

博 士 論 文

薬物の効率的なデリバリー戦略構築を目指した
脳・肺微小血管および胸部大動脈血管内皮細胞の
新たな機能の探索と解明に関する研究

上 田 ゆ か り

平成三十年

博士論文

薬物の効率的なデリバリー戦略構築を目指した
脳・肺微小血管および胸部大動脈血管内皮細胞の
新たな機能の探索と解明に関する研究

上田 ゆかり

平成三十年提出

目次

略語一覧	4
緒論	5
理論の部	
第一章 マウス肺微小血管内皮細胞 (LMECs) におけるタイトジャンクシ ヨンの形成	9
第一節 Occludin、Claudin および ZO-1 の遺伝子発現	11
第二節 Occludin、Claudin および ZO-1 のタンパク質発現	12
第三節 経内皮電気抵抗および細胞間隙透過クリアランス	13
第四節 小括	15
第二章 マウスおよびラット肺微小血管内皮細胞 (LMECs) のタイトジャン クション開口に対するヒスタミンの作用	16
第一節 ヒスタミン暴露による細胞間隙透過クリアランス	21
第二節 L-ヒスタミン取り込みに対する亜鉛の影響	22
第三節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対する代謝阻害剤およ び Na イオンの影響	25
第四節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対するアミノ酸輸送系 阻害剤の影響	26
第五節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対する pH の影響	28
第六節 小括	29

第三章	ラット脳微小血管内皮細胞 (BMECs) 内のフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) タンパク質の発現とその活性	31
第一節	<i>d</i> -クロルフェニラミン <i>N</i> -酸化反応に対する pH の影響	33
第二節	<i>d</i> -クロルフェニラミン <i>N</i> -酸化活性に対するメチマゾールの阻害効果	35
第三節	<i>d</i> -クロルフェニラミン <i>N</i> -酸化反応に対するメチマゾールの阻害様式	36
第四節	FMO タンパク質の発現	37
第五節	肝細胞および脳微小血管内皮細胞内 FMO の活性比較	39
第六節	小括	40
第四章	ラット胸部大動脈血管内皮細胞 (TAECs) におけるイミプラミン <i>N</i> -酸化反応と <i>N</i> -脱メチル化反応	42
第一節	イミプラミン <i>N</i> -酸化反応と <i>N</i> -脱メチル化反応	45
第二節	イミプラミン <i>N</i> -脱メチル化反応への抗シトクロム P450 (CYP) 抗体の影響	47
第三節	CYP2C11 および CYP3A2 のタンパク質発現	48
第四節	イミプラミン <i>N</i> -酸化反応および <i>N</i> -脱メチル化反応に対する pH の影響	49
第五節	イミプラミン <i>N</i> -酸化反応に対するメチマゾールの阻害様式	50
第六節	小括	51
第五章	総括および結論	53

実験の部

第一章関連実験	57
第二章関連実験	61
第三章関連実験	64
第四章関連実験	69
引用文献	74
発表論文	79
謝辞	80

略語一覽

BCH :	2-amino-2-norbornanecarboxylic acid
BMECs :	brain microvascular endothelial cells
CYP :	cytochrome P450
D-MEM/F-12 :	dulbecco's modified eagle's medium: nutrient mixture F-12
DNP :	2,4-dinitrophenol
EGF :	epidermal growth factor
FBS :	fetal bovine serum
FMH :	α -fluoromethylhistidine
FMO :	flavin-containing monooxygenase
HEPES :	piperazine-N-(2-ethane-sulfonic acid)
HDC :	L-histidine decarboxylase
HS :	horse serum
L-Glu- γ -MH :	L-glutamic acid γ -monohydroxamate
LMECs :	lung microvascular endothelial cells
Na-FS :	sodium fluorescein
PBS :	phosphate buffered saline
rtNHeps :	rat normal hepatocytes
TAECs :	thoracic aortic endothelial cells
TEER :	transendothelial electrical resistance
TJ :	tight junction
ZO :	zonula occludens

緒言

ストレス社会そして高齢化社会の到来により、抗うつ薬、認知症の治療薬や抗パーキンソン病薬など神経疾患の治療薬の開発が急務とされている。しかし、脳内への薬物の送達で大きな障害になるのは血液脳関門を構成する毛細血管内皮細胞の存在と考える。中枢で薬効を速やかに発揮させるには、いかにしてこのバリアーを突破させ、脳内へ薬物を送達させるかが鍵となる。一方、肺からの薬物送達を考えた場合、そのバリアーとなるのは肺泡を形成する I 型上皮細胞と肺泡を取り巻く毛細血管の内皮細胞である。経肺吸収は、ペプチドやタンパク性薬物のように水溶性で高分子である難吸収性物質の投与経路としても注目され、インスリン製剤では臨床応用も検討されている。しかし、多くの水溶性薬物は肺からの吸収が妨げられ、開発の段階でドロップアウトしてしまう。これまでの研究において、薬物の脳内移行や経肺吸収については主にトランスポーターやレセプターを介した、すなわち経細胞経路に関する研究に焦点が絞られていた。しかし、脳内への効率的な薬物のデリバリーや効率的な経肺吸収を考えるには毛細血管内皮細胞のトランスポーターの機能だけではなく、新たな機能の探索と解明が必要となる。血液組織関門を構成する毛細血管内皮細胞の内皮細胞同士がタイトジャンクション (TJ) を形成する場合、TJ の形成は組織への物質輸送に対し強固な透過バリアーとなる(Figure 1)。また、毛細血管内皮細胞は常に血液に接し好气的条件に曝されている。そのため組織に移行する前に薬物が好气的に代謝され効率的な薬物の移行ができない場合、毛細血管内皮細胞は代謝バリアーとして機能することになる(Figure 1)。これらバリアーの打破、すなわち透過バリアーである TJ の可逆的な開口および代謝バリアーである内皮細胞内の薬物代謝の回避が薬物の組織への効率的なデリバリーに繋がると考える。

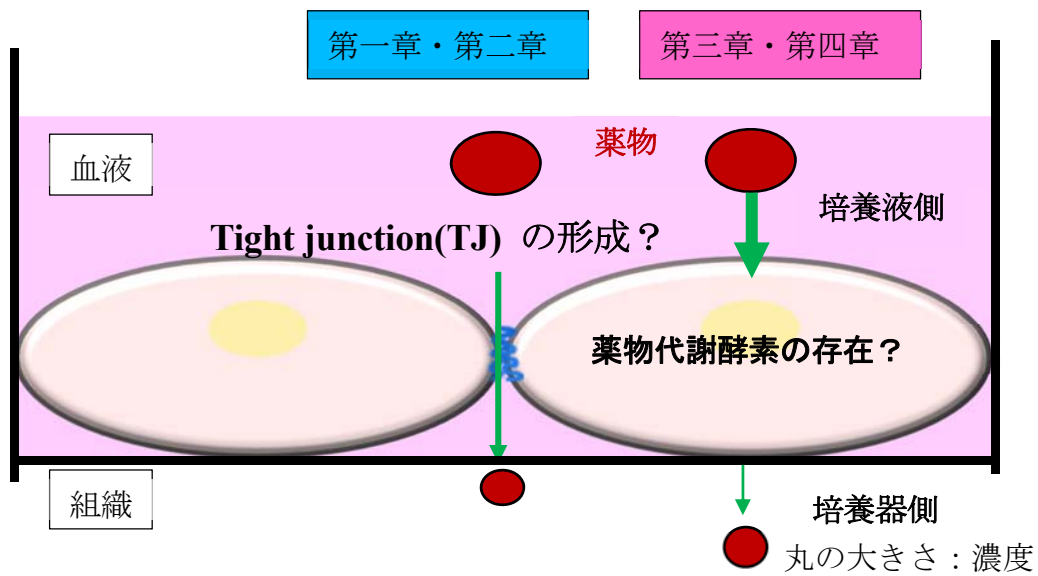
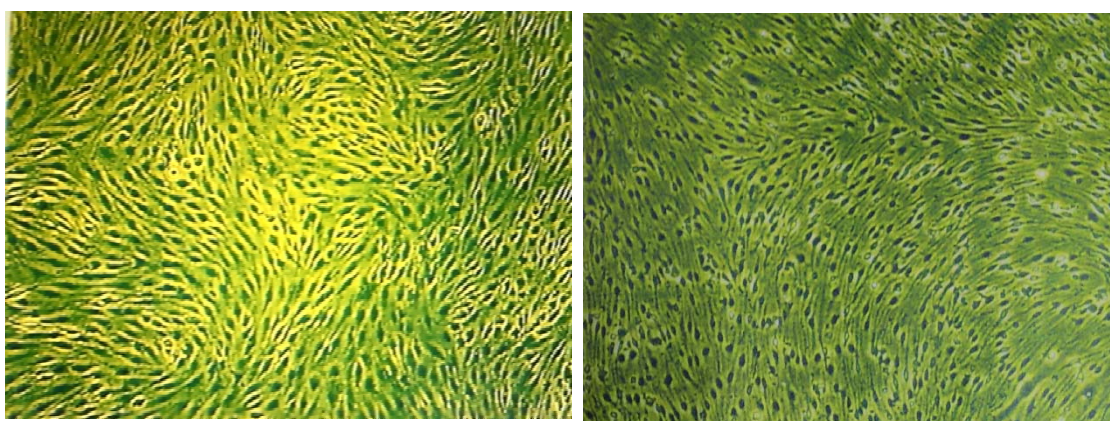


Figure1. 血管内皮細胞培養模式図

そこで、これら毛細血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明をするために、まず毛細血管からその内皮細胞を単離し、微小血管内皮細胞を培養した。Figure 2 の写真は、左はラット肺の、右はラット脳の培養した微小血管内皮細胞を示す。



Sakurai et al, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*
282, L1192-1197, 2002

Figure 2. Phase contrast micrographs of cultured monolayer of LMVEC and BMEC.

