

研究最前線

血液網膜関門輸送研究

富山大学大学院医学薬学研究部

細谷 健一

1 はじめに

網膜は光の物理的エネルギーを電気信号に変換して脳に伝達する神経組織である。神経細胞同士が結合して作られる神経回路網は、イオンや神経伝達物質の細胞膜を挟んだ移動による信号を介して神経伝達を行っているため、網膜内の恒常性は厳密に維持する必要がある。そのため、網膜には血液網膜関門 (blood-retinal barrier; BRB) が存在し、全身循環・網膜間の物質移動の他、網膜の外側に位置する脈絡膜および強膜と網膜間の物質移動を制御している。さらに、BRB は網膜毛細血管内皮細胞を実体とする内側血液網膜関門 (inner BRB) および網膜色素上皮細胞を実体とする外側血液網膜関門 (outer BRB) の構造的に異なる二つの関門によって構成されている (図1)¹⁾。

糖尿病網膜症に代表される網膜疾患は失明へと結びつくため、その治療は極めて重要な課題である。しかし、網膜へのドラッグデリバリーは極めて難しく、網膜疾患に対する薬物治療は眼科領域の大きな弱点となっている。代表的な眼への薬物投与法は点眼であるが、点眼薬物の大部分は涙液で希釈されて鼻涙管を介して排出され、さらに角膜および結膜の

有する関門機能によって眼球内部への薬物移行は制限されることから、網膜にほとんど到達しない²⁾。硝子体内投与した薬物は網膜へ到達可能であり、網膜疾患の治療に用いられているが、患者への負担が大きく、硝子体出血や網膜剥離などの合併症も懸念される。

BRB を介した物質輸送機構の解明は、循環血液から網膜への薬物移行性を理解し、網膜へのドラッグデリバリーを達成する上で重要である。しかし、網膜は微小部位であるために解析手法が限られ、物質輸送機構はほとんど明らかにされていなかった。本稿では、新たな解析手法を開発・導入することで明らかにしてきた、inner BRB を介した物質輸送の分子機構について紹介する。

2 血液網膜関門輸送の解析手法確立

2.1 条件的不死化網膜関門細胞株の樹立

小腸の薬物吸収機構解析および薬物透過スクリーニング解析には Caco-2 細胞が繁用されているように、BRB の輸送機構を解析するためには、繁用できる in vitro 系が必要である。これまで、網膜毛細血管内皮細胞の初代培養にはウシの網膜が用いられてきたが、日本では牛海綿状脳症の規制で用いることが不可能である。網膜は微小組織であり、特に網膜に分散して存在する inner BRB はラット等の小動物から単離して毎回初代培養することは非常に困難である。初代培養系を用いた研究には限界に到達していた。これらを解決し、網膜への薬物送達を可能にするには、in vivo 特性を備えた in vitro 系の開発がその後の研究発展に大きく左右する。このような背景に基づき、新しい in vitro モデルの研究開発に取り組んできた。初代培養系の問題は、温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックラット (TG ラット) を用いて網膜関門細胞株を樹立することで解決できた。TG ラットを用いると 33 度で細胞の増殖が促進されるので、微小組織である inner BRB 細胞でも少数の動物から細胞株の樹立が可能で最大の利点である。この細

