

中枢支援防御システムとしての血液脳関門輸送の生理機能

大槻 純男

The Physiological Function of the Blood-Brain Barrier Transporters as the CNS Supporting and Protecting System

Sumio OHTSUKI

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, and New Industry Creation Hatchery Center,
Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan,
SORST and CREST, Japan Science and Technology Agency, Japan*

(Received August 2, 2004)

The blood-brain barrier (BBB) segregates the circulating blood from interstitial fluid in the brain and restricts drug permeability into the brain. Our latest studies have revealed that the BBB transporters play important physiological roles in maintaining the brain environment. For an energy-storing system, the creatine transporter localized at the brain capillary endothelial cells (BCECs) mediates the supply of creatine from the blood to the brain. The BBB is involved in the brain-to-blood efflux transport of γ -aminobutyric acid, and GAT2/BGT-1 mediates this transport process. BCECs also express serotonin and norepinephrine transporters. Organic anion transporter 3 (OAT3) and ASCT2 are localized at the abluminal membrane of the BCECs. OAT3 is involved in the brain-to-blood efflux of a dopamine metabolite, a uremic toxin, and thiopurine nucleobase analogues. ASCT2 plays a role in L-isomer-selective aspartic acid efflux transport at the BBB. Dehydroepiandrosterone sulfate and small neutral amino acids undergo brain-to-blood efflux transport mediated by organic anion transporting polypeptide 2 and ATA2, respectively. The BBB transporters are regulated by various factors: ATA2 by osmolarity, taurine transporter by tumor necrosis factor- α , and L-cystine/L-glutamic acid exchange transporter by oxidative stress. Clarifying the physiological roles of BBB transport systems should give important information allowing the development of better central nervous system (CNS) drugs and improving our understanding of the relationship between CNS disorders and BBB function.

Key words—blood-brain barrier; transporter; brain capillary endothelial cells; creatine; neurotransmitter; neuro-modulator

1. はじめに

血液脳関門 (Blood-brain barrier; BBB) は、血液から脳への薬物の移行を妨げる脳特有の機構である。血液脳関門は、脳毛細血管内皮細胞同士が密着結合で結合することによって非選択的な薬物の脳移行を制限し、さらに、様々な基質特異性を持つトランスポーターを発現することで、選択的な物質交換を行っている。したがって、脳関門の輸送機構を明らかにすることは、中枢作動薬の開発にとって大きな問題である薬物の脳移行性を分子レベルで理解し改善するために必要である。このような薬剤学的重

要性から、脳関門輸送は主に薬物輸送を中心に研究が進んできた。まず、血液から脳への供給輸送が中心に解析され、グルコースやアミノ酸の輸送分子機構が明らかとなった。¹⁾ 続いて、血液脳関門における P 糖タンパク (P-glycoprotein) の役割が明らかとなり、^{2,3)} 脳から血液方向の排出輸送が薬物の脳移行性の制限に大きく関与していることが認識されることとなった。

脳関門の薬剤学的解析は、脳関門輸送の分子機構の解明を大きく進歩させた。しかし、薬物輸送は脳関門輸送機能の一部であり、脳関門輸送は中枢に対して重要な役割を果たしていると考えられる。脳は、非常に多くのエネルギーを消費する臓器であり、様々な代謝物を生成する。特に、神経伝達物質の代謝過程は、不活性機構として再取り込みとならび神経伝達にとって重要である。脳は血液脳関門に

東北大学大学院薬学研究科、東北大学未来科学技術共同研究センター (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)、SORST, CREST 科学技術振興機構

e-mail: sohtsuki@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

よって血液と隔てられているため、脳で生成された代謝物はそのままでは脳に蓄積してしまう。したがって、脳関門輸送は脳内代謝物の除去機構として機能していると考えられる。われわれは、脳関門輸送を従来の薬物輸送とは異なる生理機能という観点から研究を行うことによって、新たな輸送機構と生理的役割を明らかにした。本稿では、脳関門輸送に関する最新の知見を「中枢維持防御システム」としての生理機能の観点からわれわれの成果を中心に紹介する。

2. 脳関門のクレアチン供給機構

脳はその重量が全体重の2%でしかないが、全エネルギー消費量の18%が脳で消費される。脳はエネルギー源であるグルコースを貯蔵することができないために、血中からグルコースを供給する必要がある。血液脳関門はグルコーストランスポーター1 (GLUT1) を発現し、血液から脳にグルコースを供給している (Fig. 1).⁴⁾ さらに、乳児期や飢餓時にはモノカルボキシレートトランスポーター1 (MCT1) が誘導され乳酸の取り込みが上昇する (Fig. 1).⁵⁾ 一方で、エネルギーを大量に消費する組織では、エネルギーの生成に加えエネルギー消費の急激な変動に対応するためにエネルギーの貯蔵機構が必要である。われわれは、血液脳関門がエネル

ギー源だけではなく、エネルギーの貯蔵物質も脳に供給していることを明らかにした (Fig. 1).⁶⁾

クレアチンはクレアチンカイネースを介してクレアチンリン酸となることでATPのエネルギーを貯蔵する。また、この逆反応によってクレアチンリン酸とADPからATPを産生する (Fig. 1)。このようにクレアチンはエネルギー貯蔵機構において重要な分子である。ヒトの脳には血中の約180倍ものクレアチンが存在する。⁷⁾ クレアチン合成酵素欠損による体内クレアチン量低下が認められるクレアチン欠損症候群 (creatine deficiency syndrome) が報告されており、患者では、精神運動発達遅延、発作、髄鞘形成遅延などの中枢関連障害が認められる。^{8,9)} また、アルツハイマー病の軽度痴呆患者においてクレアチンリン酸レベルの低下が認められている。⁹⁾ このように、クレアチンは中枢機能の形成と維持に深く関わっている。

脳と同様に多くのクレアチンが存在する筋肉はクレアチントランスポーター (CRT) を介して血中からクレアチンが供給される。しかし、脳においては血中からの供給、若しくは脳での合成のいずれによりクレアチンが維持されているかは不明であった。クレアチンの大量経口投与によっても脳内クレアチンの上昇はわずかであり、¹⁰⁾ さらに *in situ* ハイ