癌化された継代細胞と異なり、単離された内皮細胞をフラスコあるいはトランスウエルに培養した場合、初代および培養二世代まで、血液に接している側が培養液側に向き、組織側が培養器に接着し、単層培養される性質を持つ。そのため、目的物質に対して方向性のあるベクトル輸送の測定ができ、微小血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明が可能になった。

本研究は、経肺吸収の血液空気関門を構成する肺微小血管内皮細胞 (LMECs) における特性を解明するため、第一章では、培養マウス LMECs を用いて TJ タンパク質である Occludin、Claudin-1、-4 および ZO-1 の遺伝子発現とタンパク質発現を検討した。TJ 形成を検討するため、経内皮電気抵抗およびフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスを算出した。

第二章では、トランスウエルに播種した培養マウス LMECs にヒスタミンを添加し、フルオレセインの細胞間隙透過クリアランスを検討した。血液中のヒスタミンは炎症などにより血液に遊離され、持続的に内皮細胞を刺激した場合、浮腫を引起すことが考えられる。しかし、一時的にヒスタミンが細胞間隙を刺激し、可逆的に TJ が開口すれば、それにより薬物が組織へ移行しやすくなり、薬物の効率的なデリバリーが可能になる。一方、我々は培養ラット LMECs に取り込まれた L-ヒスチジンから L-ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスタミンが産生されることを見い出している(1)。細胞内ヒスタミンが核内受容体のリガンドとして作用すると仮定した場合、ヒスタミンの前駆物質である L-ヒスチジンの細胞内への取り込み増加がヒスタミン産生の促進に繋がると考えた。そこで本章ではさらに L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質の探索を行った。

第三章では、毛細血管内皮細胞における薬物の消失に関与する薬物代謝能力の有無を検討するため、血液脳関門を構成するラット脳微小血管内皮細胞 (BMECs) にシトクロム P450 (CYP) に次ぐ第二の酸化酵素で、第三級アミンを *N*-酸化するフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) のタンパク発現および第三級アミンで

ある *d*-クロルフェニラミンを *N*-酸化する FMO 活性について検討した。

第四章では、大循環系を構成するラット胸部大動脈血管内皮細胞 (TAECs) での CYP および FMO の酵素の局在を、培養ラット TAECs を用いて広範囲基質であるイミプラミンの代謝活性を検討した。

理論の部

第一章 マウス肺微小血管内皮細胞 (LMECs) におけるタイトジャンクションの形成

微小血管内皮細胞における物質輸送経路には、細胞間隙経路とトランスポーターやレセプターを介した経細胞経路がある。微小血管内皮細胞の細胞間接着装置であるタイトジャンクション (TJ) は、細胞間隙経路での物質透過を制御してバリアー機能を有している。Figure 3 に示すように TJ の構造と機能を担う分子基盤は、Claudin, Occludin および ZO である。Claudin と Occludin は 4 回膜貫通型タンパク質で、2 つの細胞外ループを持ち、その N 末と C 末は細胞質に存在し、C 末で TJ の特異的な裏打ちタンパク質 ZO と結合している。このうち、Claudin は 1998 年に古瀬らによって発見された(2)。Claudin-1 または Claudin-2 をタイト結合しない線維芽細胞で発現させると、タイト結合ストランドを形成することから Claudin がタイト結合の基本骨格を形成していることがわかった(3)。現在 Claudin ファミリーは 27 種類のメンバーが存在し、この発現およびバリアー機能には組織特異性が認められている(4)。その組織特異性に基づいた Claudin をターゲットとした新規薬物吸収促進剤の開発が近年注目されている(5)。Claudin は炎症を生じる病態やクロストリジウム属の産生するエンテロトキシンにより、その発現量が変動するとの報告(6)があり、TJ 開口に Claudin が関与している。

本研究では、培養マウス LMECs の Occludin、Claudin および ZO の遺伝子発現およびタンパク質の発現を検討した。また、Figure 4 に示すように電極を用いて経内皮電気抵抗および細胞間隙透過マーカーであるフルオレセインを用いて細胞間隙透過クリアランスを測定し、TJ の形成を検討した。

Tight junction (TJ)の存在？

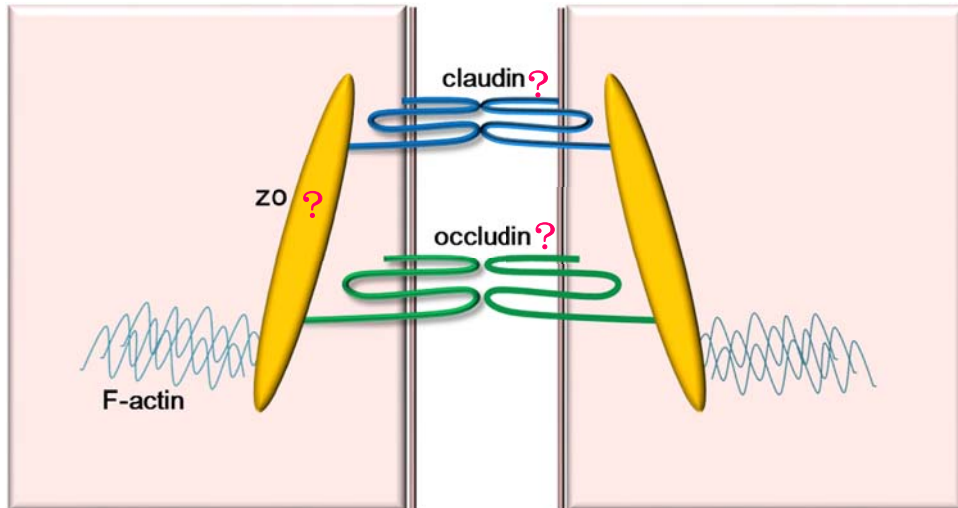


Figure 3. TJ の構造

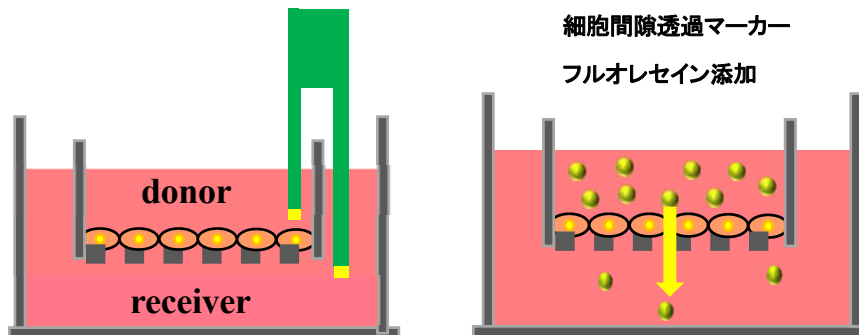


Figure 4. 経内皮電気抵抗および細胞間隙透過クリアランス

第一節 Occludin、Claudin および ZO-1 の遺伝子発現

二世世代培養マウス LMECs を播種後、TJ タンパク質の mRNA をリアルタイム RT-PCR で測定した。その結果、1 日目から Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA 発現が確認された。播種 1 日目の mRNA 発現レベルを基準とすると、Occludin、Claudin-4 および ZO-1 は 8 日目まで有意な増加が認められなかった。これに対し、Claudin-1 mRNA レベルは 6 日目から有意に増加し、7 日目には基準値(1 日目) の約 7 倍に達し、その後 8 日目には、基準レベルまでに下がった(Figure 5)。

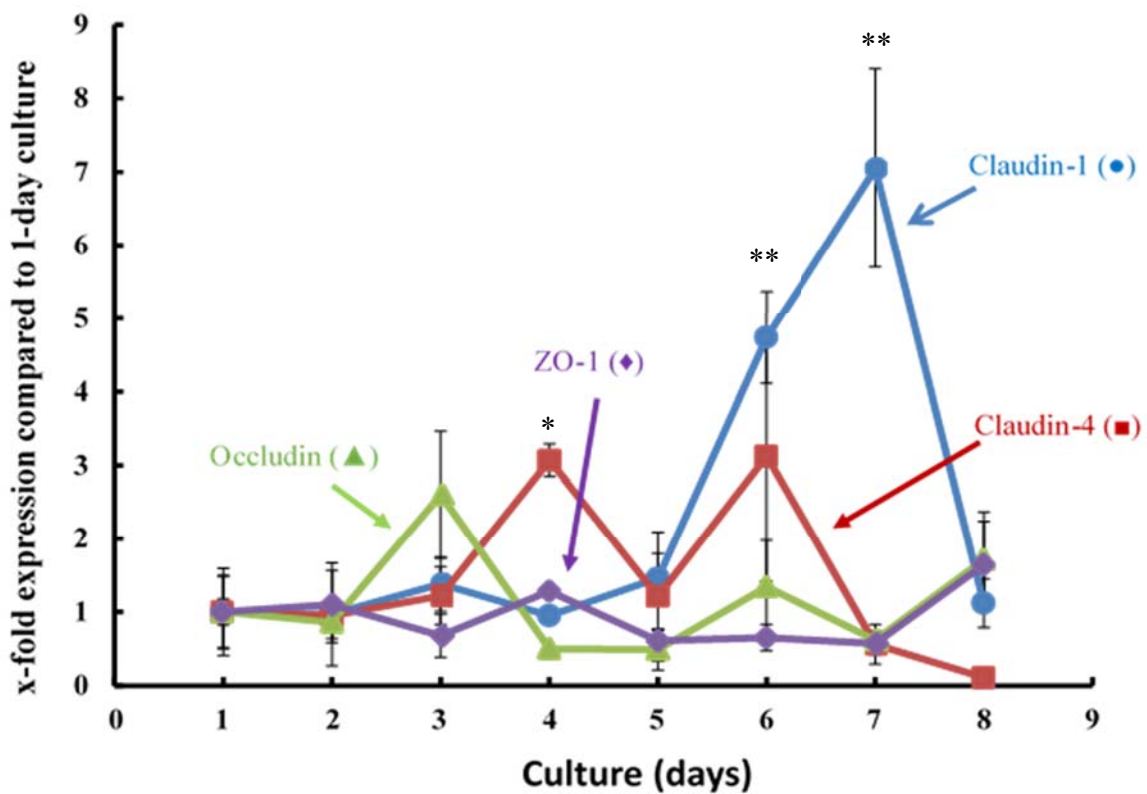


Figure 5. Quantification of Occludin (▲), Claudin-1 (●) and -4 (■) and ZO-1 (◆) mRNAs by real-time PCR in cultured mouse LMECs. The level of each mRNA on day 1 in culture was used as a basal level to compare relative levels at the other culture times. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for comparison with each basal level. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of five experiments.