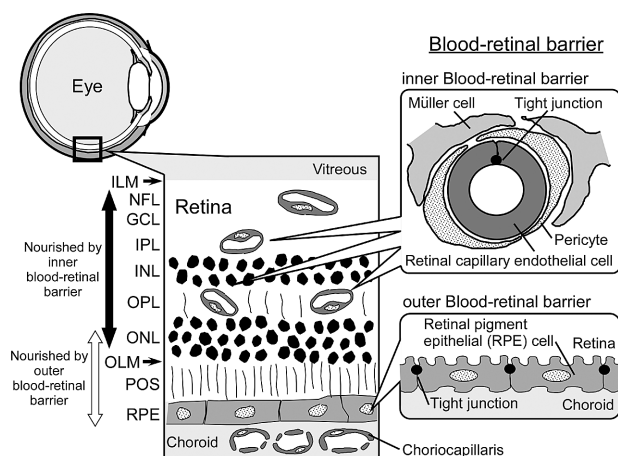


図1 血液網膜関門の解剖学的構造

胞株は、37 または 39 度では細胞増殖が停止する条件的不死化細胞であり、樹立した網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB) は内皮細胞マーカーやすでに inner BRB に局在が知られている GLUT1, MCT1 および P-糖タンパク質の発現ならびに輸送機能が示されており, in vivo の特性を比較的保持していた^{3,4)}。さらに, inner BRB の内皮細胞の周囲をペリサイトおよび Müller 細胞で覆われており, inner BRB の関門機能にはこれらの細胞が関与しているため, 共培養系の構築に向けてペリサイト株 (TR-rPCT) および Müller 細胞株 (TR-MUL) を樹立した (図 2)^{5,6)}。

2.2 Ex vivo inner BRB における遺伝子発現定量法の確立

In vitro モデル細胞株は実験を簡便に行うことが可能であり, 極めて有用であるが, 遺伝子発現量が in vivo を完全に反映しているとは限らない。Inner BRB における輸送担体遺伝子発現量を簡便かつ網羅的に解析できれば, inner BRB を介した物質輸送の分子機

構を理解する上で極めて有用な情報となる。そのため, inner BRB における遺伝子発現量を ex vivo で解析することを目的とし, 磁気標識抗 CD31 (内皮細胞特異的表面抗原) 抗体を用いた inner BRB 高純度単離法を確立した。マウス抗ラット CD31 抗体と磁気標識抗マウス IgG を混合し, 磁気標識抗 CD31 抗体を調製した。ラット網膜ホモジネートを酵素処理後, 磁気標識抗 CD31 抗体と混合して内皮細胞を磁気標識し, 磁石を用いて内皮細胞画分を非内皮細胞画分と分離した。各々の RNA を抽出し, リアルタイム定量 PCR 法を用いて遺伝子発現量を定量した結果, 内皮細胞画分での inner BRB マーカー (CD31, Tie-2, mdr1a, claudin-5, occludin, および junctional adhesion molecule) 発現量は, 非内皮細胞画分と比較して 100 倍以上高いことが示された。したがって, 磁気標識抗 CD31 抗体を利用することによって inner BRB が高純度に単離可能であり, inner BRB における発現分子を解析する上で有用性が高い手法であることが示された (図 2)⁷⁾。