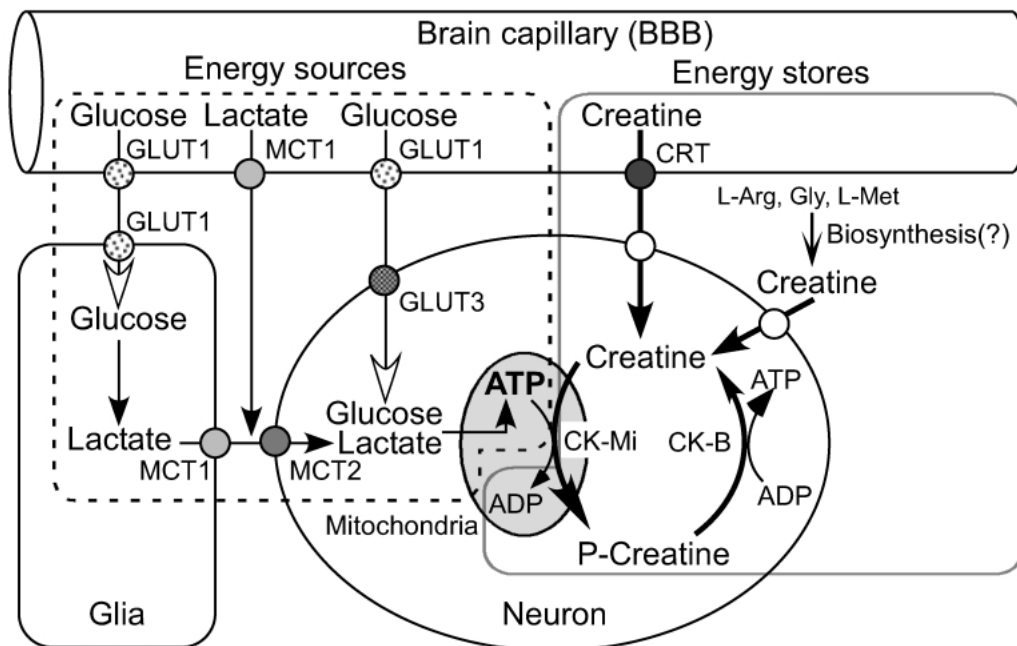


Fig. 1. Network Pathways of Energy Sources and Energy Stores in the CNS

CK-B: brain-type cytoplasmic creatine kinase, CK-Mi: ubiquitous mitochondrial creatine kinase, P-creatine: phosphocreatine. Modified from Ohtsuki *et al.*, *Farmacia*, 39, 1057-1061 (2003).

ブリダイゼーションによって脳毛細血管内皮細胞において CRT の mRNA の発現が検出されなかったことが報告されていた。¹¹⁾ 一方、われわれは *in vitro* 血液脳関門モデルとして条件的不死化マウス脳毛細血管内皮細胞 (TM-BBB)^{12,13)} を用いて解析したところ、TM-BBB 細胞において CRT の mRNA 発現を検出した。⁶⁾ さらに、TM-BBB 細胞はクレアチンを取り込む活性を示し、その活性は CRT の阻害剤である β -guanidinopropionate や guanidinoacetate によって阻害された。これらの結果は、TM-BBB 細胞に CRT によるクレアチン輸送系が発現していることを示している。*In vivo* においても、放射標識したクレアチンをマウスの静脈内に投与した結果、24 時間後には脳内に血中濃度の約 30 倍の放射標識クレアチンが移行した。さらに、マウス脳を抗 CRT 抗体によって免疫染色を行い、マウス脳毛細血管内皮細胞に CRT が局在していることを示した。マウス脳内の内因性のクレアチン濃度は血中の約 40 倍であることから、血液脳関門は CRT を介して脳内に十分なクレアチンを供給する機能を有していることを示している。

クレアチン合成酵素欠損と同様に CRT の変異によるクレアチン欠損症候群も報告されているが、両者で大きく臨床知見が異なる。¹⁴⁾ クレアチン合成酵素欠損の患者では、脳や血中も含めた全身のクレアチン量が低下し、クレアチン補充によって全身クレアチン量と症状が回復する。⁸⁾ 一方、CRT 変異を伴う患者では、脳内クレアチンは検出限界まで低下するが、血中クレアチンレベルは通常か上昇が認められている。さらにクレアチン補充によっては脳内クレアチン量や症状の改善は認められない。¹⁵⁾ この臨床知見は、われわれの結論を支持し、CRT が関与する脳関門クレアチン輸送が中枢のエネルギー恒常性に重要な役割を果たしていることを示している (Fig. 1)。さらに、TM-BBB 細胞によるクレアチン輸送の K_m 値 ($16.2 \mu\text{M}$) は、血漿中クレアチン濃度 (マウス: $50\text{--}100 \mu\text{M}$, ヒト: $200 \mu\text{M}$) と比較して低い。¹⁶⁾ このことは、脳関門クレアチン輸送は正常時において血中のクレアチンによって飽和している可能性を示している。すなわち、クレアチン投与によって血中クレアチン濃度が上昇しても、輸送系の飽和のため脳へのクレアチン供給速度はほとんど上昇せず、結果として脳内クレアチンはほとんど

上昇しなかったと考えられる。

3. 神経伝達物質の脳関門排出輸送

血液脳関門は、従来、神経伝達物質を脳に保持するバリアーとして機能していると考えられていた。われわれは血液脳関門が神経伝達物質を排出する機能を有することを明らかにし、血液脳関門は神経伝達物質に対して単なるバリアーではなく制御機構としての新たな生理機能を示唆した (Fig. 2)。

TM-BBB 細胞は抑制性神経伝達物質である γ アミノ酪酸 (GABA) を Na^+ 及び Cl^- 依存的に取り込む活性を示した。¹⁷⁾ GABA トランスポーター (GAT) の発現を検討したところ、TM-BBB 細胞においては GAT2/BGT-1 が発現していたが、神経細胞やグリア細胞に発現する GAT1 や GAT3 の発現は検出されなかった (Fig. 3)。このことは、血液脳関門では神経やグリアとは異なる GAT が発現していることを示唆している。実際、Brain Efflux Index (BEI) 法¹⁸⁾ を用いて測定した [^3H]GABA の脳関門排出速度は、GAT1 と GAT3 の阻害剤である nipecotic acid によって阻害されず、逆に促進された。¹⁹⁾ この促進は、nipecotic acid により脳内に投与された [^3H]GABA の神経細胞やグリア細胞への取り込みが阻害され、一方で脳関門 GABA 排出輸送は阻害されなかった結果と考えられる。また、免疫染色によって GAT2/BGT-1 がマウス脳毛細血管内皮細胞に局在していることを示した。これらの結果は、脳関門に発現する GAT2/BGT-1 が GABA の脳関門排出輸送分子として働いていることを示唆している (Fig. 2)。

モノアミンに関しては、ノルエピネフリンやセロトニンが単離脳毛細血管に取り込まれることが報告されていた。^{20,21)} われわれは、TM-BBB 細胞にノルエピネフリントランスポーター (NET) 及びセロトニントランスポーター (SERT) が発現していることを明らかにした。²²⁾ さらに、マウス脳切片の免疫染色によって NET が脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に、SERT が脳側及び血液側細胞膜に局在していることを報告した (Fig. 2)。²²⁾ 脳血管系はセロトニンやアドレナリン作動性神経によって支配を受けている。したがって、脳側細胞膜に発現する NET と SERT は神経伝達物質を内皮細胞に取り込むことによって毛細血管周囲の神経伝達物質の不活性化機構として機能していると考えられる (Fig.

