

精神・神経疾患におけるバイオマーカーの探索と創薬展開

鍋倉智裕（創薬科学ユニット）、武田良文（創薬科学ユニット）、大井義明（創薬科学ユニット）、波多野紀行（生命薬学ユニット）、上井優一（生命薬学ユニット）

食事によって摂取されたトリプトファンの大部分はキヌレニン経路による代謝を受け、補酵素のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドはその最終代謝物の一つである。また、キヌレニン経路は、中枢神経の機能に一役を担うことが示されているが、とりわけ、キノリン酸とキヌレニン酸は精神・神経疾患と関連することが示唆されている。キノリン酸は、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアゴニスト作用を有し、マウスの脳室内へ投与することによって、痙攣が生じたことが報告されている。一方、キヌレニン酸はNMDA受容体や α 7ニコチン受容体のアンタゴニスト作用を有し、神経保護に関与している。また近年、統合失調症患者において脳内キヌレニン酸濃度の上昇が示され、キヌレニン酸が統合失調症に関与するとの仮説が唱えられている。キヌレニン酸の脳内濃度上昇に関与する因子を抽出するため、キヌレニン経路における代謝酵素の量的・遺伝的検討がなされたが、これらだけでは説明できない症例も報告されている。

キヌレニン酸は最終代謝物であるため、脳におけるキヌレニン酸の消失経路を分子レベルで明らかにすることより、統合失調症のメカニズムの解明が進むものと考えられる。ラットに有機アニオントランスポータの代表的阻害剤であるプロベネシドを投与することによって、脳内のキヌレニン酸濃度が上昇したことを示す報告が存在する。そこで我々はヒト有機アニオントランスポータhOAT1とhOAT3によるキヌレニン酸の輸送特性を評価し、両トランスポータがキヌレニン酸を効率よく輸送することを見出した(Uwai et al., *Pharmacol Res* **65**: 254, 2012)。従って、OAT1とOAT3がキヌレニン酸の脳からの消失を媒介し、その機能低下が統合失調症の原因となる可能性が考えられる。本研究では、有機アニオントランスポータに着目した精神・神経疾患におけるバイオマーカー探索と創薬展開を目標とし、4項目について検討し、以下の成果を得た。

1) ラット有機アニオントランスポータrOAT1とrOAT3によるキヌレニン酸の輸送特性

hOAT1とhOAT3のラット型ホモログであるrOAT1とrOAT3によるキヌレニン酸の輸送について検討するため、

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた薬物取り込み実験を行った。rOAT1とrOAT3の合成RNAを卵母細胞に注入することによって、卵母細胞へのキヌレニン酸の取り込みは上昇した。従って、rOAT1とrOAT3はキヌレニン酸を基質とすることが判明した。rOAT1による輸送活性はhOAT1に比べ低く、OAT1によるキヌレニン酸の輸送には種差が認められた。一方、rOAT3による輸送特性はhOAT3と類似していた。従って、ラットにおいてはOAT3がキヌレニン酸の体内動態に重要な役割を担うことが予測された。また、OAT1による輸送に種差を示す化合物は、初めての発見である。(実施者：上井)

2) ラット脳幹スライスにおける α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 受容体の興奮性シナプス後電流に及ぼすOAT3阻害薬の影響

キヌレニン酸は、AMPA受容体の拮抗作用を有する。そこでラット脳幹スライスにおける同受容体介在性電流に及ぼすOAT3阻害薬の影響を検討することで、OAT3とAMPA受容体の機能連携について解析した。AMPA受容体の興奮性シナプス後電流は、キヌレニン酸共存下で減少した。一方、OAT3阻害剤であるプロベネシドやプラバスタチンによる影響を受けなかった。従って、薬理学的手法からキヌレニン酸の脳からの消失におけるrOAT3の関与を示すことはできなかった。(実施者：大井)

3) ヒト脳毛細血管内皮細胞hBMVECにおける薬物トランスポータの発現プロファイルとキヌレニン経路代謝物による影響

トリプトファン代謝物が脳に局在する有機アニオントランスポータの発現を変動させる可能性を検討するため、ヒト脳毛細血管内皮細胞hBMVECにおける有機アニオントランスポータのmRNA発現量変化を解析した。また他の薬物トランスポータの発現やカルシウム透過チャネルへの影響も合わせて精査した。まずhBMVECにおける薬物トランスポータのmRNA発現量を定量的RT-PCR法により網羅的に解析したところ、multidrug resistance protein (MRP) 1、MRP4、P-糖タンパク質 (MDR1) お

