

# 血液脳関門におけるP-glycoproteinのタンパク質発現量種差と病態変動機構の解明：炎症・酸化ストレスによる急性のP-glycoprotein 活性変動機構

著者	星 裕太郎
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17524号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00121270">http://hdl.handle.net/10097/00121270</a>

血液脳関門における P-glycoprotein の  
タンパク質発現量種差と病態変動機構の解明  
：炎症・酸化ストレスによる急性の P-glycoprotein 活性変動機構  
(要約)

東北大学大学院薬学研究科  
生命薬科学専攻  
星 裕太郎

## 1. 目的

疾患急性期の血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB)における P-glycoprotein (P-gp)の排出輸送活性の変動メカニズムを明らかにすることは、BBB が外界の変化に迅速に応答する機構の理解を深めるだけでなく、P-gp 基質薬物の中枢移行の制御に結びつく重要な課題である。疾患慢性期では P-gp のタンパク質発現量の変化が主要因である一方、急性期では細胞内情報伝達機構の活性化が重要視されているが、その分子機構は殆ど解明されていなかった。

炎症と酸化ストレスは多くの中枢疾患の増悪に関与することから重要である。炎症性サイトカイン及び活性酸素種による急性期の細胞応答として、Protein kinase C (PKC)の活性化や Protein tyrosine phosphatase の阻害を介した複数のリン酸化シグナルの活性化が示されている。従って、P-gp の輸送活性制御に関わるリン酸化分子群を明らかにするためには、包括的なリン酸化変動解析に基づいた探索が重要である。近年のプロテオミクス技術は、リン酸化濃縮法や脱リン酸化法を用いて高感度化することで、微量なリン酸化タンパク質に対する網羅的な定量解析が可能であり、P-gp の活性制御に関与するリン酸化分子群を探索する上で有効である。また、ヒト *in vivo* で重要な制御分子を解明するためには、P-gp 制御分子の探索に留まることなく、ヒトと類似する BBB 機能を有するモデル動物を用いて *in vivo* での寄与を検証することが重要である。コモンマーモセットは霊長類として初めて遺伝子操作技術が確立され、中枢疾患研究を切り拓くヒトモデル動物となることが期待されているが、これまでに BBB 輸送機能の解析例は殆どなかった。一方、ラットは多くの実験情報が蓄積されており、BBB 輸送機能のヒトとの類似性・相違性を理解することで目的に応じた利用が可能になる。そこで、本研究では、i) マーモセットとラットの脳毛細血管における輸送担体タンパク質の発現量の定量解析を行い、ヒト BBB 輸送機能の解析モデルとしての有用性と限界を明らかにすること、また、ii) 炎症性サイトカ

インと酸化ストレス存在下の P-gp 輸送活性の変動を担うリン酸化タンパク質群を探索・同定し、i)で評価した *in vivo* 動物モデルを用いて検証することで、*in vivo* BBB で重要な P-gp 輸送活性の調節機構を解明することを目的とした。

## 2. 方法

細胞膜タンパク質はトリプシン消化後、LC-MS/MS Selective/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM) mode で定量した。リン酸化タンパク質は HAMMOC カラムでリン酸化ペプチドを濃縮し、脱リン酸化後、LC-MS/MS Information Dependent Acquisition (IDA) mode 測定及び 2D-ICAL 法による網羅的な比較定量によって探索解析した。P-gp の排出輸送活性は vinblastine の cell/medium ratio に対する P-gp 阻害剤 PSC833 の上昇効果で評価した。

## 3. 結果・考察

マーモセット及びラット BBB における輸送担体タンパク質の発現量解析に基づく、ヒト BBB モデル動物の有用性の評価

脳毛細血管画分を用いてタンパク質発現量解析を行った結果、マーモセットに関して 12 種類中 8 種類、ラットについて 13 種類中 6 種類のタンパク質発現量がヒトと 2 倍の範囲内で一致した。この内、薬物排出輸送担体として重要な P-gp、Breast cancer resistance protein (BCRP) 及び Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) のタンパク質発現量はヒトと比較してそれぞれ、マーモセットでは 1.1、2.0 及び 1.6 倍、ラットでは 3.2、1.6 及び 7.8 倍の差でありラットは P-gp 及び MRP4 の機能を過大評価することが示唆された。ラットにおける 3 種類の P-gp 基質の脳対血漿中薬物濃度比( $K_p$  brain)はヒト又はカニクイザルと比べて小さいことが報告されていることから (*Drug Metab Dispos.* 37: 635-643, 2009)、P-gp のタンパク質発現量の種差は輸送活性の種差