第二節 Occludin、Claudin および ZO-1 のタンパク質発現

培養マウス LMECs をフラスコに播種し、コンフルエントに達した培養 6 日目の TJ タンパク質をウエスタンブロット法で検討した。TJ タンパク質は、Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 のタンパク質の発現がそれぞれ認められた(Figure 6)。

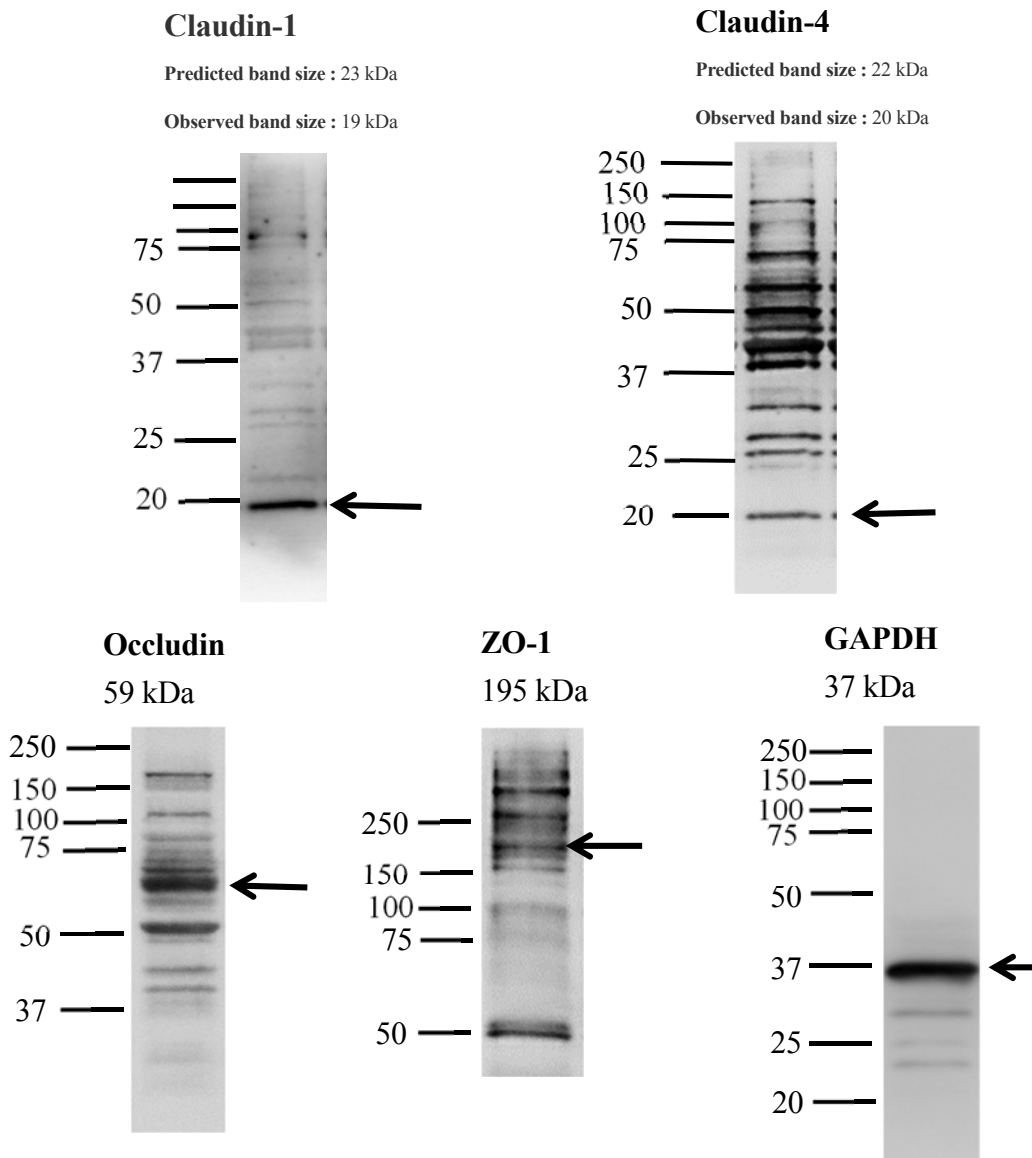


Figure 6. Detection of TJ-associated proteins by Western blotting on day 6 in culture in mouse LMECs.

第三節 経内皮電気抵抗および細胞間隙透過クリアランス

培養マウス LMECs をトランスウエルに播種し、電極を用い経内皮電気抵抗 (TEER) の測定および細胞間隙経路のみ通過するフルオレセインを用いて、細胞間隙透過クリアランスの測定を行った。培養マウス LMECs は、培養 6-8 日後にコンフルエントに達した。培養マウス LMECs の TEER 値は 2 日目より経日的に上昇し、培養 6-7 日目に $19.0 \pm 2.9 \Omega \times \text{cm}^2$ となり最大値に達した (Figure 7(a))。培養マウス LMECs の細胞間隙透過クリアランス値は経日的に減少し、培養 5-8 日目に最も低い値を示した (Figure 7 (b))。このことから、培養 6-7 日目に細胞間密着が強固になり、透過バリアーが形成されると考えられる。

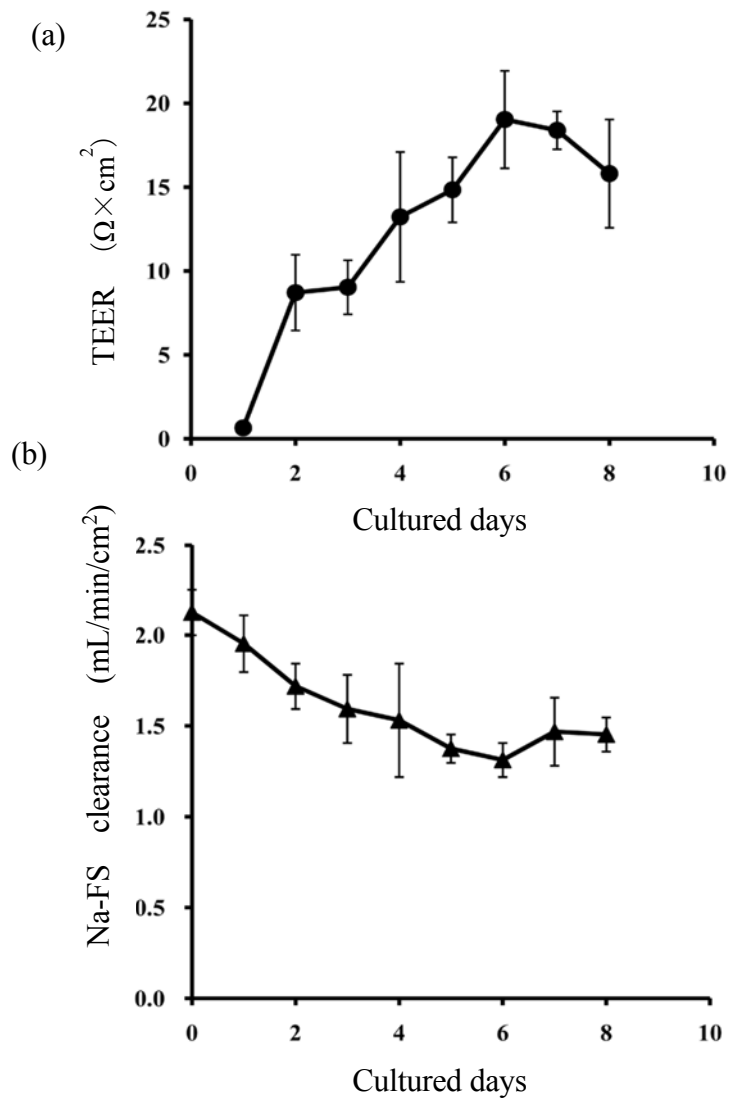


Figure 7. (a) The induction of transendothelial electrical resistance (TEER) in mouse LMECs. Values of TEER are expressed as the mean \pm S.E. of five experiments. (b) Transendothelial permeability (Na-FS clearance) changes for paracellular permeability marker Na-FS in mouse LMECs monolayer. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of five experiments.

第四節 小括

培養マウス LMECs の培養 1 日目から Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA の発現が確認された。そのうち Claudin-1 の mRNA レベルは培養 6 日目から有意に増加し、7 日目には基準値 (1 日目) の約 7 倍に達し、その後、基準値レベルまで戻った。しかし、Occludin、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA レベルは培養 7 日目まで増加は認められなかった。一方、mRNA の有意な増加が認められた培養 6 日目における TJ タンパク質の発現の観察から、Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 のタンパク質の発現が認められた。以上の結果より、Claudin-1 の mRNA 発現が TJ の強固な形成に繋がることが示唆された。

培養マウス LMECs を播種後 6-7 日目における TEER は、約 $19.0 \pm 2.9 \Omega \times \text{cm}^2$ まで上昇した。この値は他の報告のコンフルエントに達した培養ラット肺微小血管内皮細胞(7)の値と類似していたが、ラット脳微小血管内皮細胞より約 20%低かった(8,9)。一方、フルオレセインの細胞間隙透過クリアランスは、播種後 5-8 日目でも最も低い値を示した。

Colegio らは、Claudin 発現の変化が経上皮電気抵抗 (TEER) および透過性に影響があることを明らかにしている(10,11)。また、Nitta らは脳の毛細血管内皮細胞に選択的に発現している Claudin-5 のノックアウトマウスで血液脳関門(BBB)の透過性が亢進し、透過した分子量は 800 Da 以下で分子量選択的であると報告している(12)。これらのことより、組織により Claudin のタンパク質発現に分子種の違いはあるが、培養マウス LMECs における TJ の形成には Claudin が大きく関与することが考えられた。

本章において、培養マウス LMECs の TJ が確立されたことから、第二章での TJ の開口について、その評価検討が可能になった。

第二章 マウスおよびラット肺微小血管内皮細胞 (LMECs) のタイトジャンクション開口に対するヒスタミンの作用

肺毛細血管内皮細胞は薬物が血液から組織に移行する関門であり、吸入剤の使用時には、空気から組織に移行する血液空気関門となる。その培養マウス LMECs の TJ が任意の時間、可逆的に開口すれば、薬物が組織に移行しやすくなり、効率的なデリバリーが可能になると考えられる。

ヒスタミンは、その大部分が好塩基球や肥満細胞に存在し、免疫系および物理的な刺激により血中に遊離され、これが持続的に内皮細胞を刺激すると、浮腫を引起すことが知られている。一方、一時的にヒスタミンが細胞間隙を刺激することにより、可逆的に TJ が開口すれば薬物が組織へ移行しやすくなり、薬物の効率的なデリバリーが可能になる。ヒスタミンは膜受容体である H_1 あるいは H_2 受容体に結合し、TJ を開口することが考えられる (Figure 8)。

一方、Figure 9 に示すように、我々は Na^+ 依存性共輸送型トランスポーター System-N 輸送系および促進拡散型トランスポーター System-L 輸送系で微小血管内皮細胞に取り込まれた L-ヒスチジンが L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) により培養ラット LMECs 内でヒスタミンに産生されることを見出している(1)。そこで、細胞内で産生されたヒスタミンが膜受容体への結合とは別に、核内受容体にリガンドとして結合し、TJ 開口に関与する可能性を考えた (Figure 10)。