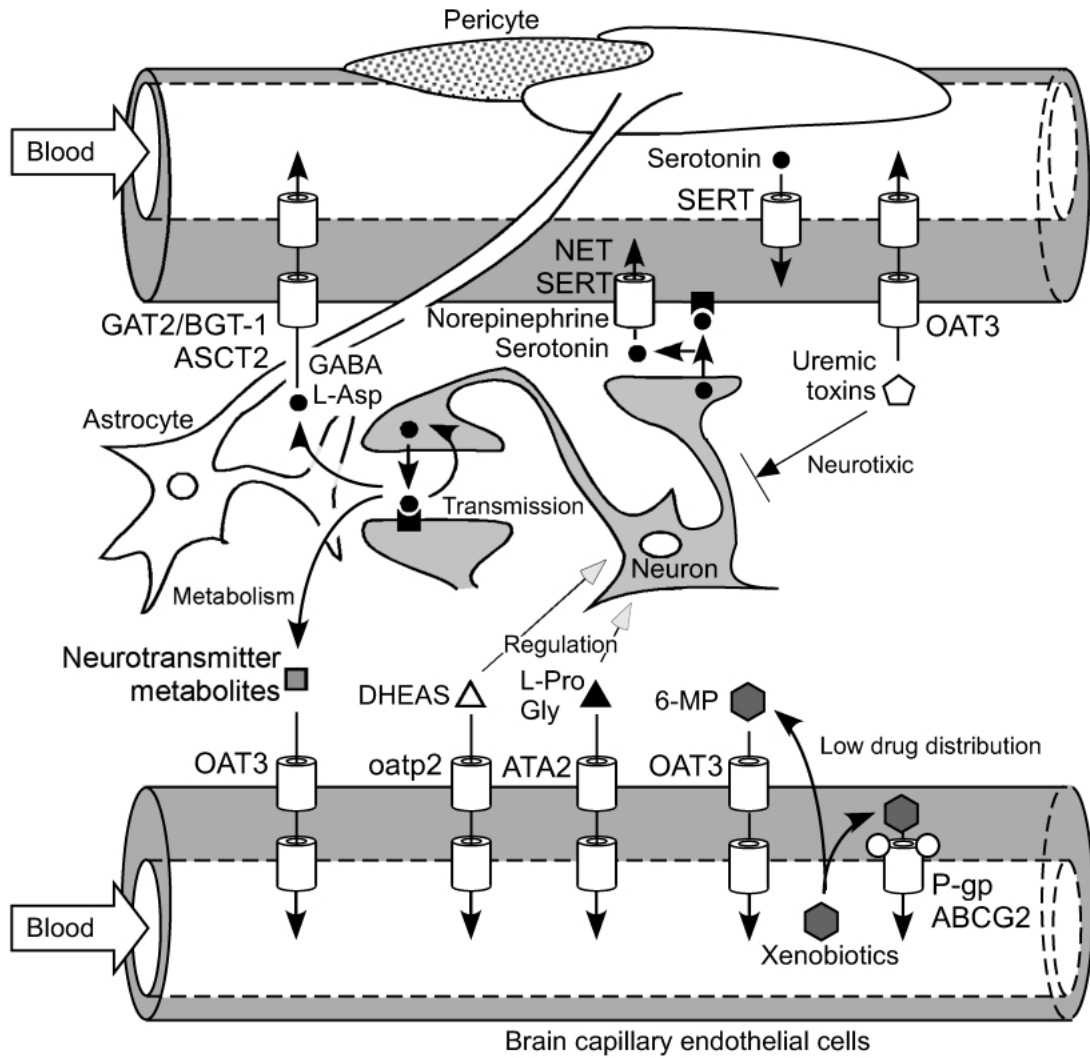


Fig. 2. The Efflux Transporters at the BBB and Their Physiological Functions in the CNS

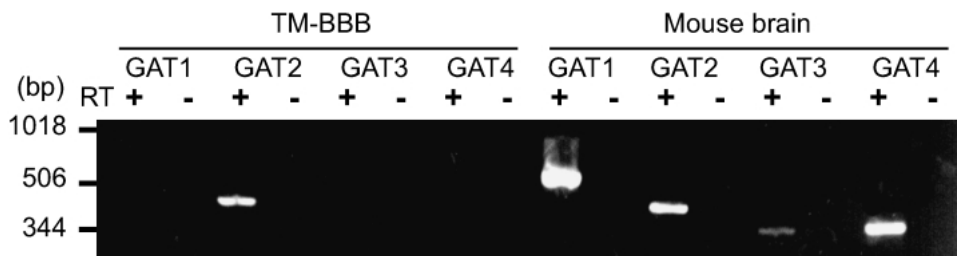


Fig. 3. RT-PCR Analysis of GAT Isoforms in TM-BBB Cells and Mouse Brain

The + and - represent the presence or absence of reverse transcriptase, respectively. In TM-BBB cells, only GAT2/BGT-1 was amplified. Cited from Takana-ga et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 21, 1232-1239 (2001).

2). 血液側に局在する SERT の生理機能は不明である。Ganapathy らは、胎盤の母胎血側の細胞膜に SERT が発現していることを報告している。^{23,24)} 彼らは、強い血管収縮能を持つセロトニンを絨毛間腔から SERT を介して除去することで胎盤内の血

流を保持していると考察している。²³⁾ また、血小板から放出されるセロトニンは血球凝集を促進することから、セロトニン濃度を低く保つことは脳微小血管腔での血液凝固を防ぐこととなる。したがって、血液側膜に発現する SERT は脳微小血管腔のセロ

トニンを除去することで脳血流を維持している可能性が考えられる (Fig. 2).

4. 立体選択的な脳関門酸性アミノ酸排出輸送

近年、哺乳類においてD-アミノ酸の存在とその生理機能の重要性が認識されるようになった。脳においては、D-アスパラギン酸はNMDAの前駆体として存在し、また、成長ホルモン、黄体形成ホルモン、メラトニンやオキシトシンなどのホルモンの分泌に影響を与えている。²⁵⁾ 一方でL-アスパラギン酸はL-グルタミン酸と同様に興奮性アミノ酸であり、²⁶⁾ D-アスパラギン酸とは全く異なる機能を有している。われわれは、血液脳関門にL-アスパラギン酸を選択的に排出する立体選択的な排出輸送が存在することをBEI法を用いて報告している。²⁷⁾ L-アスパラギン酸は、脳内蓄積によって興奮性神経毒性を発揮するため脳から除去される必要があるが、D-アスパラギン酸はNMDAの前駆体として脳に保持される必要があると考えられる。したがって、L体選択的な脳関門排出輸送はL体とD体のそれぞれの生理機能と一致しており、脳内のL-及びD-アスパラギン酸の異なる生理機能の発現に関わっていると考えられる。

アスパラギン酸やグルタミン酸を基質とする興奮性アミノ酸トランスポーター (EAAT) のサブタイプは単離ウシ脳毛細血管内皮細胞に発現していることが報告されていた。²⁸⁾ しかし、EAATはL-及びD-アスパラギン酸の両方を基質とするため、²⁹⁾ われわれは、他のトランスポーターの関与を考え、TM-BBB細胞を用いL体選択的な脳関門アスパラギン酸輸送の解析を行った。³⁰⁾ TM-BBB細胞は、L-アスパラギン酸を優位に取り込む活性を有していた (Fig. 4)。TM-BBB細胞のL体選択的な輸送はNa⁺及びpH依存性であり (Fig. 4)、L-アラニンやL-セリンによって阻害されることが明らかとなった。³⁰⁾ この輸送特性はアミノ酸輸送システムASCと一致している。システムASCの分子実体としてASCT1及びASCT2が同定されている。^{31,32)} 実際にアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いASCT1及びASCT2の輸送特性を検討した結果、両分子ともにアスパラギン酸をL体選択的に輸送し、その輸送はNa⁺及びpH依存性であった。TM-BBB細胞には両分子のmRNA発現が検出されたが、ASCT2のmRNA発現量はASCT1と比較し6.7倍高かつ

