

104 脳内薬物デリバリーを促進するトランスポーターの探索	荒川 大
-------------------------------	------

【目的】 血液脳関門 (BBB) の克服は、中枢神経系疾患に対する創薬の最大の課題である。BBB には薬物を積極的に取り込むトランスポーターの存在が多く報告されており、その利用により効率的な薬物の脳内デリバリーが期待されるが、関与するトランスポーター分子の実体は同定されていない。これは、従来の対象薬物の特徴からトランスポーターを推定する限定的手法では、分子の同定は困難であることを意味する。そこで本研究では、独自に構築した sgRNA ライブラリーを用い、取り込みに働くタンパク質全てを対象としてスクリーニングすることで、BBB 取り込みトランスポーターを同定することを目的に研究を行った。

【方法】 脳毛細血管内皮細胞の特性を強く有する hCMEC/D3 細胞を用い、hCMEC/D3 へのトランスポーター介在輸送を調べた。コラーゲンコートをした 96-well plate に hCMEC/D3 細胞を播種し、37°C および 4°C における薬物取り込みを行った。また、別のプレートに播種した hCMEC/D3 細胞を用い、薬物の曝露 72 時間後に WST-8 アッセイにより細胞毒性を評価した。sgRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行うため、レンチウイルスに組み込まれた sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させた。その後、8 種の薬物 (crizotinib、cyclosporine A、digoxin、imatinib、loperamide、mitoxantrone、paclitaxel 及び vincristine) をそれぞれ曝露し、一定時間後にゲノム DNA を回収した。次世代シーケンサーでゲノム DNA に含まれる sgRNA の配列を読み込み、BBB 取り込みトランスポーター候補遺伝子を抽出した。

【結果】 低分子及び中分子化合物の取り込みにトランスポーターが関与する可能性を調べるため、hCMEC/D3 細胞への 21 種の化合物の取り込みを調べた。その結果、低分子化合物の中でも比較的分子量が大きい化合物 16 種の取り込みに温度依存性が観察された。また、そのうち 8 種の薬物 (crizotinib、cyclosporine A、digoxin、imatinib、loperamide、mitoxantrone、paclitaxel 及び vincristine) は hCMEC/D3 細胞に対して細胞毒性を示し、sgRNA スクリーニングに適用できることが示された。sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させ、これら薬物を用いたスクリーニング試験を行った。その結果、digoxin の排出に働く MDR1 が抽出され、本法の妥当性が示された。また、薬物の取り込み活性が期待できる solute carrier family および major facilitative superfamily として、14 種の遺伝子が抽出された。現在見出された遺伝子のクローニングを行い、発現系を用いて基質認識性試験を実施している。

sgRNA スクリーニングによる digoxin トランスポーター候補遺伝子の抽出