そこで、第二章第一節では、細胞外にヒスタミンを添加し、TJ 開口におよぼす影響を検討した。

さらに、第二節では、細胞内ヒスタミンが核内受容体のリガンドとして作用する場合、ヒスタミンの前駆物質である L-ヒスチジンの取り込みが増加したらヒスタミン産生が増加すると考えた。そこで、L-ヒスチジンの取り込みを増強する物

質の探索を検討した。塩基性必須アミノ酸である L-ヒスチジンは細胞内で多くの生理作用を示すヒスタミンの前駆物質である。また、機能タンパクの成分としてイミダゾール基が、酵素の活性中心で触媒作用に関与し、金属(亜鉛、銅、鉄など)との結合部位になるなど重要な役割を演じていることが知られている(13,14)。特に、亜鉛との生理的相互作用についての報告は数多くなされている(15,16)。亜鉛は、生体の至る部位に分布し 60 kg 体重の人で体内総量は約 2 g であり鉄の次に多い。しかも鉄は血液中にヘモグロビンとして存在することから考えると、亜鉛は細胞内では最も多い必須微量元素であるといえる。血液中において亜鉛は主として高分子リガンドであるアルブミン、トランスフェリンと結合し、イオン型はわずかである。しかし、その一部はアミノ酸などの低分子リガンドと結合しており、中でも L-ヒスチジンは最も亜鉛に対して親和性の高いリガンドとして知られている(17-20)。このことから、血液中の亜鉛が、L-ヒスチジンの細胞内輸送に対して何らかの影響をおよぼしている可能性が考えられる。そこで、亜鉛添加による L-ヒスチジンの取り込み増加作用について検討した。

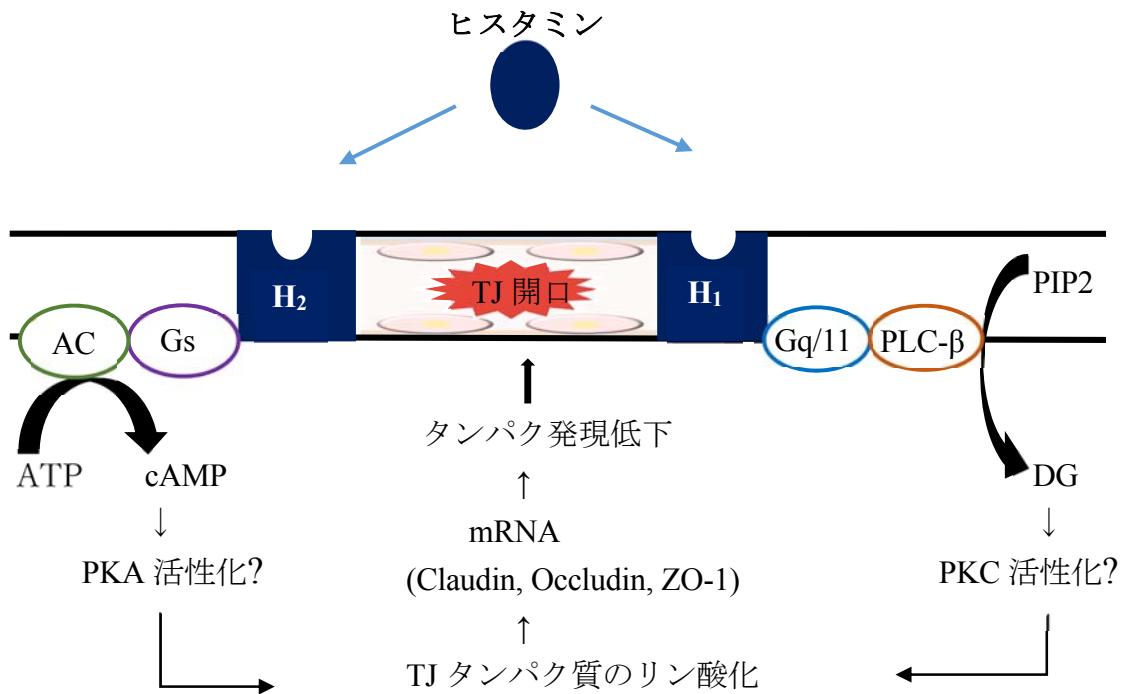
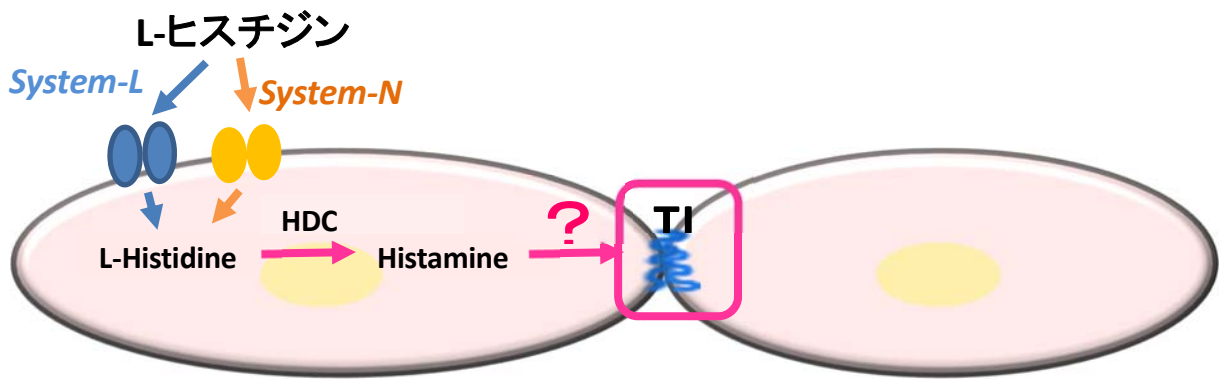
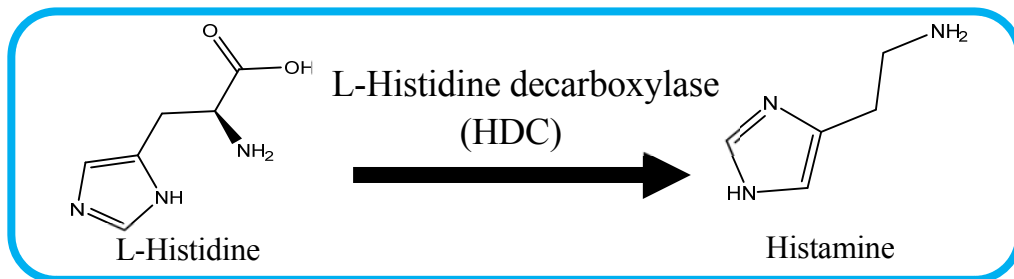


Figure 8. ヒスタミン H₁、H₂ 受容体の情報伝達

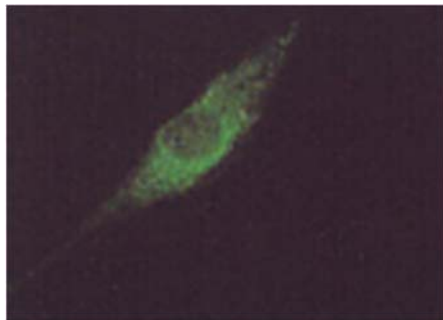
HA : ヒスタミン、H₁ : H₁ 受容体、H₂ : H₂ 受容体、Gq/11 : Gq/11 タンパク質、G_s : G_s タンパク質、PLC-β : ホスホリパーゼ C-β、AC : アデニル酸シクラーゼ、PIP₂ : ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸、DG : ジアシルグリセロール、ATP : アデノシン 5'-三リン酸、cAMP : アデノシン 3',5'-サイクリック-リン酸、PKC : プロテインキナーゼ C、PKA : プロテインキナーゼ A



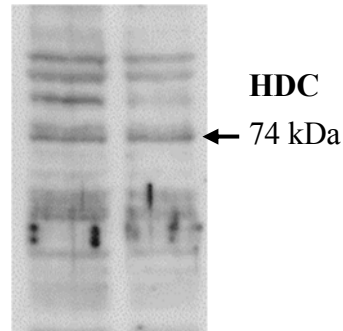
L-ヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の存在



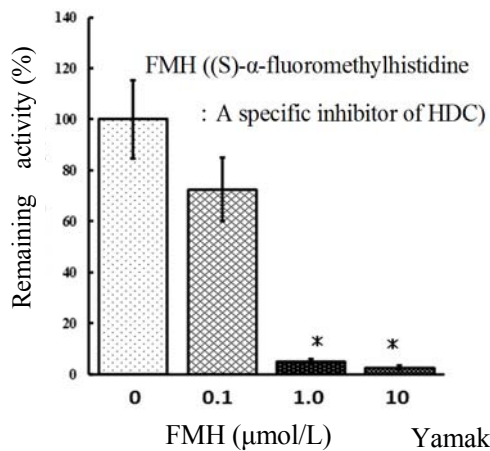
①免疫蛍光染色



②ウエスタンブロット



③FMH による HDC 活性の抑制



Inactivation of HDC by (S)-α-fluoromethylhistidine (FMH). Samples containing HDC activity were preincubated for 30 min with various concentrations of FMH, then the remaining HDC activity was assayed as described in Materials and Methods. Each point represents the mean ± S.E. of 4 determinations. HDC activity in the absence of FMH was 0.14 ± 0.05 pmol/min/mg protein. *p<0.01, compared with control.

