取り込みに OCTN2 の寄与が示された。

OCTN2 強制発現 HEK293 細胞における d3-L-carnitine 取り込みは、10 mM mirogabalin 添加により有意に低下した。OCTN2 強制発現 HEK293 細胞における mirogabalin 取り込みは、非発現 mock 細胞に対して有意に増加した。また、その取り込みは Na^+ 依存的であった。以上より、mirogabalin は OCTN2 基質であることが示された。

2. ラット BSCB における pregabalin および mirogabalin 透過機構の解明

ラットにおける pregabalin の $V_{d,spinal\ cord}$ が BSCB における LAT1 の輸送活性の影響を受けるかを検証した。LAT1 基質である BCAA (Leucine: Isoleucine: Valine = 100 : 200 : 100 mg/kg) を腹腔内投与したところ、投与 60 分後に血漿中濃度が 2.9-3.9 倍に上昇した。この条件において、LAT1 基質である 8 アミノ酸の血漿中濃度 C_p (Phe、Leu、Ile、Trp、Tyr、His、Val、及び Met) から LAT1 残存活性を以下の式を用いて算出した; $LAT1\ 残存活性(\%) = 100 \times 1 / [1 + \sum(C_p / K_m)]$ 。その結果、競合するアミノ酸が存在しない場合を 100% とすると、LAT1 残存活性は BCAA 投与無しの場合 4.2%、投与有りの場合 2.4% であり、BCAA 投与によって 42% 低下することが予想された。この BCAA 投与条件における pregabalin の投与後 5.5 分における $V_{d,spinal\ cord}$ は、57% 有意に減少した (図3)。さらに、ラット脊髄血管内皮初代培養細胞における pregabalin 取り込みは LAT1 阻害薬である L-leucine、BCH、及び JPH203 により有意に低下した。よって、pregabalin は BSCB に発現する LAT1 を介して脊髄に移行することが示唆された。

Mirogabalin の脊髄移行において OCTN2 が関与する可能性が考えられたため、OCTN2 基質である L-carnitine の血漿中濃度の変動が与える変動を評価した。50 mg/kg の L-carnitine を腹腔内投与することで OCTN2 の基質である L-carnitine 及び acetyl-L-carnitine の血漿中濃度はそれぞれ 12 倍及び 7.7 倍に上昇した。LAT1 残存活性と同様に OCTN2 残存活性を算出すると、OCTN2 残存活性は 90% 低下すると予測された。しかし、OCTN2 残存活性が低下した条件においても、mirogabalin の投与後 5.5 分における $V_{d,spinal\ cord}$ の低下は認められなかった。また、pregabalin の $V_{d,spinal\ cord}$ が低下した血漿中 BCAA 濃度上昇条件においても、mirogabalin の $V_{d,spinal\ cord}$ は低下しなかった。以上より、今回の実験条件下において、mirogabalin の脊髄移行に OCTN2 及び LAT1 の寄与は検出されなかった。ラット脊髄血管内皮初代培養細胞における mirogabalin 取り込み活性は、10 mM mirogabalin 添加時に低下した一方、OCTN2 阻害剤 L-carnitine 及び LAT1 阻害剤 BCH で阻害されなかった (図4)。以上から mirogabalin の脊髄移行に OCTN2 及び LAT1 活性低下による

影響は観察されず、他のトランスポーターが関与する可能性がある。

Pregabalin および mirogabalin の疼痛抑制効果に対する BCAA の影響

LAT1 基質である pregabalin と非基質である mirogabalin の脊髄移行性及び鎮痛効果に対して、血漿 BCAA 濃度上昇が両化合物の薬効に影響を与えるかを検証した。Oxaliplatin 誘発 cold allodynia モデルラットにおいて、pregabalin 6 mg/kg を静脈内投与すると (pregabalin 単独投与群)、投与後 120 分における潜時時間 (percent of maximal possible effect; %MPE) の AUC が vehicle 群と比較して有意に増加したことから、鎮痛効果が確認された。一方、pregabalin 投与 15 分前に BCAA を投与すると (pregabalin+BCAA 投与群)、%MPE の AUC が pregabalin 単独投与群と比較して 39% 有意に低下したことから、鎮痛効果が減弱した (図 5 左)。Pregabalin 投与群及び pregabalin+BCAA 投与群における pregabalin の投与後 120 分までの血漿中及び脊髄中濃度推移を比較すると、血漿中濃度の変化は確認されない一方、脊髄中濃度は 120 分までの AUC で 25% 低下した。

Mirogabalin を 1 mg/kg を静脈内投与すると (mirogabalin 単独投与群)、投与後から 120 分における MPE の AUC が vehicle 群と比較して有意に増加し、鎮痛効果が確認された。一方、mirogabalin+BCAA 投与群において mirogabalin 単独投与群と比較して鎮痛効果の有意な変化はなかった (図 5 右)。BCAA+mirogabalin 投与群における mirogabalin の脊髄中濃度の AUC の変化は mirogabalin 単独投与群と比較して 9% の増加と影響は小さかった。

【考察】

Mirogabalin は TR-BBB13 細胞及び hCMEC/D3 細胞において OCTN2 を介して取り込まれることが示された。Mirogabalin は OAT1、OAT3、OCT2、PEPT1、PEPT2、及び MATE1 の基質であること及び LAT1 非基質であることが報告されているが、TR-BBB13 及び hCMEC/D3 細胞においてこれらトランスポーターを介した輸送は観察されなかった。HEK293 細胞による OCTN2 を介した mirogabalin の輸送は Na⁺ 依存的であった。Mirogabalin は血漿中で両性イオンとして存在していると考えられ、両性イオンの OCTN2 基質 (D-carnitine, midronate) が Na⁺ 依存的な輸送特性を持つことと一致した。本研究にて、mirogabalin は OCTN2 の基質となることを初めて明らかとした。