を反映していることが示唆された。従って、マーマウスはタンパク質発現量の類似性からヒトの BBB 輸送機能を反映し得る動物モデルとして有用であることが示された。一方、ラットは P-gp のタンパク質発現量が大きいことから P-gp の機能解析に有用なモデルとなることが示された (Hoshi, Yutaro, *et al. J Pharm Sci.* 102: 3343-3355, 2013)。

#### 炎症時の BBB における P-gp 輸送活性変動に関与するリン酸化タンパク質の解明

これまでにラット単離脳毛細血管を用いて、炎症メディエーターである Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が P-gp の排出輸送活性を僅か 1 時間の内に低下することが示されている (*Mol Pharmacol.* 69: 462-470, 2006)。この分子機構は PKC の活性化を介することが示されたが、そのリン酸化基質は十分に明らかにされていなかった。ヒト BBB における炎症急性期の影響を明らかにするため、ヒト *in vitro* BBB モデル細胞 (hCMEC/D3; D3 細胞) に TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) を 1 時間処理したところ、P-gp の排出輸送活性は 42% ( $p < 0.05$ ) 低下した。同条件下で、D3 細胞の全細胞抽出物と細胞膜画分における P-gp のタンパク質発現量は変動しなかったことから、転写及び細胞内トラフィック以外の分子機構を介した輸送活性の制御が示唆された。リン酸化シグナルの関与の有無を検証すべく、生体内で微量なリン酸化タンパク質の変動を検出可能な、リン酸化ペプチド濃縮法と脱リン酸化法を組み合わせた高感度化法を構築した。リン酸化タンパク質の網羅的な定量比較解析の結果、TNF- $\alpha$  処理時には、25 種類のタンパク質のリン酸化量が 3 倍以上有意に増加した ( $p < 0.01$ )。この内 PKC によって活性制御される報告のある Actin filament-associated protein 1 (AFAP-1)、Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK)、Transcription factor AP-1 (AP-1) に着目し、TNF- $\alpha$  による P-gp 輸送機能の制御シグナルとの関連を解析した。

結果、AFAP-1 の siRNA 処理条件下では TNF- $\alpha$  による P-gp 輸送活性の低下が抑制された。一方、MAPK 及び AP-1 の阻害条件下では TNF- $\alpha$  による P-gp 輸送活性低下の抑制効果は見られなかった。以上の事から、リン酸化プロテオミクスを用いた探索戦略を用いて、AFAP-1 が TNF- $\alpha$  による P-gp 輸送機能の制御シグナルに関与することを明らかにした。

### 酸化ストレス下の BBB における P-gp 輸送活性変動に関与するリン酸化タンパク質の解明

酸化ストレスは様々な細胞内情報伝達機構を迅速に活性化するが、BBB の P-gp 輸送活性への寄与及び活性制御に関わるリン酸化シグナルは不明であった。酸化ストレスモデルとして過酸化水素( $H_2O_2$ )を D3 細胞に 20 分間処理したところ、P-gp の排出輸送活性は 0.5-5 mM の範囲で  $H_2O_2$  濃度依存的に低下した( $p < 0.05$ )。一方、同条件で MRP1 の排出輸送活性は低下しなかったことから、選択的な分子機構を介して P-gp の輸送活性が制御されていることが示唆された。 $H_2O_2$  の効果は  $H_2O_2$  を wash out した 20 分後に消失し、一過性の変化であることが示されたことから、P-gp の転写制御を介さない細胞内情報伝達機構の関与が示唆された。P-gp のタンパク質発現量は全細胞抽出物においては変動しなかったが、細胞膜画分において  $H_2O_2$  濃度依存的に低下した( $p < 0.05$ )ことから、P-gp が細胞膜から内在化したことが示唆された。一方、細胞膜画分における P-gp タンパク質発現量の低下は、dynasore 存在下において抑制されたことから、dynamin 依存的なエンドサイトーシス機構を介して P-gp が内在化したことが示された。 $H_2O_2$  による P-gp 輸送活性の低下に関わるリン酸化分子を同定するため、リン酸化プロテオミクスを用いて探索解析を行った。P-gp の輸送活性が低下した 0.5 mM と 5 mM の  $H_2O_2$  存在下で共通してリン酸化量が増加した 9 種類のリン酸化タンパク質を有力候補とした。この内 caveolin-1 (Cav1)は 0.5

mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で最もリン酸化変動が大きかったことから、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する応答性が最も高いことが示唆された。候補分子が P-gp の輸送活性を制御するかどうかを明らかにするために、Cav1 のリン酸化を促進する Abl kinase (Abl) 及び Src kinase (Src)、有力候補である Heat shock protein beta-1 (HSP27)、Microtubule-associated protein 4 (MAP4) または Stromal interaction molecule 1 (STIM1) に対する阻害剤を用いて P-gp の輸送活性への影響を解析した。Abl または Src 阻害剤の存在下において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による P-gp 輸送活性の低下が有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。一方、HSP27、MAP4 または STIM1 に対する阻害剤存在下では P-gp 輸送活性低下の抑制効果は見られなかった。よって、Abl 及び Src は酸化ストレス条件下において P-gp 輸送活性を低下させることが示唆された。Cav1 のリン酸化はカベオラエンドサイトーシスを促進することが報告されていることから、酸化ストレス存在下においても Abl 及び Src による Cav1 のリン酸化を介して P-gp 及び Cav1 が内在化したことが示唆される (*J Cell Mol Med.* 2007, 11, 1239-1250)。実際に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下では、P-gp 及び Cav1 はどちらも内在化した。Abl 及び Src の阻害条件下では両者の内在化は抑制された。以上の事から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は Abl 及び Src を活性化し、Cav1 のリン酸化に伴う P-gp の内在化を促進した結果、P-gp 輸送活性を低下させた、という一連の制御メカニズムを D3 細胞を用いて解明した。この制御機構の *in vivo* における寄与をラットを用いて検証した。Brain perfusion 法を用いた解析の結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与条件下では、quinidine の脳への蓄積量が非投与条件下と比べて 17 倍有意に増加した。一方、血管容積マーカーである raffinose の脳内蓄積量は変化しなかったことから、本実験条件下では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は BBB の密着結合に影響することなく P-gp の輸送活性を抑制したことが示唆された。ラット *in vivo* BBB における Abl と Src の関与を実証するため、Abl 阻害剤 (Imatinib) 及び Src 阻害剤 (PP2) を投与したところ、いずれの阻害剤の投与条件下においても、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による quinidine

の脳への蓄積量の増加が有意に抑制された。従って、Abl 及び Src は酸化ストレス条件下の *in vivo* BBB において P-gp 輸送活性の低下に重要な役割を担っていることが示された。

#### 4. 結論

本研究によって、ラット及びマウスセットの BBB におけるトランスポーターのタンパク質発現量を解明した。また、急性炎症時の BBB において、AFAP-1 が P-gp の輸送活性の低下に関与することが明らかとなった。酸化ストレスの急性期では、Abl 及び Src が P-gp の内在化を促進し、輸送活性を低下することを *in vitro* 及び *in vivo* で解明した。

本研究は BBB の細胞内情報伝達機構の解明研究において、リン酸化プロテオミクスの有用性を実証した最初の例であり、本研究領域に大きな発展をもたらす成果であると考えられる。

#### 5. 参考論文

Hartz, A. M., Bauer, B., Fricker, G. and Miller, D. S. (2006) Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol Pharmacol*, **69**, 462-470.

Syvanen, S., Lindhe, O., Palner, M., Kornum, B. R., Rahman, O., Langstrom, B., Knudsen, G. M. and Hammarlund-Udenaes, M. (2009) Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab Dispos*, **37**, 635-643.

Sverdlov, M., Shajahan, A. N. and Minshall, R. D. (2007) Tyrosine phosphorylation-dependence of caveolae-mediated endocytosis. *J Cell Mol Med*, **11**, 1239-1250.



## 6. 発表論文リスト

本学位論文の一部は、以下の原著論文を基に作成されたものである。

1. **Yutaro Hoshi**, Yasuo Uchida, Masanori Tachikawa, Takashi Inoue, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki  
Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102: 3343-3355.
2. **Yutaro Hoshi**, Yasuo Uchida, Masanori Tachikawa, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Terasaki  
Actin filament-associated protein 1 (AFAP-1) is a key mediator in inflammatory signaling-induced rapid attenuation of intrinsic P-gp function at the human brain capillary endothelial cells.  
*Journal of Neurochemistry*, 2017 Jan 23. [Epub ahead of print]