Yamakami J., Sakurai E., et al, *Inflamm. Res.* 49, 231-235, 2000

Figure 9. Uptake of L-histidine and biotransformation to histamine in microvascular endothelial cells

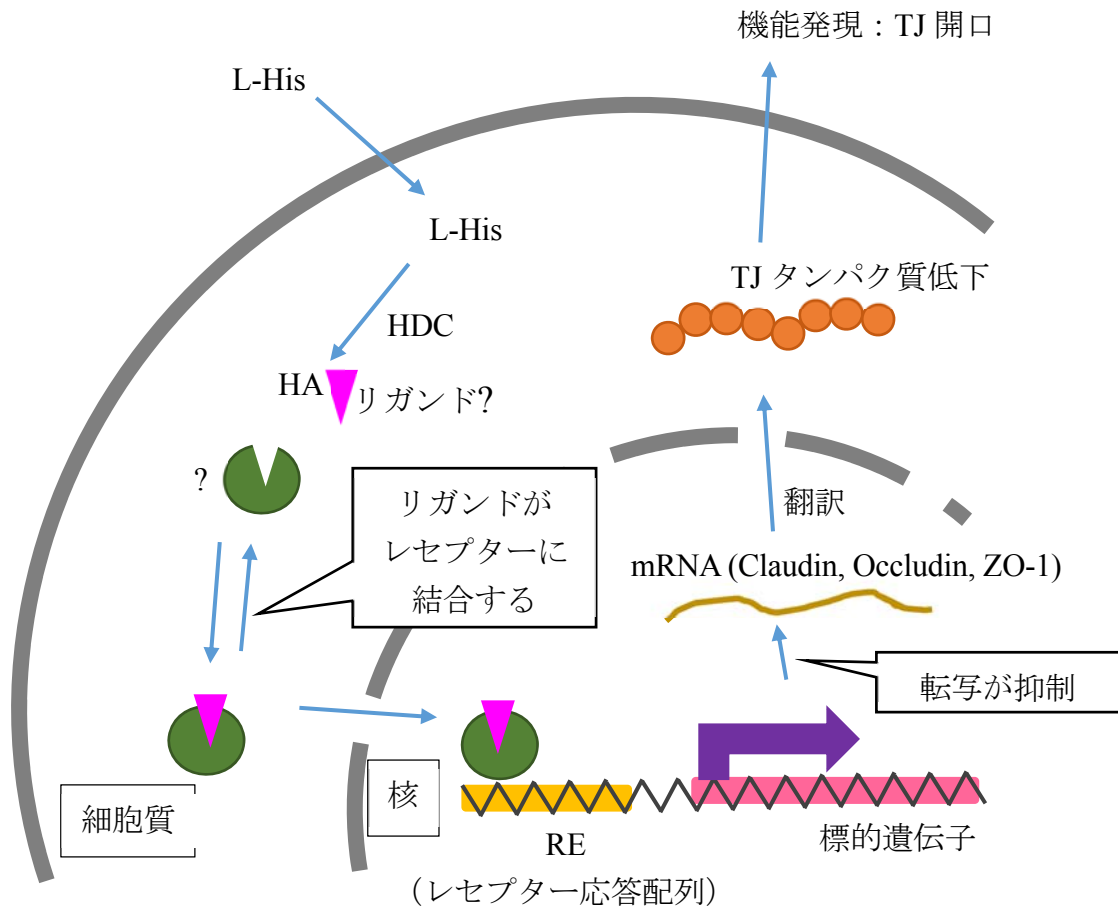


Figure 10. 核内受容体

L-His : L-ヒスチジン、HA : ヒスタミン、HDC : L-ヒスチジン脱炭酸酵素、

第一節 ヒスタミン暴露による細胞間隙透過クリアランス

トランスウェルに播種し、透過バリアーの形成を確認した培養マウス LMECs に 10 $\mu\text{mol/L}$ のヒスタミンを添加すると、5 分で透過性が亢進し、約 1 時間までフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスがコントロール群と比べて有意に上昇した。しかし、ヒスタミン添加 3 時間後にはフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスが回復し、ヒスタミンによる TJ の開口は、可逆的であることが明らかになった(Figure 11)。

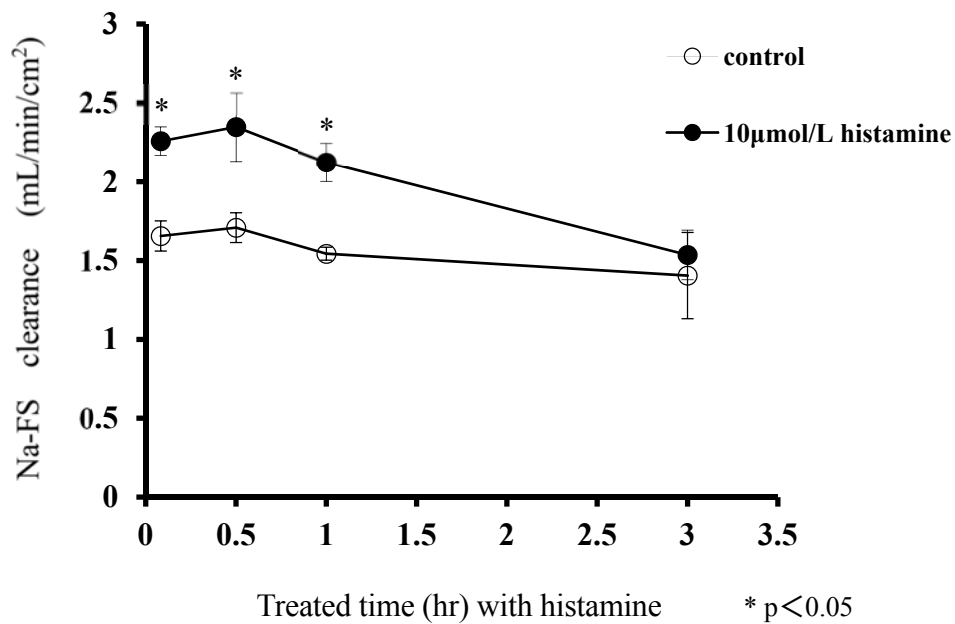


Figure 11. Effect of histamine on transendthelial permeability of Na-FS in mouse LMECs monolayer. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of four experiments. *p<0.05, compared with control.

第二節 L-ヒスチジン取り込みに対する亜鉛の影響

L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質として、セレンや亜鉛をはじめコバルトおよび銅などの生体内必須微量元素を検討した。このうち、亜鉛の添加により L-ヒスチジンの取り込み速度は単独に比べ約 4 倍と顕著に増加した(Figure 12)。L-ヒスチジンの培養ラット LMECs への取り込み速度は反応時間に依存し、添加後、2.5 分まで直線性が認められた。したがって、これ以降の取り込みに関する実験はすべて 2 分で行った。なお、亜鉛は生理的血液中濃度に比べ 10 倍量にあたる 0.1 mmol/L を添加した。

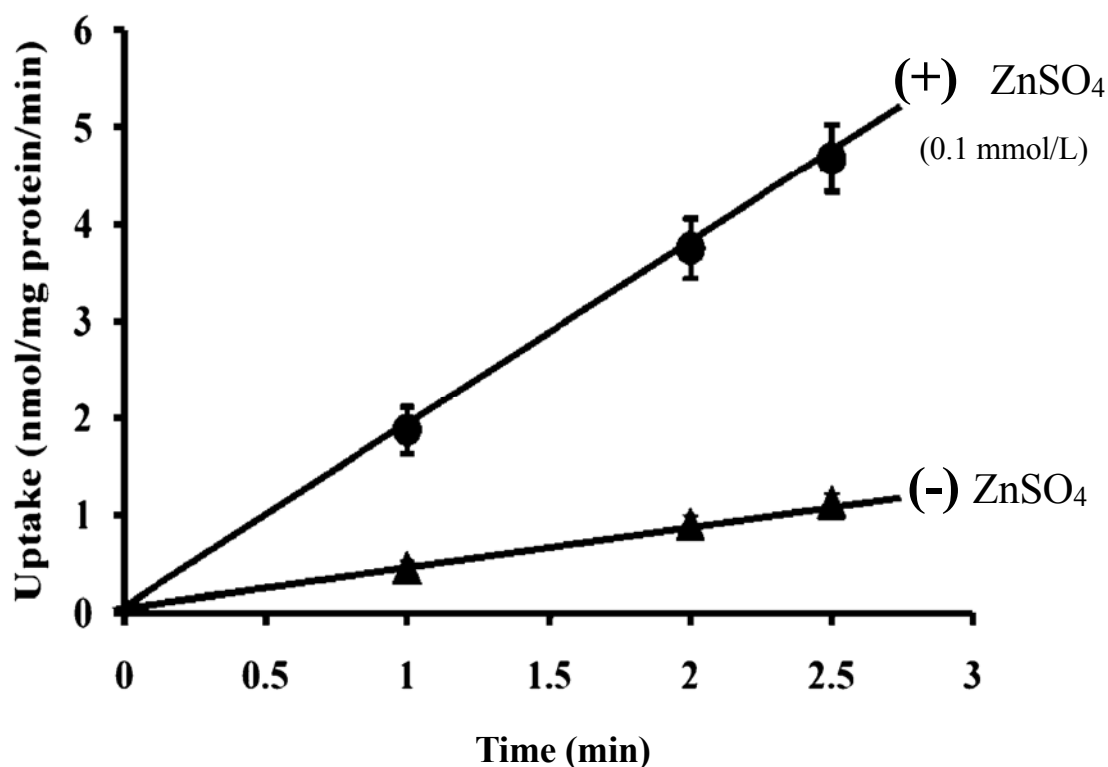


Figure 12. Time courses of L-histidine uptake by cultured monolayers of rat LMECs in the absence (\blacktriangle) or presence (\bullet) of ZnSO_4 . Rat LMECs were incubated at 37 °C in 2 mL Krebs buffer (pH 7.4) containing 0.1 mmol/L L-histidine for the indicated times. Each point represents the mean \pm S.E. of four determinations.

Figure 13(a)の Michaelis-Menten plot の解析から L-ヒスチジンの取り込み速度に飽和が認められ、トランスポーターを介した輸送系が示唆される。(b)の Eadie-Hofstee plot の解析から、亜鉛を添加すると、L-ヒスチジン単独の場合に認められた二相性の取り込みは示さず、一相性となり、亜鉛添加による輸送は一つの System 系だけが関与することが考えられた。

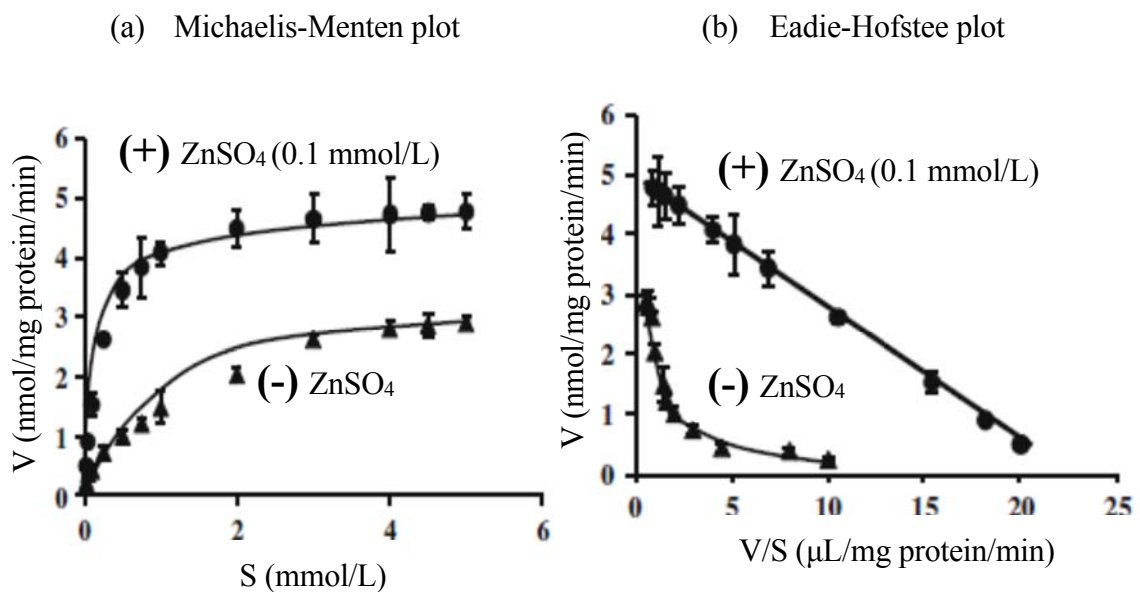


Figure 13. Concentration dependence of L-histidine uptake by cultured monolayers of rat LMECs in the absence(▲) or presence (●) of ZnSO₄. L-histidine uptake for 2 min at concentrations between 0.01 and 3 mmol/L was determined at 37 °C. Each point represents the mean \pm S.E. of four determinations. V, L-histidine uptake rate (nmol/mg protein/min); S, L-histidine concentration (mmol/L).