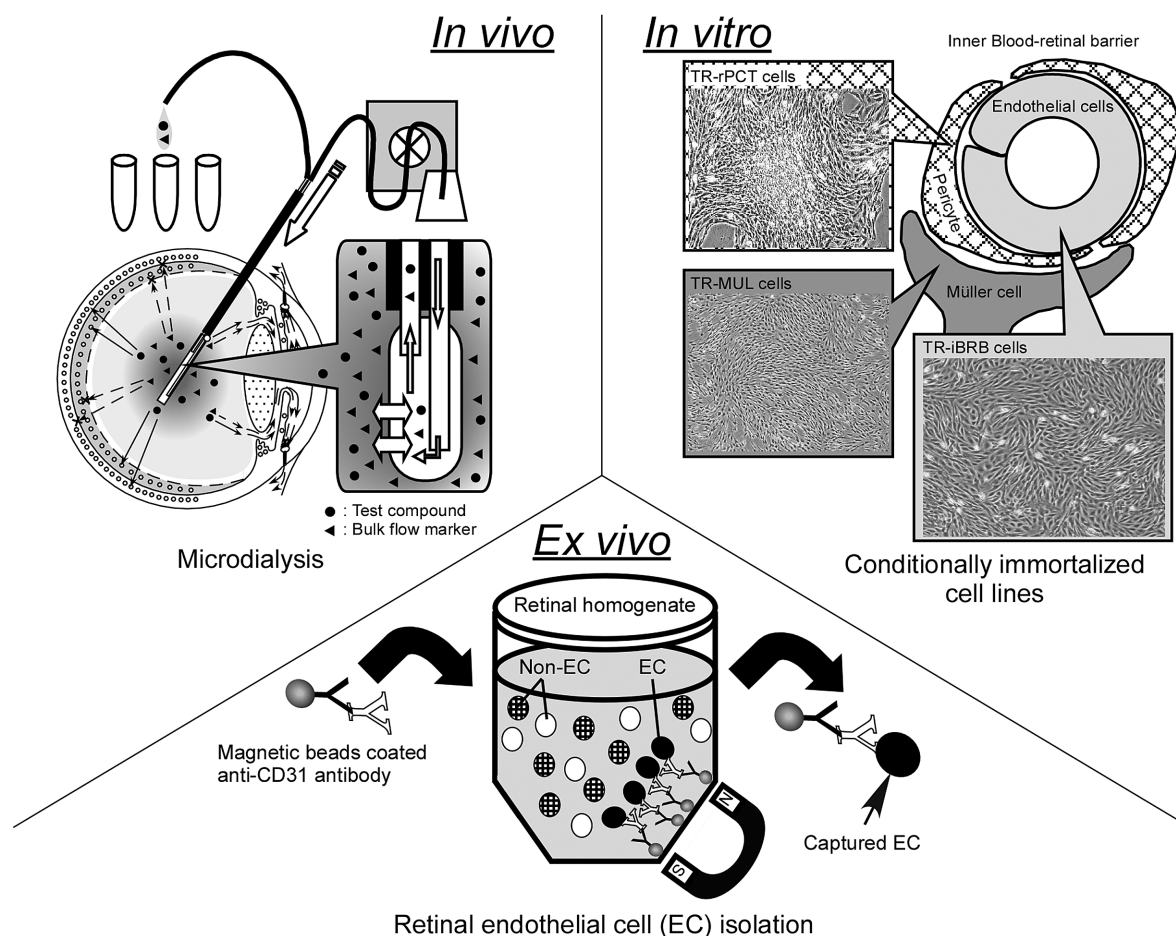


図 2 新規血液網膜関門解析手法

2.3 In vivo 網膜からの排出輸送機構解析法の確立

薬物の網膜移行性を考える場合には、脂溶性に応じて BRB を透過した異物を再び循環血液に能動的に汲み出す排出輸送機構の寄与について生理的条件下で解明することが重要である。循環血液から網膜方向への輸送を解析する手法としては retinal uptake index 法が開発されているが、網膜からの排出輸送を解析する手法は開発されていなかった。筆者らはラットにおいて硝子体内に microdialysis プローブを挿入し、眼球内濃度を経時的に測定することによって網膜からの排出輸送を解析することに成功した(図2)⁸⁾。

3 血液網膜関門輸送の分子機構

3.1 網膜必須物質供給機構

網膜は神経組織であり、さらに体内でも光による酸化ストレスが高い臓器である。このような観点から、神経伝達物質の前駆物質、抗酸化作用物質およびエネルギー恒常性維持物質の供給機構について解析を行っている。

Vitamin C の血液から網膜への輸送は、ラットにおける見かけの網膜取り込みクリアランスおよび TR-iBRB 細胞における輸送機能解析から、還元型 ascorbic acid (AA) を輸送する Na⁺-dependent vitamin C transporter (SVCT1 および SVCT2) でなく、酸化型 ascorbic acid である dehydroascorbic acid (DHAA) を輸送する GLUTs によって輸送されていることが示唆された。さらに、磁気分離したラット網膜血管内皮細胞画分において、GLUT1 mRNA 発現量は GLUT3 および 4 に対して 100 倍以上高いことが示された。したがって、vitamin C は主に DHAA として inner BRB に発現する GLUT1 を介して網膜に供給されていることが示唆された⁹⁾。

必須アミノ酸である L-leucine は、神経伝達物質 L-glutamate の網膜における主要な前駆体であり、タンパク合成においても不可欠である。網膜内 L-glutamate は専ら網膜内で合成されており、L-leucine の inner BRB を介した網膜への供給機構解明は重要である。ラットにおける見かけの網膜取り込みクリアランスおよび TR-iBRB 細胞を用いた輸送機能解析から、inner BRB における L-leucine の輸送には、L-type amino acid transporter 1 (LAT1) が主に機能していることが示唆された。本結果は、磁気分離したラット網膜血管内皮細胞画分における LAT1 mRNA 発現量が LAT2 に比べて 15 倍高いことと、および免疫染色で LAT1 が発現していることと一致し