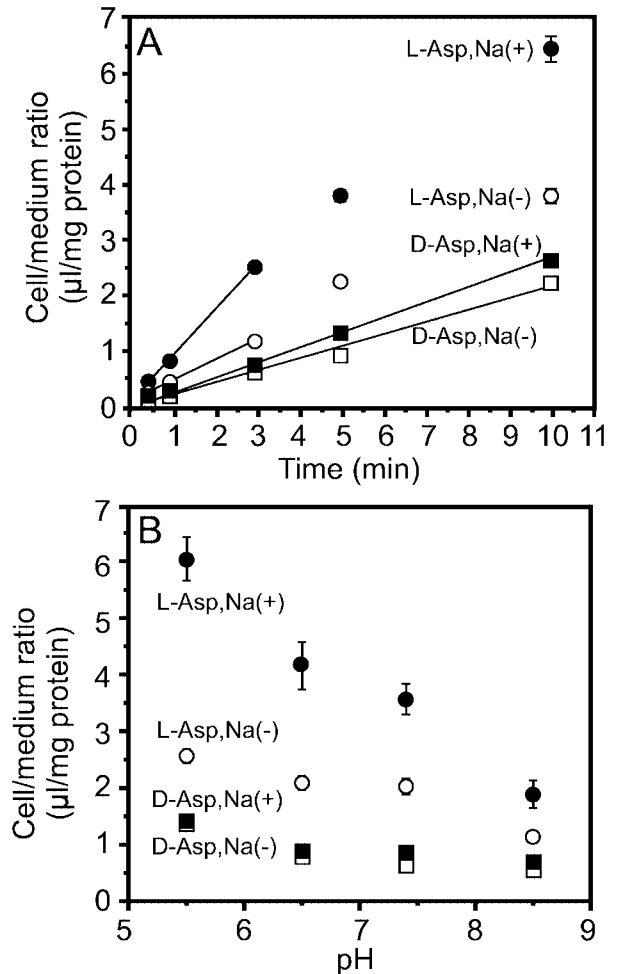


Fig. 4. Na⁺- (A) and pH-Dependence (B) of [³H]L-Asp and [³H]D-Asp Uptake by TM-BBB Cells

[³H]L-Asp and [³H]D-Asp uptake was performed in the presence or absence of Na⁺ (A), and at various pH conditions in the presence or absence of Na⁺ at 3 min (B). Each point represents the mean ± S.E. (n=3–4). Solid lines indicate optimal fits of the initial uptake rates. Closed and open circles represent [³H]L-Asp uptake in the presence and absence of Na⁺, respectively. Closed and open squares represent [³H]D-Asp uptake in the presence and absence of Na⁺, respectively. Na⁺- and pH-dependency was observed only in L-Asp uptake. Cited from Tetsuka *et al.*, *J. Neurochem.*, 87, 891–901 (2003).

た。さらに、免疫染色によってASCT2はマウス脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に局在していることを示した。また、ASCT1はマウス胎児、新生児期に脳毛細血管内皮細胞に発現し、その後、発生に伴い発現が低下することが報告されている。³³⁾ したがって、脳側細胞膜に発現するASCT2がL体選択的な脳関門アスパラギン酸排出輸送に関与していることが明らかとなった (Fig. 2)。

EAAT1, 2, 3が単離ウシ脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜面に検出された報告があることから、²⁸⁾ EAATもASCT2と同様にL-アスパラギン酸の脳

関門排出輸送に関わっている可能性が考えられる。ASCT2によるL-アスパラギン酸の輸送 ($K_m=9.33$ mM) はEAATによる輸送 ($K_m=2-64$ μ M) よりも低親和的である。TM-BBB細胞のNa⁺依存的なL-アスパラギン酸の取り込みは、低親和性の輸送と高親和性の輸送とで構成されており、それぞれがASCT2とEAATによる輸送であると考えられる。³⁰⁾しかし、一方でBEI法ではD-アスパラギン酸は脳からほとんど排出されなく、²⁷⁾この*in vivo*の結果はEAATによる輸送と一致しない。この矛盾点を解決するために、今後は、ASCT2とEAATのアスパラギン酸排出輸送に対する関与の大きさや、血液側膜に存在する排出輸送の特性をさらに解析する必要がある。

5. 神経伝達物質代謝物の脳関門排出輸送

ホモバニリン酸は、ドパミンの代謝物であり、その血中濃度や尿中濃度が脳内ドパミン作動性神経の活動の指標として利用されている。プロベネシドやオクタン酸を末梢に投与すると脳内のホモバニリン酸濃度が上昇する。^{34,35)}また、Brain microdialysis法を用いてホモバニリン酸の脳から血中への排出速度が血中から脳への供給速度よりも速いことが報告されている。³⁶⁾したがって、血液脳関門にはドパミン代謝物であるホモバニリン酸を排出する輸送系が存在し、ホモバニリン酸を血中に効率よく排出することで脳内での蓄積を防いでいると考えられる。ドパミンの異常はパーキンソン病や発作などの様々な中枢疾患と関連している。^{37,38)}また、ライ症候群や尿毒症性脳症の患者では、脳脊髄液中のホモバニリン酸濃度の著しい上昇が認められている。^{39,40)}脳関門ホモバニリン酸排出輸送の分子機構を明らかにすることは、脳内ドパミン代謝経路の最終段階を解明しドパミン異常を伴う中枢疾患における脳関門輸送の役割を理解するために必要である。

われわれは、BEI法を用いホモバニリン酸の脳関門を介した排出輸送を直接測定、解析した。⁴¹⁾その結果、ホモバニリン酸は半減期41分で脳から排出され、阻害剤の効果から有機アニオントランスポーター3(OAT3)の関与が示唆された。OAT3は楠原らによって同定され、⁴²⁾われわれも含む複数のグループが脳関門有機アニオン排出輸送に関わっていることを報告していたが、神経伝達物質代謝物の排出輸送への関与は不明であった。⁴³⁻⁴⁵⁾われわれは

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用い、ラット及びマウスOAT3がホモバニリン酸を輸送することを示した。^{41,46)}さらに、免疫染色によってOAT3がラット及びマウスの脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に局在していることを明らかにした。したがって、OAT3は、毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜側で脳細胞間液中からホモバニリン酸を内皮細胞内に取り込む過程に関わっている(Fig. 2)。神経伝達物質代謝物には、様々な有機アニオン化合物が含まれる。OAT3によるホモバニリン酸輸送は、Table 1に示すように神経伝達物質では阻害されなかったが、様々な神経伝達物質代謝物によって阻害された。阻害効果を示す化合物がかならずしも基質とはならないが、この結果は、OAT3がホモバニリン酸を含む様々な神経伝達物質代謝物の脳関門排出輸送に関わる可能性を示している。