また、HDC 活性におよぼす亜鉛の影響を検討したが、亜鉛が存在しても HDC 活性には影響がないことが明らかになった(Table 1)。

Table 1. Effect of ZnSO₄ on L-histidine decarboxylase activity in cultured monolayers of rat LMECs.

	HDC activity (pmol/mg protein/min)
Control	0.14 ± 0.05
ZnSO ₄ (0.1 mmol/L)	0.15 ± 0.06
ZnSO ₄ (0.5 mmol/L)	0.13 ± 0.05

Each point represents the mean ± S.E. of 4 determinations.

第三節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対する代謝阻害剤 および Na⁺ イオンの影響

ATP 合成阻害剤である 2,4-ジニトロフェノール(DNP)の前処理、および krebs buffer 中の塩化ナトリウムを塩化コリンに置換した Na⁺ Free 溶液を使用して L-ヒスチジン取り込みを検討した。L-ヒスチジン単独では、DNP 前処理と Na⁺ free 溶液のどちらにおいても L-ヒスチジンの取り込みが有意に低下した。これに対して亜鉛添加では、DNP および Na⁺ Free 溶液による L-ヒスチジンの取り込みは抑制されなかった(Table 2)。

Table 2. Effects of 2,4-dinitrophenol (DNP) and ion replacement in Krebs buffer on the uptake of L-histidine into LMECs in the presence of ZnSO₄.

	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Uptake (nmol/mg protein/min)	
		L-Histidine	L-Histidine + ZnSO ₄
Control		0.453 \pm 0.070	1.864 \pm 0.242
DNP	250	0.213 \pm 0.040*	2.126 \pm 0.412
Na ⁺ Free		0.156 \pm 0.053**	2.026 \pm 0.132

Rat LMECs were preincubated at 37 °C for 15 min in 2 mL Krebs buffer (pH 7.4) with 2,4-dinitrophenol (DNP) in the absence or presence of ZnSO₄ (0.1 mmol/L). In sodium ion-replacement studies, incubation solution without Na⁺ was prepared by substituting choline chloride for NaCl and choline bicarbonate for NaHCO₃. The uptake of L-histidine (0.1 mmol/L) was measured for 2 min at 37 °C. Each value is the mean \pm S.E. of four experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, compared with the control.

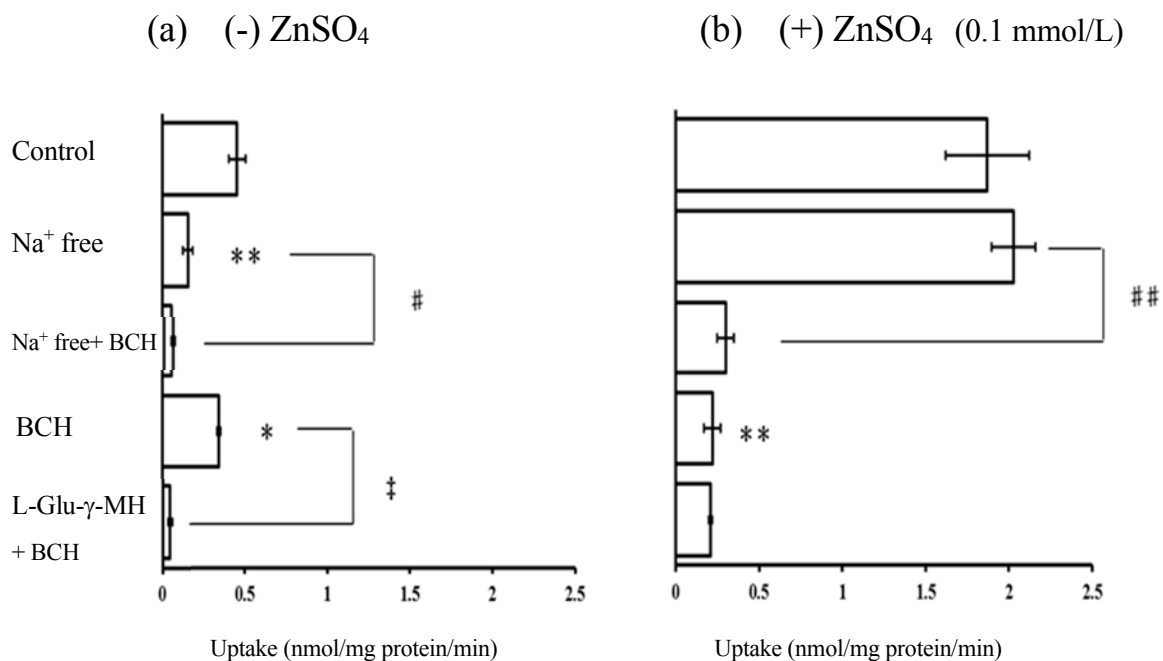
第四節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対するアミノ酸輸送系阻害剤の影響

亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みにおよぼすアミノ酸輸送系阻害剤の影響を検討した。

まず、促進拡散輸送系の阻害剤である 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH) を用いて検討した。Na⁺ free 溶液と比較して、Na⁺ free 溶液に BCH を添加すると、L-ヒスチジンの取り込みが単独および亜鉛添加で共に有意に阻害された(Figure 14)。

さらに、能動輸送系の阻害剤である L-glutamic acid γ -monohydroxamate (L-Glu- γ -MH) を用いて検討した。ここでは、促進拡散系の影響を除くため BCH を添加した群を対照とした。BCH と L-Glu- γ -MH を添加すると単独では有意な阻害が見られたが、亜鉛添加時では阻害は認められなかった(Figure 14)。

これらのことから、亜鉛添加により L-ヒスチジン単独で観察された Na⁺依存性共輸送型 System-N 系による L-ヒスチジン取り込みは消失し、促進拡散型トランスポーター System-L のみで細胞内へ輸送されることが判明した。



BCH: 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (system-L transporter)

L-Glu-γ-MH: L-glutamic acid γ-monohydroxamate (system-N transporter)

Figure 14. Uptake rates of L-histidine into rat LMECs in the absence (a) or presence (b) of ZnSO₄. Measurements were made in 143 mmol/L Na⁺ (control), Na⁺-free, Na⁺-free + 1 mmol/L BCH and 143 mmol/L Na⁺ + 1 mmol/L BCH, and then in 1 mmol/L BCH + 1 mmol/L L-Glu-γ-MH, to inhibit uptake via the Na⁺-dependent system-N in the presence of 143 mmol/L Na⁺. Each point represents the mean ± S.E. of four determinations. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 significant differences from the control. #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 significant differences between Na⁺-free and Na⁺-free + 1 mmol/L BCH. ‡*p* < 0.01 significant differences between 1 mmol/L BCH and 1 mmol/L L-Glu-γ-MH + 1 mmol/L BCH. L-Glu-γ-MH L-glutamic acid γ-monohydroxamate.

第五節 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対する pH の影響

L-ヒスチジンの亜鉛添加と非添加での pH による取り込みの影響を検討した。その結果、L-ヒスチジン単独と L-ヒスタミンと亜鉛の添加群との取り込みにおいて pH による有意な差はなく、水素イオンによる影響は認められなかった(Figure 15)。

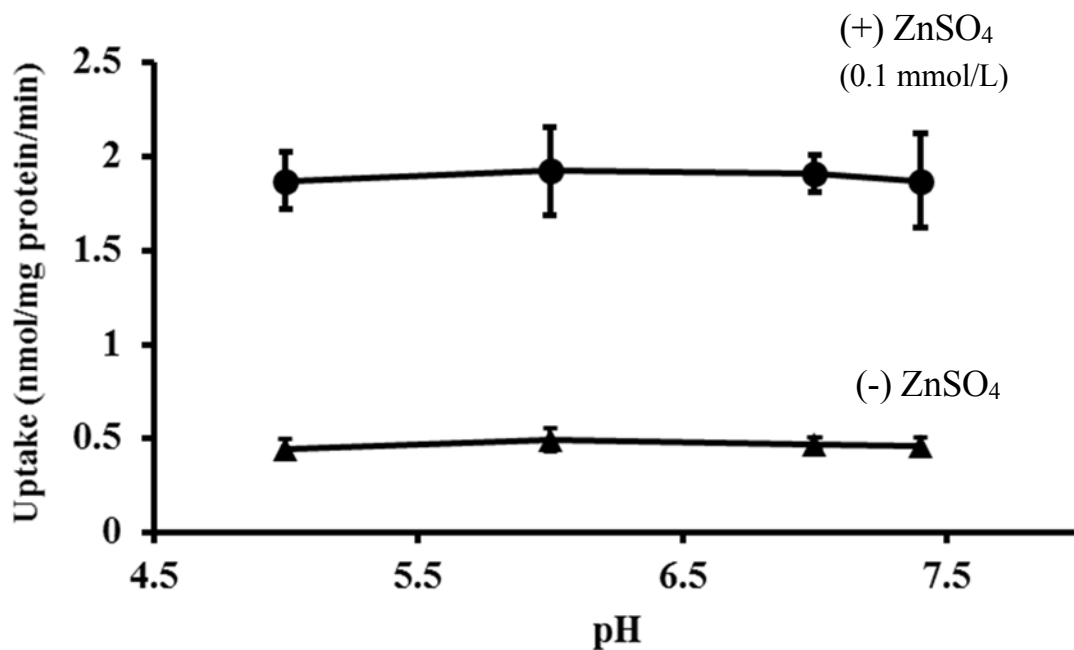


Figure 15. Effects of pH on L-histidine uptake by cultured monolayers of rat LMECs in the absence (▲) and presence (●) of ZnSO₄. L-histidine uptake for 2 min at pH between 5.0 and 7.4 was determined at 37 °C. Each point represents the mean ± S.E. of four determinations.

