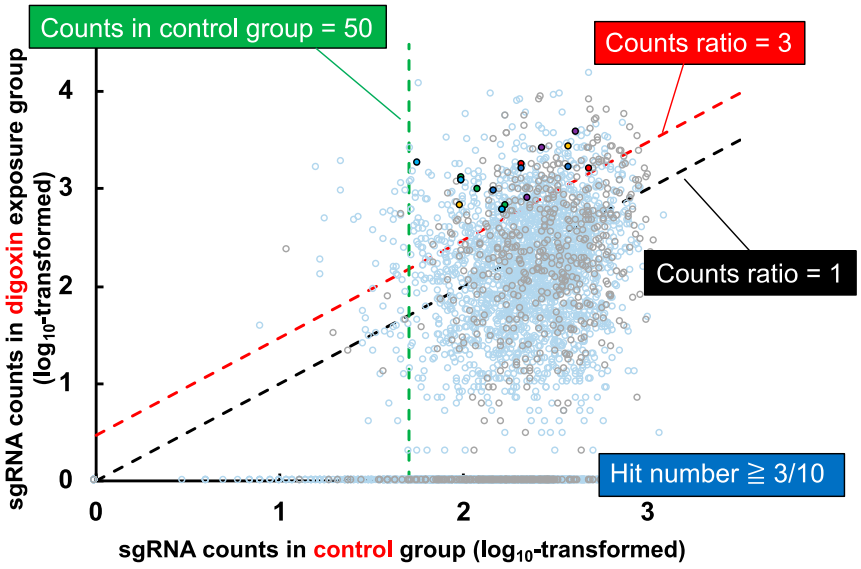
104　脳内薬物デリバリーを促進するトランスポーターの探索	荒川　大

【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施した 96-well plate に hCMEC/D3 細胞を播種し、37℃および 4℃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。次世代シークエンサーでゲノム 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



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

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 薬物動態学研究室

Key words：脳血液関門，トランスポーター，脳内移行性，Crispr/Cas9 スクリーニング，中枢作用薬

緒　言

脳内に作用点を有する中枢作用薬の開発は、他疾患領域の薬物開発に比べると成功確率が著しく低い。その大きな原因は、血液と脳脊髄液を隔てる血液脳関門 (BBB) の存在であり、多くの活性物質が脳内に移行できないことにある。BBB の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、その密着結合などによる非特異的な脳移行の抑制、ならびに汲み出しポンプとして働く P-糖タンパク質などのトランスポーターによる薬物移行の抑制による。一方、pyrilamine などいくつかの薬物の脳移行に取り込みトランスポーターの介在が示唆されている [1]。しかし、現在のところ薬物の BBB 取り込みトランスポーターは同定されていない。

タンパク質の分子同定の際、膨大な種類が存在するタンパク質を単離し、薬物輸送活性を調べる従来の方法は、多くの労力と時間を要し、かつ成功率が低い。近年、機能的な遺伝子のスクリーニングツールとして、single guide RNA（sgRNA）ライブラリーによるスクリーニング試験が報告された [2]。本研究ではこの評価系を応用し、トランスポーターやチャネルを特異的にノックアウトすることが可能なライブラリーを用い、1,000 種類の遺伝子を網羅的にスクリーニングする手法を試みた。本法では、ノックアウトに必要な sgRNA 配列を含むレンチウイルスを適切な条件で脳毛細血管内皮細胞に感染させることにより、1 つの細胞から 1 つの標的遺伝子が特異的にノックアウトされる。トランスポーターがノックアウトされることによる薬物の細胞内蓄積の変化を、薬物誘導型の細胞毒性により評価することで、薬物トランスポーターの特性に応じたスクリーニングが可能である。その後、全ての細胞からゲノム DNA を回収し、染色体に組み込まれた個々のレンチウイルスの配列を次世代シークエンスで読み込むことで、リード数の高い細胞では血液側から細胞への取り込みトランスポーターが、リード数の低い細胞では細胞から脳側への排出トランスポーターを絞り込むことが可能となる。本研究により、14 種類のトランスポーターが BBB への薬物取り込みに関与する可能性が示唆された。

方　法

1.　Crispr/Cas9 スクリーニングに用いる薬物の選択

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施した 96-well plate に hCMEC/D3 細胞を播種し、37℃および 4℃における薬物取り込みを行った。薬物の定量は LC-MSMS を用いて行った。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。

2.　sgRNA ライブラリーを用いたトランスポータースクリーニング

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。puromycin で感染していない細胞を除去後、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。その後、次世代シークエンサーでゲノム DNA に含まれる sgRNA の配列を読み込んだ。