ライ症候群の患者において脳脊髄液中のホモバニリン酸の濃度が上昇するが、一方で、尾状核でのドパミン濃度は変化しない。^{40,47)}このことは、ホモバニリン酸の蓄積が中枢症状と何らかの関連がある可能性を示している。ライ症候群の患者ではオクタン酸の血中及び脳内濃度の上昇が認められる。⁴⁸⁾われわれは、OAT3によるホモバニリン酸輸送がオクタン酸によって阻害されることを明らかにした(Table 1)。したがって、ライ症候群の患者において、オクタン酸によってOAT3を介する脳関門ホモバニリン酸排出輸送が阻害されることが、ホモバニリン酸の脳内蓄積の1つの原因になっていると考えられる。

OAT3は脳関門においてホモバニリン酸の排出だけでなく尿毒症物質であるインドキシル硫酸や抗腫瘍薬である6-mercaptopurine(6-MP)や6-thioguanine(6-TG)の排出に関与していることをわれわれは明らかにした。^{45,49)}インドキシル硫酸は腎不全時に体内に蓄積する。脳関門排出輸送はインドキシル硫酸の脳への移行を抑制し、毒性から中枢を防御していると考えられる(Fig. 2)。6-MPや6-TGは小児性急性リンパ性白血病の寛解維持期間中に投与されることが多いが、投与中に脳内で白血病細胞が増殖し白血病が再発するという症例が報告されている。これは、6-MPや6-TGの脳移行性が低く、脳内で白血病細胞の増殖を抑える濃度を維持できないためと考えられる。⁵⁰⁾実際にmicrodialysis法を用

Table 1. Effect of Various Compounds on [³H]HVA Uptake by Rat OAT3

Inhibitors	No. studied	% of control ^{a)}
Control	9	100±19
Control ^{b)}	9	100±17
Metabolites of monoamine neurotransmitters		
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	6	50.7±25.6**
Vanillylmandelic acid	6	53.5±21.4*
3,4-Dihydroxymandelic acid	6	62.7±24.7
4-Hydroxy-3-methoxyphenylglycol	8	49.3±34.5**
5-Hydroxyindoleacetic acid	8	40.5±30.0**
5-Methoxytryptophol	7	24.7±19.4**
Imidazole-4-acetic acid	6	47.6±24.1**
1-Methyl-4-imidazolic acid	7	48.6±35.7**
Monoamine neurotransmitters		
Dopamine ^{b)}	7	106±34
Norepinephrine ^{b)}	7	106±36
Serotonin ^{b)}	8	113±19
Histamine ^{b)}	6	102±28
Others		
Octanoic acid	5	10.6±18.5**

The [³H]HVA uptake (200 nM) study was performed at 1 h in the presence or absence of inhibitors. Rat OAT3-mediated transport was obtained by subtracting the transport rate in water-injected oocytes from that in rat OAT3 cRNA-injected oocytes. All inhibitors were used at a concentration of 1 mM. a) Each value represents the mean±S.D. (percent of control). b) The [³H]HVA uptake was investigated using ND96 solution containing 100 μM ascorbic acid, 100 μM pargyline and 10 μM U0521 to avoid oxidation and metabolism. * $p < 0.05$, significantly different from control. ** $p < 0.01$, significantly different from control. Cited from Mori et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23, 432–440 (2003).

いて 6-MP の脳から血中への排出輸送速度が血中から脳への供給輸送速度の 20 倍速いことが報告されている。⁵¹⁾ したがって OAT3 は 6-MP 及び 6-TG の排出輸送に関わることで、これら薬物の脳移行性の制限に大きな役割を果たしている (Fig. 2)。以上のように、血液脳関門において OAT3 は神経伝達物質代謝物の排出、内因性毒性物質からの防御、薬物の脳移行性制限と複数の重要な生理機能を有している。ヒト OAT3 の cDNA は同定されているが⁵²⁾ ヒト血液脳関門での発現や機能は不明である。したがって、今後ヒトにおいて OAT3 の役割を明らかにしていくことが薬物の脳関門透過の点でも重要である。

6. 神経制御因子の脳関門排出輸送

脳関門輸送は、神経制御因子の排出にも関与しており、制御因子の機能発現のために脳内レベルを低く保つ機構として機能していると考えられる。デヒドロエピアンドロステロン硫酸 (DHEAS) は

GABA 受容体などに作用し、記憶や学習の増強、興奮性神経毒性からの保護の機能を有している。⁵³⁾ われわれは BEI 法を用い DHEAS が脳から排出されること、さらにその排出輸送に organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) が関わっていることを阻害剤効果から示唆した (Fig. 2)。⁵⁴⁾ Gao らは、oatp2 が脳毛細血管内皮細胞の血液と脳の両側細胞膜に局在していることを報告している。⁵⁵⁾ さらに、oatp2 は、cyclic opioid pentapeptide である [D-penicillamine2,5]enkephalin (DPDPE) の脳への移行に関わっていることが報告され、⁵⁶⁾ oatp2 は血液脳関門において供給と排出の両方向で機能している。血液脳関門では oatp2 以外に oatp3 や oatp14、ヒトにおいては OATP-A の発現と局在が報告されており、^{57–59)} 甲状腺ホルモンの脳移行への関与も示唆されている。⁶⁰⁾ したがって、今後サブタイプ間の発現や脳内局在の比較、そして脳関門輸送への関与の比較が脳関門における oatp ファミリーの機能を理解する上で必要である。

アミノ酸輸送システム A は、L-アラニン、L-プロリン、グリシンなどの小型中性アミノ酸を輸送する。グリシンは NMDA 受容体の制御因子として機能し、L-プロリンも NMDA 受容体や AMPA 受容体に作用する。さらに、小型中性アミノ酸は浸透圧制御因子としても機能し、複数の細胞で高浸透圧によってシステム A の機能が誘導されることが報告されている。⁶¹⁾ システム A が脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜に存在することが、単離ラット脳毛細血管やウシ脳毛細血管内皮細胞の脳側細胞膜小胞を用いた取り込み実験によって示唆されていた。^{62,63)} われわれは、BEI 法を用い L-プロリンやグリシンが血液脳関門を介して脳から排出されることを *in vivo* で示した。⁶⁴⁾ さらに、脳関門小型中性アミノ酸輸送の分子機構を条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞 (TR-BBB) を用い解析を行った結果、TR-BBB 細胞は L-プロリンを取り込む活性を有し、その取り込み活性は Na⁺ 依存的であり、アミノ酸による阻害効果はシステム A と一致した。システム A の分子実体として ATA1 (GlnT; SAT1; SLC38A1), ATA2 (SAT2; SA1; SLC38A2), ATA3 (SLC38A4) が同定されている。^{65–69)} TR-BBB 細胞にはすべてのサブタイプの発現が認められたが、ATA2 の mRNA 発現は ATA1, ATA3 と比較して

それぞれ 93 倍, 2140 倍高かった. これらの結果は, ATA2 が脳関門のシステム A 排出系として機能していることを示唆している (Fig. 2). また, TR-BBB 細胞の ATA2 mRNA 発現とシステム A 輸送活性は高浸透圧処理によって誘導された. この結果は, 血液脳関門のシステム A 輸送系は周囲の浸透圧によって制御を受けていることを示唆している. 中枢の浸透圧変化は脳浮腫の原因となることから, 脳内の浸透圧の維持は中枢環境の維持という観点から重要である. したがって, 浸透圧による脳関門 ATA2 の発現と機能の制御は, 脳内の浸透圧制御及び脳毛細血管内皮細胞の細胞容積の制御を行うことで脳環境と脳関門機能の維持に関わっていると考えられる.