第六節 小括

トランスウエルに播種した培養マウス LMECs にヒスタミンを添加したところ、添加 1 時間後までフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスが対照群と比べ増加した。しかし、添加 3 時間後には、対照群の値まで回復し TJ が急速に開口して、その後閉口することが明らかになった。すなわち、ヒスタミンは薬物の組織移行を瞬時に増加させる可能性が示唆された。そのメカニズムについて現在、細胞膜に存在する H₁-および H₂-受容体の拮抗薬であるメピラミンおよびシメチジン をそれぞれ前処理し、ヒスタミンによる TJ 開口にいずれの膜受容体が関与するの かを検討中である。

一方、L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質を検討したところ、亜鉛が培養ラット LMECs 内への L-ヒスチジンの取り込みを顕著に増加させた。この増強効果に対する pH 依存性を検討した。水素イオンでの影響は認められなかったことから、L-ヒスチジンの電荷の変化により受ける影響は少ないと考えられる。さらに、亜鉛添加による L-ヒスチジン輸送増強機構を解明するため代謝阻害剤を用い検討した結果、代謝阻害剤は亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込み増強効果に何ら影響をおよぼさなかった。また、L-ヒスチジンの取り込みに対するアミノ酸輸送系阻害剤の影響を検討した結果、亜鉛添加による L-ヒスチジンの増強効果に促進拡散系 System-L の基質である BCH で阻害が認められ、促進拡散系により L-ヒスチジンが取り込まれていることが確認された。この結果より、亜鉛添加により L-ヒスチジン単独で観察された Na⁺依存性共輸送型 System-N 系による L-ヒスチジン取り込みは消失し促進拡散型トランスポーター System-L のみで細胞内へ輸送されることが判明した。促進拡散系は、基質側鎖の電荷変化によって反応性が異なる。System-L 系は Na⁺非依存性促進拡散系であるため、負の電荷を有する細胞内へのこの系による塩基性のアミノ酸の取り込みは、濃度勾配と電位勾配に

よって駆動される。したがって、亜鉛添加による輸送活性の増強は、L-ヒスチジンのイミダゾール基に亜鉛が結合することにより生じた側鎖の電荷状態の変化によるものと考えられた。

亜鉛添加により、L-ヒスチジンの取り込み増加が認められ、培養ラット LMECs 内でのヒスタミン産生増加に繋がる可能性が示唆された。今後、培養ラット LMECs 内で産生されたヒスタミンに対して細胞内において核内受容体が存在するのか否かを検討し、TJ 開口との関係について考察する予定である。

第三章 ラット脳微小血管内皮細胞 (BMECs) 内のフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) タンパク質の発現とその活性

血液脳関門 (BBB) の実体は脳毛細血管内皮細胞であり、全脳の約 1 %を占める。ヒトでは全長約 600 km、表面積約 9 m²にもおよぶこの血管は末梢血管と異なり内皮細胞が TJ を形成する(Figure 16)。内皮細胞は、窓構造がない上に、小胞輸送 (endocytosis) が非常に少ないという特徴を示す。そのため、脳への物質輸送に対し強力な透過的バリアーとなる。これまで、薬物の BBB 透過性を上げるため、薬物の脂溶性を高めて受動拡散速度を増加させる方法が用いられている。しかし、高脂溶性の薬物でも BBB 透過性の低い化合物が存在する。抗ガン剤のビンクリスチンや免疫抑制剤のシクロスポリン A は P-糖タンパク質の基質であり、脳内あるいは血管内皮細胞内から薬物を血管内腔側にくみ出すことにより、BBB の透過性をトランスポーターが積極的に制御していることが知られている。

毛細血管内皮細胞には、細胞中に取り込まれた薬物を代謝する酵素的バリアーが備わっている。L-DOPA は中性アミノ酸輸送系によって内皮細胞に取り込まれ、芳香族-L-アミノ酸脱炭酸酵素によって細胞膜を通過しにくいドパミンへ代謝され、その脳内移行は制限される。また、単離された脳毛細管でもシトクロム P450(CYP)、1-ナフトールグルクロン酸転移酵素およびエポキシ加水分解酵素の薬物代謝に関与する酵素を有しており、それらの発現は生体異物を代謝する能力を示し、脳の保護と大きく関わるということが明らかにされている(21)。

FMO は、求核性ヘテロ原子含有薬物および生体異物と反応して、*N*-および *S*-酸化する哺乳動物の非 CYP 酸化酵素である(22)。5 つの FMO 分子種がヒトおよびマウスにおいて同定されており、化学反応を触媒する場合、NADPH および酸素を必要とする。FMO 発現は、種、組織、年齢および性別に依存する。興味深いことに、

FMO1 は胎児のヒト肝臓で見出されるが、出生時の酵素発現の著しい変化で、年月の経過と共にヒト FMO は FMO3 が優勢になる(23,24)。雄および雌マウスでは、FMO1 タンパク質は高発現され、肝 FMO3 タンパク質は雌に対して性特異的である(25)。ラットおよびマウスの性ホルモンは FMO1 および FMO3 の発現を調節し(26-29)、グルココルチコイドおよび 17β -エストラジオールは、げっ歯類およびヒトにおいて FMO1 および FMO3 遺伝子転写の調節因子であると考えられている(30,31)。FMO3 は、主要ヒト肝臓 CYP3A4 と同様の発現量で存在する(32)。FMO4 タンパク質は、ヒトおよびマウスの肝臓で発現される(33)。しかし、FMO4 はヒトの薬物代謝に大きく関与しない(34)。機能的な FMO2 は、ヒトの肝臓でほとんど発現されない(35)。FMO5 は、マウス(36)およびヒト(37)の肝臓で高発現される。マウス FMO5 によって代謝されることが知られている化学物質はほんのわずかであり(38)、FMO5 の異物代謝への関与は明らかではない。したがって、FMO1 および FMO3 は、化学物質の代謝に関して FMO 分子種で最も重要であると考えられている(39)。ヒト脳ミクロソームに関して、精神活性薬であるクロルプロマジン、イミプラミン、フルオキセチンが FMO で代謝されると報告されている(40)。しかし、FMO 分子種、活性の強さや酵素バリアーとしての役割については不明な点が多くある。

本研究では、単離培養したラット BMECs での FMO 活性を *d*-クロルフェニラミンの FMO 代謝で調べ、関与する FMO 分子種を検討した。

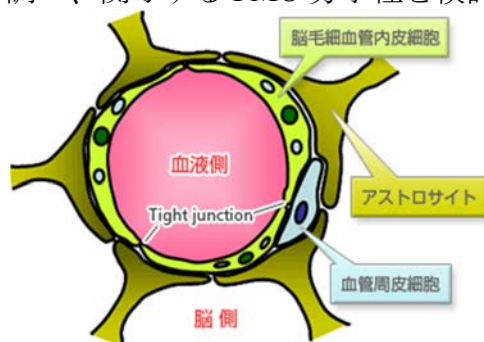


Figure 16. 脳毛細血管の断面図

Goldstein et al, *Sci. Am.*, 255, 74-83, 1986

第一節 *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化反応に対する pH の影響

培養ラット BMECs ホモジネートを用い、NADPH 再生系存在下、*d*-クロルフェニラミン代謝に対する pH の影響を検討した。生成物 *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成を測定し Michaelis-Menten 式にあてはめると、pH 7.4 条件下と比較して pH 8.4 の条件下で、高い K_m 値と V_{max} 値が得られた(Figure 17)。

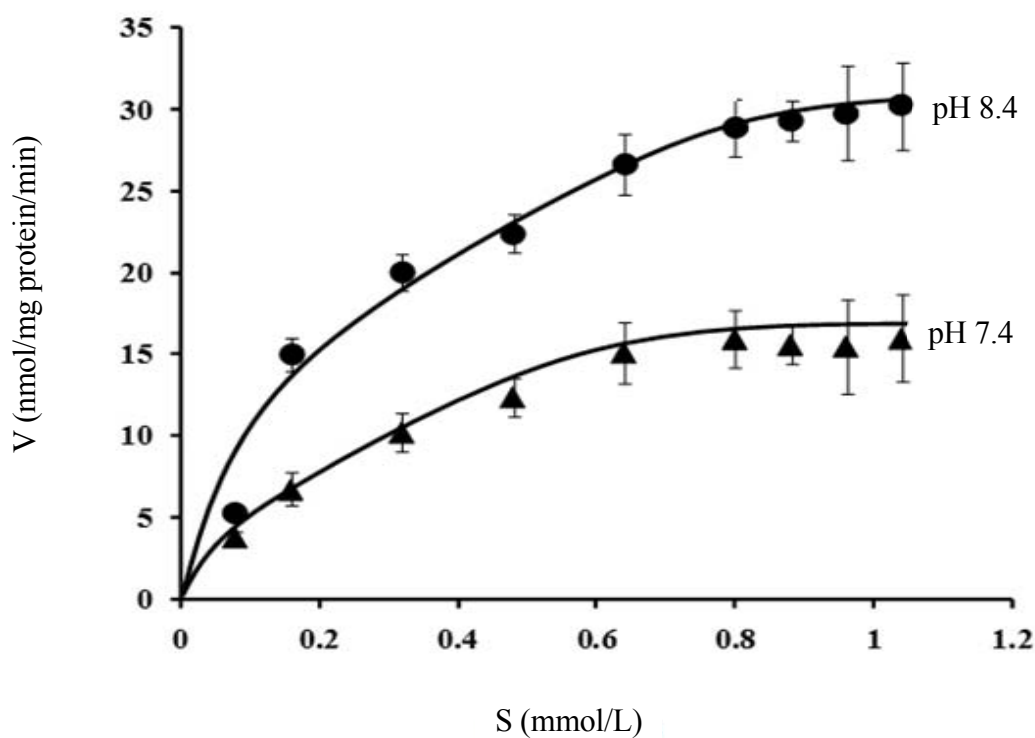


Figure 17. Michaelis-Menten plots for the formation of *d*-chlorpheniramine *N*-oxide (▲, pH 7.4; ●, pH 8.4) from *d*-chlorpheniramine incubated with homogenized rat BMECs. *d*-Chlorpheniramine metabolism was determined at 37°C for 2 min at concentrations between 0.08 and 1.04 mmol/L. Each point represents the mean \pm S.E. of five experiments. V, metabolite formation rate (nmol/mg protein/min); S, *d*-chlorpheniramine concentration (mmol/L).