た¹⁰⁾。LAT1 はアミノ酸の構造類似薬物を輸送していることで知られており、inner BRB の LAT1 を介した網膜への薬物送達研究を展開している。

Inner BRB では GLUT1 を介した vitamin C 輸送系、LAT1 を介した中生アミノ酸輸送系以外に、xCT を介した L-cystine 輸送系と抗酸化物質であるグルタチオン生合成¹¹⁾、CRT を介したクレアチン輸送系¹²⁾ および ENT を介したアデノシン輸送系¹³⁾ などが機能し、網膜への必須物質供給を担っていることが明らかとなった(図3)。

3.2 有機アニオン排出輸送機構

網膜内神経伝達物質およびステロイドホルモンの代謝物の多くは有機アニオンであるが、これら化合物は最終的に BRB を介して排出される必要がある。また、網膜への薬物移行性を予測する上でも BRB における有機アニオン輸送機構を明らかにすることは重要である。ステロイドホルモン代謝物である [³H] estradiol 17- β glucuronide ([³H] E17 β G) と、bulk flow マーカーとして [¹⁴C] D-mannitol を同時に硝子体内に投与し、microdialysis 法を用いて硝子体からの両薬物の消失を測定した。^{[3}H] E17 β G の硝子体からの消失は [¹⁴C] D-mannitol よりも高く、その差異は非標識 E17 β G および各種有機アニオンの存在で減少した。特に p-aminohippuric acid では、^{[3}H] E17 β G の消失に影響がなく、digoxin 存在下で有意に阻害されたことから、organic anion transporting polypeptide (oatp) 2 の関与が示唆された⁸⁾。磁気分離したラット網膜血管内皮細胞画分における oatp1, 2, 3, および 14 mRNA 発現量を解析した結果、oatp2 および 14 が inner BRB に発現していることが示された⁷⁾。Oatp2 に関しては、免疫組織化学的解析によって inner および outer BRB に発現していることが報告されており、その結果と一致している。以上の結果から、E17 β G は硝子体から BRB を介して排出輸送されており、その排出には少なくとも oatp2 が関与していることが示唆された(図3)。現在、他の有機アニオン輸送系の輸送特性について研究を展開している。

4 おわりに

血液網膜関門輸送機能研究は始まったばかりであり、世界的にみても研究グループが少ない。しかしながら、高齢化社会を迎え、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症や緑内障による網膜変性症などの網膜疾患に対する薬物治療法の開発は重要である。点眼による網膜への薬物送達はほぼ不可能であるため、全身