7. 脳関門輸送系の制御分子機構

血液脳関門輸送系が「中枢維持防御システム」として中枢環境を維持・制御するためには, 中枢や循環血中の状態を反映する因子によって輸送系が制御される必要がある. 既に, エネルギー輸送系である GLUT1 や MCT1 の血液脳関門での発現が栄養状態によって変化することが報告されている.^{4,5)} また, 上記のように血液脳関門の ATA2 は浸透圧によって制御を受ける.⁶⁴⁾ 現在, 脳関門輸送系に関わる分子の解析が進行しているが, その次は, それら輸送分子の制御機構の解明が中枢における血液脳関門の生理機構と中枢疾患との関連を理解する上で必要である.

タウリンは脳内に豊富に存在する β アミノ酸であり, 中枢において浸透圧制御, 神経機能制御, 神経保護作用などの機能を有している.^{70,71)} ウシ脳毛細血管内皮細胞の初代培養細胞を用いた解析で, 脳毛細血管内皮細胞の脳側及び血液側の両方にタウリン輸送系が存在していることが報告されている.⁷²⁾ このタウリン輸送系は, 脳へのタウリンの供給と脳内タウリンレベルの維持に関わっていると考えられる. われわれは, タウリンの機能である浸透圧制御と神経保護に注目し血液脳関門におけるタウリン輸送の制御を解析した.⁷³⁾ TR-BBB 細胞においてタウリントランスポーター (TAUT) の mRNA 及び蛋白の発現が検出された. したがって, 血液脳関門のタウリン輸送に TAUT が関わっていることが示唆された. さらに, 高張処理によって TR-BBB 細胞のタウリン取り込み活性と TAUT mRNA 発現の誘

導が検出された (Fig. 5). この結果は, ATA2 と同様に TAUT を介した脳関門タウリン輸送は中枢浸透圧制御に関わっていることを示唆している.

タウリンは興奮性神経毒性や酸化ストレスに対して神経保護作用を発揮し, さらに, 虚血時に脳細胞間液中の濃度が上昇することが報告されている.⁷⁴⁻⁷⁶⁾ そこで, われわれは脳障害による脳関門タウリン輸送の制御が脳内のタウリンレベルに影響していると考え, 障害に関連する因子として TNF- α , LPS と diethyl maleate (DEM) の脳関門タウリ

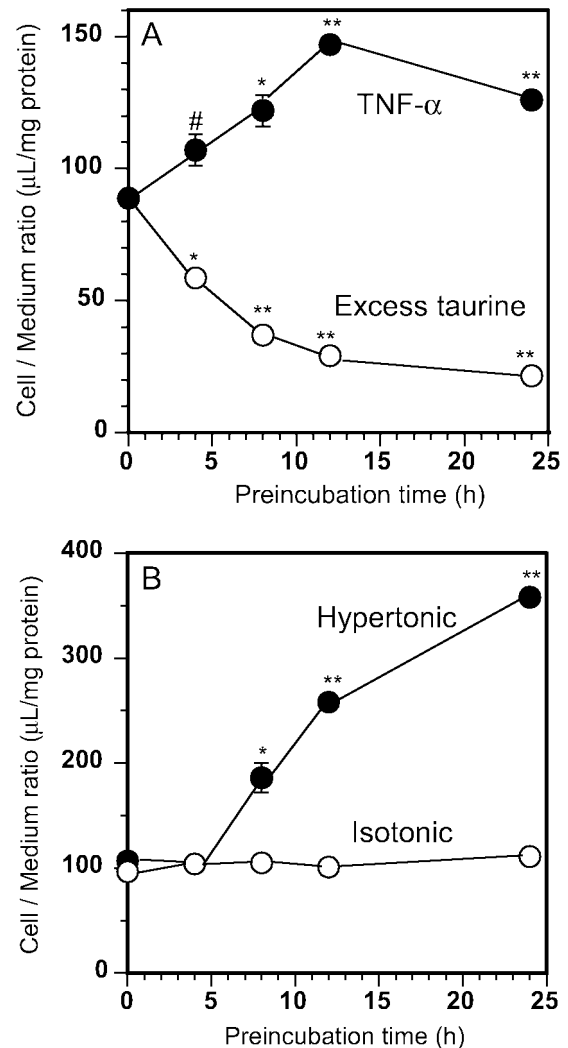


Fig. 5. Treatment Time-Course of the Effect of TNF- α , Unlabelled Taurine Pretreatment (A) or Hypertonic Conditions (B) on $[^3\text{H}]$ Taurine Uptake by TR-BBB Cells

(A) 20 ng/ml TNF- α (closed circle) or 50 mM taurine (open circle) was preincubated for the time period in the figure. (B) The $[^3\text{H}]$ taurine uptake was measured for 5 min in TR-BBB13 cells, exposed for the indicated period to an isotonic (280 mOsm/kg) medium (open circle) or hypertonic (380 mOsm/kg) medium (closed circle) obtained by adding 100 mM raffinose. Each point represents the mean \pm S.E. ($n=3-4$). $^{\#}p<0.05$, $^*p<0.01$, $^{**}p<0.001$, significantly different from time=0 or isotonic conditions. Cited from Kang et al., *J. Neurochem.*, **83**, 1188-1195 (2002).

ン輸送に対する効果を検討した.⁷³⁾ これらの因子のうち TNF- α によって TR-BBB 細胞のタウリン取り込み活性と TAUT mRNA 発現が誘導された (Fig. 5). TNF- α は脳虚血や外傷性脳障害によって脳内に誘導される. したがって, 脳関門タウリン輸送は, 脳障害に対応して TNF- α によって誘導されると考えられる. 脳毛細血管内皮細胞の初代培養細胞を用いた解析で血液側からのタウリン取り込み速度は脳側からよりも 2 倍早いことが報告されている.⁷²⁾ したがって, 今後, TAUT の発現制御によって, 脳側, 血液側どちらのタウリン輸送活性が制御されるかを明らかにすることが, 血液脳関門におけるタウリン輸送制御の役割を理解するために必要である.

われわれは, DEM 処理によって血液脳関門におけるアミノ酸輸送システム x_c^- が誘導されることを明らかにした.⁷⁷⁾ また, この誘導には, 4F2hc と複合体を形成することでシステム x_c^- として機能する xCT の発現誘導を伴っていることを示した.⁷⁸⁾ システム x_c^- は L-シスチンと L-グルタミン酸の交換輸送系である. L-シスチンの還元型である L-システインの細胞への供給はグルタチオン生合成の律速段階の 1 つである.⁷⁹⁾ グルタチオンはフリーラジカル, 過酸化物質や様々な毒性物質から細胞を防御する機能を有しており,⁸⁰⁾ DEM は細胞内グルタチオンを欠乏させることで酸化ストレスを誘起する. したがって, 血液脳関門における xCT の誘導は脳内グルタチオン量を上昇させ, 酸化ストレスなどから中枢機能を保護していることが考えられる. 以上の TAUT や xCT の制御に関する解析の結果から, 脳関門輸送の制御の生理機能の 1 つは中枢の障害や変成からの保護であると考えられる.