3. siRNA ライブラリーを用いたトランスポータースクリーニング

薬物輸送活性が期待される 214 種のトランスポーターを標的とした siRNA を hCMEC/D3 細胞に導入した。siRNA の導入から 3 日後、pyrilamine 取り込み試験を行った。pyrilamine の定量は LC-MSMS より行った。

結果および考察

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、脳毛細血管内皮細胞の特性を有し、MDR1 や BCRP など多くのトランスポーター発現量がヒト脳毛細血管内皮細胞と同等と報告されている hCMEC/D3 細胞［3，4］を用い、21 種の化合物について温度依存性取り込み試験を行った（図 1）。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 12 種（alectinib、aripiprazole、crizotinib、donepezil、imatinib、loperamide、mitoxantrone、risperidone、pyrilamine、sunitinib、trifluoperazine 及び verapamil）及び中分子化合物 4 種（cyclosporine A、paclitaxel、ponatinib 及び vincristine）の取り込みに温度依存性が観察され、これら薬物の取り込みにトランスポーターが関与する可能性が示唆された（図 1）。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。

さらに、sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させ、digoxin を用いたスクリーニング試験を行った。この際、次世代シークエンサーの結果に加え、生理的なヒト脳毛細血管内皮細胞に発現するトランスポーター［5］を抽出した。その結果、digoxin の排出に働く MDR1 が抽出され、また取り込み型トランスポーターの候補として 6 つの遺伝子が抽出された（図 2）。これらの結果から、トランスポーター同定を本スクリーニング試験法で展開可能なことが示唆された。そこで、残り 7 種の薬物についても同様にして sgRNA ライブラリーを用いたスクリーニング試験を実施した。次世代シークエンサーを用いた解析結果より抽出された遺伝子のうち、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。

本法は細胞毒性を指標としてトランスポーターの絞り込みを行っているため、検討を行った多くの中枢作用薬は細胞毒性を持たず、スクリーニングに適応できなかった。そこで、hCMEC/D3 細胞への取り込みにトランスポーターが介在することが示唆されている pyrilamine を用い、薬物輸送が期待される 214 種の siRNA による取り込みスクリーニング試験を行った。その結果、6 種の siRNA により pyrilamine 取り込みが 25%以上低下し、標的とするトランスポーターが pyrilamine 取り込みに関与する可能性が示唆された。現在これら 2 つの手法により抽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。

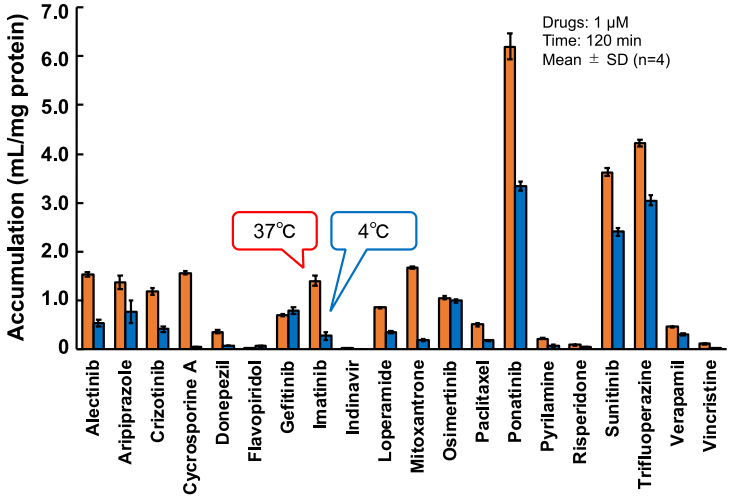


図 1. hCMEC/D3 細胞における薬物の温度依存性取り込み試験

20 種の薬物を用い、hCMEC/D3 細胞への温度依存性取り込み試験を行った。その結果、16 種の薬物取り込みが、37℃と比較し 4℃において 50%以下まで低下し、トランスポーターの介在が示唆された。