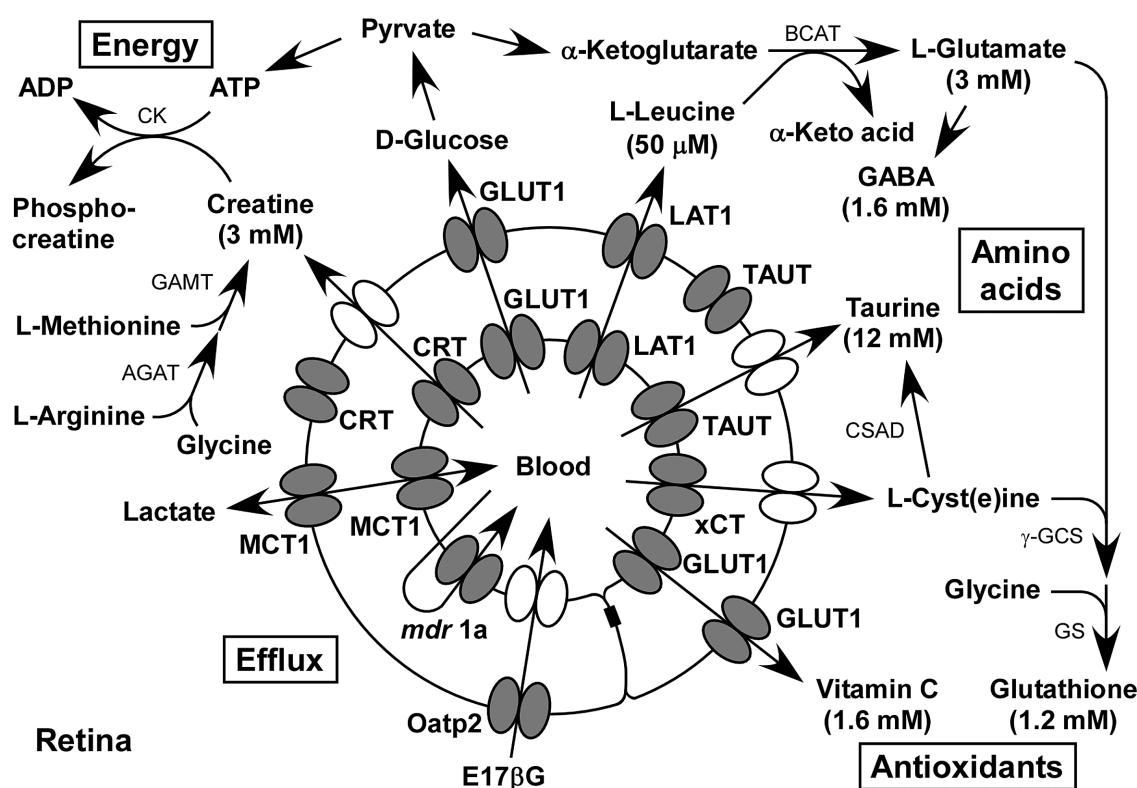


図3 内側血液網膜関門における物質輸送機構

循環血からBRBを介した網膜への薬物送達による治療開発が望まれており、「飲む目薬」開発を目指している。BRBの輸送機能解析を通し、少しでも目標に近づきたいと願っている。

謝辞

本総説中の研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金・感覚器障害研究事業からの支援をいただきました。深く感謝いたします。

本研究遂行にあたり多大の協力を賜った東北大学大学院薬学研究科寺崎哲也教授および近藤徹博士、富山大学大学院医学薬学研究部登美齊俊助手、立川正憲助手および薬剤学研究室の諸氏に心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) K. Hosoya and M. Tomi: Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of cell lines and transport functions, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1-8 (2005)
- 2) K. Hosoya, V. H. L. Lee and K. J. Kim: Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 227-240 (2005)
- 3) K. Hosoya, M. Tomi, S. Ohtsuki, et al.: Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (TR-iBRB) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat, *Exp. Eye Res.*, **72**, 163-172 (2001)
- 4) K. Hosoya, T. Kondo, M. Tomi, et al.: MCT1-mediated transport of L-lactic acid at the inner blood-retinal barrier: a possible route for delivery of monocarboxylic acid drugs to the retina, *Pharm. Res.*, **18**, 1669-1676 (2001)
- 5) T. Kondo, K. Hosoya, S. Hori, et al.: Establishment of conditionally immortalized rat retinal pericyte cell lines (TR-rPCT) and their application in a co-culture system using retinal capillary endothelial cell line (TR-iBRB2), *Cell Struct. Funct.*, **28**, 145-153 (2003)
- 6) M. Tomi, T. Funaki, H. Abukawa et al.: Expression and regulation of L-cystine transporter, system x_c⁻, in the newly developed rat retinal Müller cell line (TR-MUL), *Glia*, **43**, 208-217 (2003)
- 7) M. Tomi and K. Hosoya: Application of magnetically

- isolated rat retinal vascular endothelial cells for the determination of transporter gene expression levels at the inner blood-retinal barrier, *J. Neurochem.*, **91**, 1244-1248 (2004)
- 8) K. Katayama, Y. Ohshima, M. Tomi, et al.: Application of microdialysis to evaluate the efflux transport of estradiol 17- β glucuronide across the rat blood-retinal barrier, *J. Neurosci. Methods*, **156**, 249-256 (2006)
- 9) K. Hosoya, A. Minamizono, K. Katayama, et al.: Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 1232-1239 (2004)
- 10) M. Tomi, M. Mori, M. Tachikawa, et al.: L-Type amino acid transporter 1 (LAT1) -mediated L-leucine transport at the inner blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 2522-2530 (2005)
- 11) M. Tomi, K. Hosoya, H. Takanaga, et al.: Induction of xCT gene expression and L-cystine transport activity by diethyl maleate at the inner blood-retinal barrier, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 774-779 (2002)
- 12) T. Nakashima, M. Tomi, K. Katayama, et al.: Blood-to-retina transport of creatine via creatine transporter (CRT) at the rat inner blood-retinal barrier, *J. Neurochem.*, **89**, 1454-1461 (2004)
- 13) K. Nagase, M. Tomi, M. Tachikawa, et al.: Functional and molecular characterization of adenosine transport at the rat inner blood-retinal barrier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 13-19 (2006)