8. おわりに

血液脳関門の輸送分子機構を理解することは中枢作動薬の開発にとって重要なことである. しかし, 血液脳関門機能における薬物輸送は, その生理機能の一部でしかすぎない. 本稿で述べてきたように, われわれは脳関門輸送機構を中枢環境の維持に必要なシステムとしての観点から解析を行った結果, 内因性物質の輸送機構やその制御機構といった血液脳関門の機能の新たな一面を明らかにすることができた. さらに, これらの結果は, 単に内因性物質の輸送系の解明にとどまらず, 新たな薬物輸送系の解明

につながり, さらに血液脳関門の輸送機構と中枢疾患の関連性を示唆する結果となった. このことから, 今後, 脳関門研究は神経科学分野を含むさらに多くの分野の研究者と技術を投入する必要がある薬学や脳科学領域における重要領域と考えられる. このような異なる分野と観点からの解析は, 脳関門機能に関する知見を充実させ, そして, 将来, 脳への薬物送達の実現と中枢作動薬の開発に大きく貢献できるであろう.

謝辞 本研究は, 東北大学大学院薬学研究科において行ったものであり, 終始あたたかいご指導, ご鞭撻を賜りました寺崎哲也教授, 細谷健一教授に深く感謝いたします. また, 本研究において指導, 協力頂きました高長ひとみ博士, 堀 里子博士そして多くの共同研究者と研究室の皆様にご心より御礼申し上げます. また, 本研究の一部は日本学術振興会科学研究補助金, 上原記念生命科学財団, 日産科学振興財団, 東京生化学研究会, 新エネルギー・産業技術開発機構産業技術研究助成事業の援助により行われたものであり, ここに感謝の意を表します.

REFERENCES

- 1) Cornford E. M., *Mol. Physiol.*, **7**, 219-259 (1985).
- 2) Schinkel A. H., Smit J. J., van Tellingen O., Beijnen J. H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C. A., van der Valk M. A., Robanus-Maandag E. C., te Riele H. P., Berns A. J., Borst P., *Cell*, **77**, 491-502 (1994).
- 3) Tsuji A., Terasaki T., Takabatake Y., Tenda Y., Tamai I., Yamashita T., Moritani S., Tsuruo T., Yamashita J., *Life Sci.*, **51**, 1427-1437 (1992).
- 4) Cornford E. M., Hyman S., Pardridge W. M., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 841-854 (1993).
- 5) Pellerin L., Pellegrini G., Martin J. L., Magistretti P. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3990-3995 (1998).
- 6) Ohtsuki S., Tachikawa M., Takanaga H., Shimizu H., Watanabe M., Hosoya K., Terasaki T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 1327-1335 (2002).
- 7) Marescau B., Deshmukh D. R., Kockx M.,

- Possemiers I., Qureshi I. A., Wiechert P., De Deyn P. P., *Metabolism*, **41**, 526–532 (1992).
- 8) Schulze A., Hess T., Wevers R., Mayatepek E., Bachert P., Marescau B., Knopp M. V., De Deyn P. P., Bremer H. J., Rating D., *J. Pediatr.*, **131**, 626–631 (1997).
- 9) Pettegrew J. W., Panchalingam K., Klunk W. E., McClure R. J., Muenz L. R., *Neurobiol. Aging*, **15**, 117–132 (1994).
- 10) Dechent P., Pouwels P. J., Wilken B., Hanefeld F., Frahm J., *Am. J. Physiol.*, **277**, R698–704 (1999).
- 11) Braissant O., Henry H., Loup M., Eilers B., Bachmann C., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **86**, 193–201 (2001).
- 12) Hosoya K., Tetsuka K., Nagase K., Tomi M., Saeki S., Ohtsuki S., Takanaga H., Yanai N., Obinata M., Kikuchi A., Okano T., Terasaki T., *AAPS Pharm. Sci.*, **2**, E27 (2000).
- 13) Terasaki T., Ohtsuki S., Hori S., Takanaga H., Nakashima E., Hosoya K., *Drug Discov. Today*, **8**, 944–954 (2003).
- 14) Salomons G. S., van Dooren S. J., Verhoeven N. M., Cecil K. M., Ball W. S., Degrauw T. J., Jakobs C., *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 1497–1500 (2001).
- 15) Cecil K. M., Salomons G. S., Ball Jr. W. S., Wong B., Chuck G., Verhoeven N. M., Jakobs C., DeGrauw T. J., *Ann. Neurol.*, **49**, 401–404 (2001).
- 16) Wyss M., Kaddurah-Daouk R., *Physiol. Rev.*, **80**, 1107–1213 (2000).
- 17) Takanaga H., Ohtsuki S., Hosoya K., Terasaki T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 1232–1239 (2001).
- 18) Kakee A., Terasaki T., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 1550–1559 (1996).
- 19) Kakee A., Takanaga H., Terasaki T., Naito M., Tsuruo T., Sugiyama Y., *J. Neurochem.*, **79**, 110–118 (2001).
- 20) Hardebo J. E., Owman C., *Acta Physiol. Scand.*, **108**, 223–229 (1980).
- 21) Spatz M., Maruki C., Abe T., Rausch W. D., Abe K., Merkel N., *Brain Res.*, **220**, 214–219 (1981).
- 22) Wakayama K., Ohtsuki S., Takanaga H., Hosoya K., Terasaki T., *Neurosci. Res.*, **44**, 173–180 (2002).
- 23) Ganapathy V., Prasad P. D., Ganapathy M. E., Leibach F. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 413–420 (2000).
- 24) Balkovetz D. F., Tiruppathi C., Leibach F. H., Mahesh V. B., Ganapathy V., *J. Biol. Chem.*, **264**, 2195–2198 (1989).
- 25) Wolosker H., Panizzutti R., De Miranda J., *Neurochem. Int.*, **41**, 327–332 (2002).
- 26) Zorumski C. F., Olney J. W., *Pharmacol. Ther.*, **59**, 145–162 (1993).
- 27) Hosoya K., Sugawara M., Asaba H., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **73**, 1206–1211 (1999).
- 28) O’Kane R. L., Martinez-Lopez I., DeJoseph M. R., Vina J. R., Hawkins R. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 31891–31895 (1999).
- 29) Palacin M., Estevez R., Bertran J., Zorzano A., *Physiol. Rev.*, **78**, 969–1054 (1998).
- 30) Tetsuka K., Takanaga H., Ohtsuki S., Hosoya K., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **87**, 891–901 (2003).
- 31) Arriza J. L., Kavanaugh M. P., Fairman W. A., Wu Y. N., Murdoch G. H., North R. A., Amara S. G., *J. Biol. Chem.*, **268**, 15329–15332 (1993).
- 32) Utsunomiya-Tate N., Endou H., Kanai Y., *J. Biol. Chem.*, **271**, 14883–14890 (1996).
- 33) Sakai K., Shimizu H., Koike T., Furuya S., Watanabe M., *J. Neurosci.*, **23**, 550–560 (2003).
- 34) Emanuelsson B. M., Paalzow L., Sunzel M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 705–710 (1987).
- 35) Kim C. S., Roe C. R., Mann J. D., Breese G. R., *J. Neurochem.*, **58**, 1499–1503 (1992).
- 36) Morrison P. F., Morishige G. M., Beagles K. E., Heyes M. P., *J. Neurochem.*, **72**, 2135–2144 (1999).
- 37) Giroud M., Dumas R., Dauvergne M., D’Athis P., Rochette L., Beley A., Bralet J., *Epilepsia*, **31**, 178–181 (1990).
- 38) Le Witt P. A., Galloway M. P., “Neurochemical Markers of Parkinson’s Disease,” *Therapy of Parkinson’s Disease*, eds. by Koller W. C., Paulson G., Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 63–93.
- 39) Sullivan P. A., Murnaghan D., Callaghan N., Kantamaneni B. D., Curzon G., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **41**, 581–588 (1978).
- 40) Shaywitz B. A., Venes J., Cohen D. J., Bowers M. B., *Neurology*, **29**, 467–472 (1979).
- 41) Mori S., Takanaga H., Ohtsuki S., Deguchi