よびbreast cancer resistance protein (BCRP) で高いmRNA発現が確認された。次に、hBMVECを100 μ Mのキヌレン酸やキノリン酸に24時間曝露し、薬物トランスポータmRNA発現量変化について解析した。その結果、OAT1、OAT3、MRP1、MRP4、MDR1およびBCRPのmRNA発現量に変化は観察されなかった。一方、有機アニオントランスポータOATP2B1のmRNA発現量は、キヌレン酸曝露により有意に減少した。またhBMVECおよび培養神経細胞IMR-32の細胞内カルシウム動態は、トリプトファン代謝物によりまったく影響を受けなかった。これらの結果より、トリプトファン代謝物がOATP2B1発現量の変化を介して、基質化合物の脳内残存量に影響を与える可能性が示唆された。(実施者：波多野)

4) トリプトファン代謝物キサンツレン酸のOAT1とOAT3による輸送とナトリウム利尿

有機アニオントランスポータによって輸送される他のトリプトファン代謝物を絞り込むため、hOAT1とhOAT3に対するトリプトファン代謝物の阻害効果を評価した。その結果、hOAT1とhOAT3はキヌレン酸に加えキサンツレン酸によっても強く阻害された。次にキサンツレン酸の輸送を評価したところ、rOAT1、hOAT1、rOAT3およびhOAT3はいずれもキサンツレン酸を基質とすることが判明した。従って、OAT1とOAT3はキサンツレン酸の尿細管分泌や脳挙動に関与すると推察された。

キサンツレン酸とキヌレン酸は、構造的に極めて類似している。OAT1によるキサンツレン酸の輸送活性は、キヌレン酸同様、ヒト型ホモログの方が高かった。さらにOAT3によるキサンツレン酸輸送においても種差が観察され、ラット型ホモログで高い輸送活性を示した。

キサンツレン酸の生理的意義に関しては、十分に明らかにされたとは言いがたい。しかし、キサンツレン酸の硫酸抱合体がナトリウム利尿を惹起することが報告されており、その代謝酵素はOAT1やOAT3と共に近位尿細管に発現する。そこでキサンツレン酸の利尿効果におけるOATの役割を明らかにするため、ラットにキサンツレン酸とプロベネシドを投与した際のナトリウム利尿を評価した。生理食塩水にキサンツレン酸を溶解し大腿静脈から持続点滴することによって、ナトリウム利尿が認められた。プロベネシドを併用することによって、尿量とナトリウムの尿中排泄量は生理食塩水を投与した際と同程度まで減少した。また、キヌレン酸の投与によるナトリウム利尿は観察されなかった。従って、OATによるキサンツレン酸の輸送は、その利尿作用に関与すると考えられた。(実施者：上井)

以上、1) および4) の検討から、有機アニオントランスポータOAT1およびOAT3によるキヌレン酸、キサンツレン酸の輸送特性が明らかになった。これらの輸送には種差が認められたが、ヒト型およびラット型のOAT1とOAT3はそれぞれ高いアミノ酸相同性を示すため、非常に珍しい例である。OAT1やOAT3によるキヌレン酸およびキサンツレン酸の輸送における種差のメカニズムを解明することにより、両トランスポータの基質認識機構に関する有益な情報が得られるものと考えられる。

残念ながら2) の検討から、脳においてキヌレン酸が作用する受容体の機能が有機アニオントランスポータと連携していることを示すことはできなかった。有機アニオントランスポータによるキヌレン酸の輸送活性は非常に高いため、キヌレン酸の脳内挙動における有機アニオントランスポータの役割の解明が待たれる。有機アニオントランスポータのノックアウトマウスやbrain efflux index法を用いることによって、寄与を評価できるものと考えられる。

また3) の検討から、キヌレン酸がOATP2B1の発現量を変動させることを見出した。OATP2B1は小腸においてフェキソフェナジン等の吸収に関与することが示されている。今後、OATP2B1の発現機構ならびにキヌレン酸による調節メカニズムを解明することによって、薬物の吸収改善を目的とした創薬展開につながる可能性を秘めている。

本研究成果は、有機アニオントランスポータやトリプトファン代謝物の生理的役割を解明する上で、基礎的知見になると考えられる。

研究成果発表

1 論文発表

- Uwai, Y., Honjo, E. Transport of xanthurenic acid by rat/human organic anion transporters OAT1 and OAT3. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 1517-1521, 2013.

2 学会発表

- 上井優一, 原浩晃, 岩本喜久生. ラット有機アニオントランスポータrOAT1とrOAT3によるkynurenic acidの輸送特性: ヒト型ホモログとの比較. 日本薬学会第133年会, 横浜市, 2013年3月28日.
- 本庄絵美, 中島悠太, 上井優一, 鍋倉智裕. Xanthurenic acidの有機アニオントランスポータによる輸送特性と利尿作用. 第59回日本薬学会東海支部総会・大会, 名古屋市, 2013年7月6日.