ラットにおける pregabalin の脊髄移行性は、血漿中 BCAA 上昇により LAT1 活性低下の影響を受けることが明らかとなった。ヒトにおいて、肝不全患者に対するアミノ酸補充薬の服用時や、高蛋白食を摂取した際には血漿中 BCAA 濃度が上昇することが報告されている。ヒトにおいて、肝不全時の BCAA 補充の際の用量 (4 g) に近い 5 g の BCAA を経口投与した際、または高蛋白食を摂取した際の血漿中アミノ酸濃度変動の報告値から、先述の式より LAT1 残存活性を算出したところ、それぞれの条件で LAT1 残存活性が 57% 及び 35% 低下することが推測された。よって、治療及び日常的な BCAA 摂取による血漿中アミノ酸濃度の変動が、LAT1 を介した pregabalin の脊髄移行に影響を与える可能性が示された。また、脂質異常症治療薬である clofibrate を服用すると、BCAA 代謝が活性化されることで、血漿中の BCAA 濃度が約 30-50% 低下することが報告されている。したがって、pregabalin とフィブレート系薬剤を併用することで、血漿中アミノ酸濃度が減少し pregabalin の脊髄への移行が上昇し、薬理効果が増強する可能性がある。

Mirogabalin は TR-BBB13 細胞及び hCMEC/D3 細胞にて OCTN2 の寄与が示されたため、脊髄移行においても OCTN2 が関与する可能性が考えられたが、それを裏づけるデータは得られなかった。既報において、OCTN2 ノックアウトマウスを用いた microdialysis により取得した OCTN2 基質 acetyl-³H]-L-carnitine の脳細胞外液中濃度は野生型マウスと比較して低い一方、脳組織ホモジネート中濃度では差が検出されていない。公共のマウス脊髄 single nuclei RNA-sequencing データより、内皮細胞としてクラスタリングされた細胞集団のうち 40% 程度が LAT1 を発現する一方、OCTN2 を発現する細胞は 10% 以下だった。よって BSCB における OCTN2 を介した mirogabalin の脊髄移行は、*in vivo* において検出が難しいもしくは寄与が小さい可能性がある。

血漿中 BCAA 濃度上昇時の pregabalin 及び mirogabalin 静脈投与時の鎮痛効果を、oxaliplatin 誘発ラット cold allodynia モデルを用い評価した。Pregabalin の脊髄組織中濃度は低下し、その結果 pregabalin の鎮痛作用を減少させることが示された。その一方、LAT1 非基質である mirogabalin の鎮痛作用において影響はなかった。LAT1 の競合により中枢移行性が低下し、薬効に影響を与える薬物として L-DOPA がある。血漿

中大型中性アミノ酸濃度の上昇によって血漿中 L-DOPA 濃度は低下しないにもかかわらず運動調節効果が低下するため、アミノ酸摂取と L-DOPA 投与の間隔を2時間以上空けることで薬効減弱を回避している報告がある。臨床におけるアミノ酸補充薬や高蛋白食が pregabalin の脊髄移行を阻害することで、LAT 残存活性が低下し脊髄への移行が低下する可能性があり、本研究は、これらが薬効に与えるインパクトを臨床において調査する必要性を示している。また、現在 pregabalin の効果が不十分な患者においても、食事や併用薬を考慮した適切な投与計画によって、薬効を最大限に引き出せる可能性を示唆している。一方、mirogabalin の鎮痛効果は血漿中 BCAA 濃度の上昇による影響を受けなかった。Mirogabalin の BSCB 透過メカニズムの更なる解析は必要ではあるが、mirogabalin は pregabalin と比較してアミノ酸補充薬や高蛋白食との併用による薬効の変動リスクは低いというメリットがあることが示唆された。

【結論】

本研究により、OCTN2 の新規基質薬物として mirogabalin を見出し、TR-BBB13 細胞及び hCMEC/D3 細胞への mirogabalin 輸送に大きく寄与することを明らかとした。また、ラット脊髄移行において、LAT1 基質アミノ酸の血漿中濃度上昇に伴い LAT1 基質である pregabalin の脊髄移行が低下する一方、非基質である mirogabalin は影響を受けないことを見出した。鎮痛効果についても、pregabalin では、脊髄移行性の低下による効果の減弱が観察されたが、mirogabalin の鎮痛効果は BCAA の影響を受けなかった。本研究から得られた知見は、BSCB 透過に関わるトランスポーターを介した相互作用が、薬効の発現強度に影響を与えることを示したものであり、これまで十分でなかった BSCB における薬物動態研究の重要性を裏付けるものであるとともに、ガバペンチノイドをはじめとする脊髄標的薬物の有効的な活用を提案するための有益なエビデンスである。

【主論文に関する原著論文】

T Akashi, S Noguchi, Y Takahashi, T Nishimura, M Tomi: L-Type amino acid transporter 1 (SLC7A5)-mediated transport of pregabalin at the rat blood-spinal cord barrier and its sensitivity to plasma branched-chain amino acids. *J Pharm Sci*. Online ahead of print (doi: 10.1016/j.xphs.2022.12.028).

【参考論文】

T Akashi, T Nishimura, Y Takaki, M Takahashi, BC Shin, M Tomi, E Nakashima: Layer II of placental syncytiotrophoblasts expresses MDR1 and BCRP at the apical membrane in rodents. *Reprod Toxicol*. 65:375-381 (2016).

A Takagi, T Nishimura, T Akashi, M Tomi, E Nakashima: Contribution of equilibrative nucleoside transporter (ENT) 2 to fluorouracil transport in rat placental trophoblast cells. *Drug Metab Pharmacokinet*. 32:151-156 (2017).