- T., Kang Y. S., Hosoya K., Terasaki T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 432–440 (2003).
- 42) Kusuhara H., Sekine T., Utsunomiya-Tate N., Tsuda M., Kojima R., Cha S. H., Sugiyama Y., Kanai Y., Endou H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 13675–13680 (1999).
- 43) Sugiyama D., Kusuhara H., Shitara Y., Abe T., Meier P. J., Sekine T., Endou H., Suzuki H., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 316–322 (2001).
- 44) Kikuchi R., Kusuhara H., Sugiyama D., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 51–58 (2003).
- 45) Ohtsuki S., Asaba H., Takanaga H., Deguchi T., Hosoya K., Otagiri M., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **83**, 57–66 (2002).
- 46) Ohtsuki S., Kikkawa T., Mori S., Hori S., Takanaga H., Otagiri M., Terasaki T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 1273–1281 (2004).
- 47) Lloyd K. G., Davidson L., Price K., McClung H. J., Gall D. G., *Neurology*, **27**, 985–988 (1977).
- 48) Oldendorf W. H., *Am. J. Physiol.*, **224**, 1450–1453 (1973).
- 49) Mori S., Ohtsuki S., Takanaga H., Kikkawa T., Kang Y. S., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **90**, 931–941 (2004).
- 50) Jacqz-Aigrain E., Nafa S., Medard Y., Bessa E., Lescoeur B., Vilmer E., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **53**, 71–74 (1997).
- 51) Deguchi Y., Yokoyama Y., Sakamoto T., Hayashi H., Naito T., Yamada S., Kimura R., *Life Sci.*, **66**, 649–662 (2000).
- 52) Race J. E., Grassl S. M., Williams W. J., Holtzman E. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **255**, 508–514 (1999).
- 53) Wolf O. T., Kirschbaum C., *Brain Res. Rev.*, **30**, 264–288 (1999).
- 54) Asaba H., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S., Tamura E., Takizawa T., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **75**, 1907–1916 (2000).
- 55) Gao B., Stieger B., Noe B., Fritschy J. M., Meier P. J., *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 1255–1264 (1999).
- 56) Dagenais C., Ducharme J., Pollack G. M., *Neurosci. Lett.*, **301**, 155–158 (2001).
- 57) Sugiyama D., Kusuhara H., Taniguchi H., Ishikawa S., Nozaki Y., Aburatani H., Sugiyama Y., *J. Biol. Chem.*, **278**, 43489–43495 (2003).
- 58) Gao B., Hagenbuch B., Kullak-Ublick G. A., Benke D., Aguzzi A., Meier P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 73–79 (2000).
- 59) Ohtsuki S., Takizawa T., Takanaga H., Hori S., Hosoya K., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **90**, 743–749 (2004).
- 60) Tohyama K., Kusuhara H., Sugiyama Y., *Endocrinology*, (2004).
- 61) Alfieri R. R., Petronini P. G., Bonelli M. A., Caccamo A. E., Cavazzoni A., Borghetti A. F., Wheeler K. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 174–178 (2001).
- 62) Betz A. L., Goldstein G. W., *Science*, **202**, 225–227 (1978).
- 63) Sanchez del Pino M. M., Peterson D. R., Hawkins R. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 14913–14918 (1995).
- 64) Takanaga H., Tokuda N., Ohtsuki S., Hosoya K., Terasaki T., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1289–1296 (2002).
- 65) Varoqui H., Zhu H., Yao D., Ming H., Erickson J. D., *J. Biol. Chem.*, **275**, 4049–4054 (2000).
- 66) Sugawara M., Nakanishi T., Fei Y. J., Huang W., Ganapathy M. E., Leibach F. H., Ganapathy V., *J. Biol. Chem.*, **275**, 16473–16477 (2000).
- 67) Reimer R. J., Chaudhry F. A., Gray A. T., Edwards R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7715–7720 (2000).
- 68) Yao D., Mackenzie B., Ming H., Varoqui H., Zhu H., Hediger M. A., Erickson J. D., *J. Biol. Chem.*, **275**, 22790–22797 (2000).
- 69) Sugawara M., Nakanishi T., Fei Y. J., Martindale R. G., Ganapathy M. E., Leibach F. H., Ganapathy V., *Biochim. Biophys. Acta*, **1509**, 7–13 (2000).
- 70) Tuz K., Ordaz B., Vaca L., Quesada O., Pasantes-Morales H., *J. Neurochem.*, **79**, 143–151 (2001).
- 71) Oja S. S., Saransaari P., *Metab. Brain Dis.*, **11**, 153–164 (1996).
- 72) Tamai I., Senmaru M., Terasaki T., Tsuji A., *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1783–1793 (1995).
- 73) Kang Y. S., Ohtsuki S., Takanaga H., Tomi M., Hosoya K., Terasaki T., *J. Neurochem.*

- 83**, 1188–1195 (2002).
- 74) French E. D., Vezzani A., Whetsell Jr. W. O., Schwarcz R., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **203**, 349–362 (1986).
- 75) Boldyrev A. A., Johnson P., Wei Y., Tan Y., Carpenter D. O., *Neurosci. Lett.*, **263**, 169–172 (1999).
- 76) Matsumoto K., Lo E. H., Pierce A. R., Halpern E. F., Newcomb R., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 114–124 (1996).
- 77) Hosoya K., Saeki S., Terasaki T., *Microvasc. Res.*, **62**, 136–142 (2001).
- 78) Tomi M., Hosoya K., Takanaga H., Ohtsuki S., Terasaki T., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 774–779 (2002).
- 79) Bannai S., Tateishi N., *J. Membr. Biol.*, **89**, 1–8 (1986).
- 80) Meister A., Anderson M. E., *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711–760 (1983).