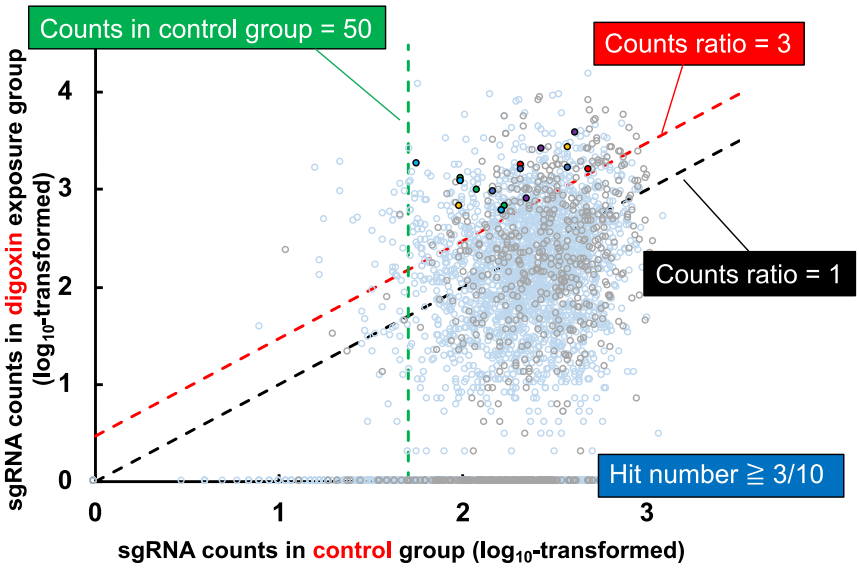


図 2. sgRNA スクリーニングによる digoxin トランスポーター候補遺伝子の抽出

トランスポーター標的型 sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させた後、digoxin の細胞毒性試験を行った。曝露後、生存した細胞からゲノム DNA を抽出し、次世代シークエンサーによる解析を行った。解析結果の抽出条件として、1. control の sgRNA に対し、遺伝子を標的とする sgRNA のリード数が 3 倍以上、2. 一つの遺伝子に対して 3 種類以上の sgRNA が検出されること、また 3. 非曝露細胞においてリード数が 50 以上の遺伝子を設定した結果、6 種類の取り込みトランスポーターが抽出された。

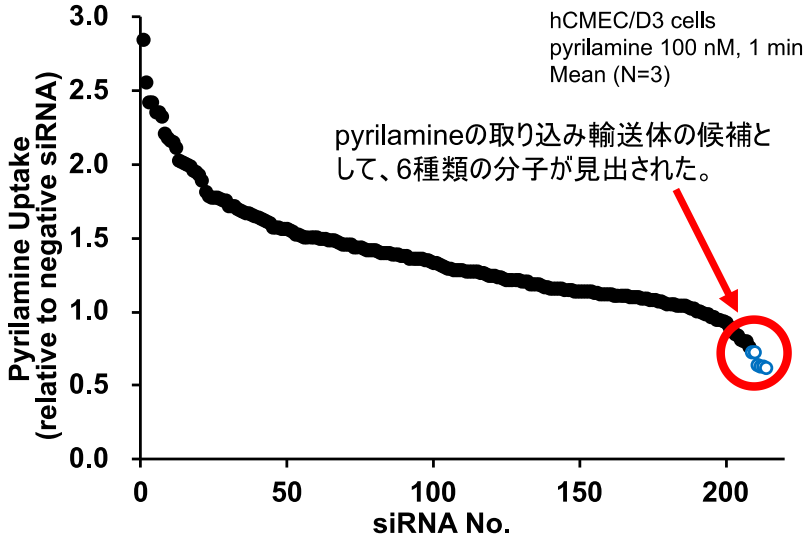


図 3. siRNA スクリーニングによる pyrilamine トランスポーター候補遺伝子の抽出

薬物輸送活性が期待される 214 種のトランスポーターに対する siRNA を用い、hCMEC/D3 細胞への pyrilamine 取り込みへの影響を調べた。その結果、6 種の siRNA により pyrilamine 取り込みが 25%以上低下し、標的とするトランスポーターが pyrilamine 取り込みに関与する可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学医薬保健研究域薬学系薬物動態学研究室の玉井郁巳教授、金沢大学がん進展制御研究所遺伝子・染色体構築研究分野の平尾敦教授および帝京大学薬学部薬物動態学研究室の出口芳春教授である。本研究を行うにあたりご支援を賜った公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げる。

文　献

1） Okura T, Hattori A, Takano Y, Sato T, Hammarlund-Udenaes M, Terasaki T, Deguchi Y. Involvement of the pyrilamine transporter, a putative organic cation transporter, in blood-brain barrier transport of oxycodone. Drug Metab Dispos. 2008 Oct;36(10):2005-13. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18606742 DOI: 10.1124/dmd.108.022087.

2） Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelson T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 2014 Jan 3;343(6166):84-87. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24336571 DOI: 10.1126/science.1247005.

3） Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB J. 2005 Nov;19(13):1872-4. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16141364 DOI: 10.1096/fj.04-3458fje.

4） Ohtsuki S, Ikeda C, Uchida Y, Sakamoto Y, Miller F, Glacial F, Decleves X, Scherrmann JM, Couraud PO, Kubo Y, Tachikawa M, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. Mol Pharm. 2013 Jan 7;10(1):289-96. Epub 2012 Dec 11. PMID: 23137377 DOI: 10.1021/mp3004308.

5） Geier EG, Chen EC, Webb A, Papp AC, Yee SW, Sadee W, Giacomini KM. Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier. Clin Pharmacol Ther. 2013 Dec;94(6):636-9. Epub 2013 Sep 5. PMID: 24013810 DOI: 10.1038/clpt.2013.175.