先の結果から得られた速度論的パラメーターを Table 3 に示す。*N*-酸化への代謝クリアランス値 (V_{\max}/K_m) は pH 7.4 条件下に比べ、pH 8.4 条件下で約 1.3 倍高い値であった。

Table 3. Kinetic parameters for *N*-oxide formation from *d*-chlorpheniramine at pH 7.4 and pH 8.4 in rat BMECs.

	K_m (mmol/L)	V_{\max} (nmol/mg protein/min)	V_{\max}/K_m (mL/mg protein/min)
pH 7.4	0.381 ± 0.051	22.6 ± 3.8	0.059 ± 0.002
pH 8.4	0.703 ± 0.082*	53.0 ± 4.5*	0.075 ± 0.003*

Each value is expressed as the mean ± S.E. of five experiments. * $P < 0.05$, significantly different between pH 7.4 and pH 8.4.

第二節 *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化活性に対するメチマゾールの阻害効果

培養ラット BMECs ホモジネートに FMO の代表的な基質メチマゾールを添加し、*d*-フェニルクロラミンの *N*-酸化活性を評価した。メチマゾールは、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成を、用量依存的に阻害、50 %阻害濃度 (IC₅₀) は 1 μmol/L と算出された(Figure 18.)。

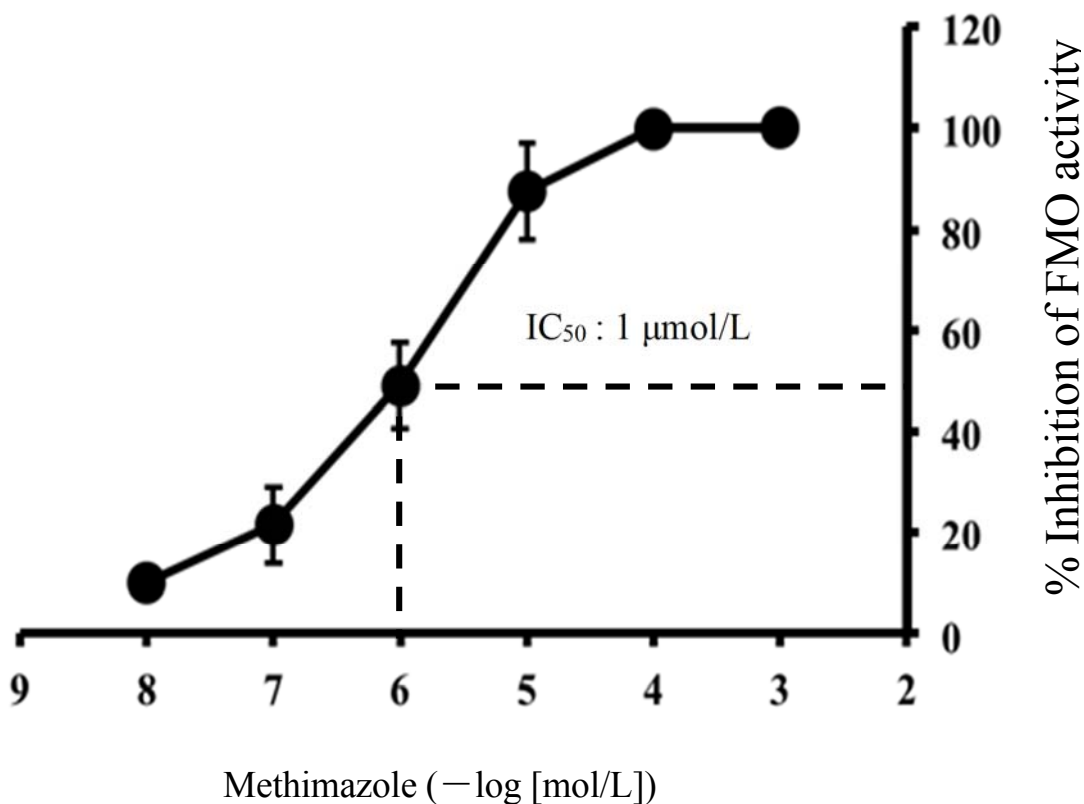


Figure 18. Effect of methimazole on formation of *d*-chlorpheniramine *N*-oxide in rat BMECs. The FMO activities were determined with *d*-chlorpheniramine (0.16 mmol/L) at 37 °C for 2 min. Enzyme activities in the presence of methimazole are expressed as the percent inhibited of the total activity in the absence of this compound. Values represent the mean ± S.E. of five experiments.

第三節 *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化反応に対するメチマゾールの阻害様式

メチマゾール 1 $\mu\text{mol/L}$ を添加し、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成量を測定した。得られた結果を Lineweaver-Burk プロットで解析すると、その阻害様式は競合的であることがわかった(Figure 19)。阻害定数 K_i 値は 0.53 $\mu\text{mol/L}$ が得られた。

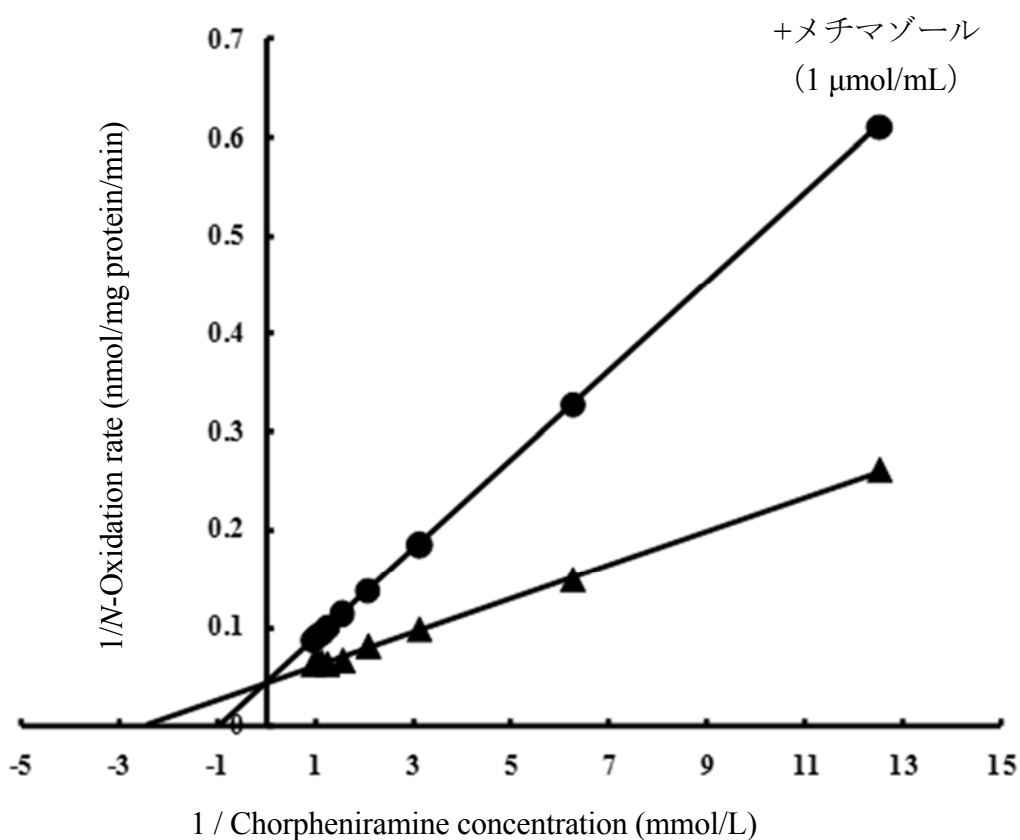


Figure 19. Inhibition of *d*-chlorpheniramine *N*-oxidation by methimazole in rat BMECs. Lineweaver-Burk plots of the reciprocal of the initial velocity of *d*-chlorpheniramine *N*-oxidation against the reciprocal of the *d*-chlorpheniramine concentration in the presence of methimazole. Each line is the best fit through the means of FMO activities for three data. ▲, no drug added; ●, methimazole (1 $\mu\text{mol/mL}$).

第四節 FMO タンパク質の発現

培養ラット BMECs に発現する FMO 分子種をウエスタンブロット分析で確認すると、FMO1、FMO2 および FMO5 の発現が認められた。しかし、FMO3 と FMO4 は検出限界以下であった(Figure 20)。

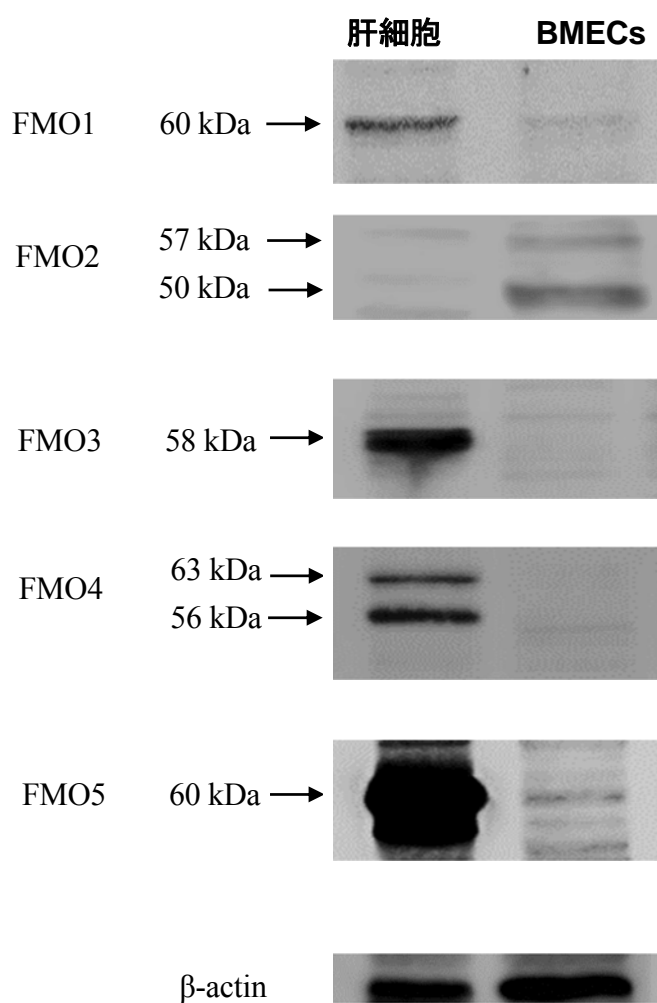


Figure 20. Western blots for FMOs in rat BMECs.

培養ラット BMECs のホモジネートを用い、NADPH 再生系存在下、*d*-クロルフェニラミン代謝への pH の影響を検討した結果 (Figure 17) を、Eadie-Hofstee プロット解析すると、*N*-酸化体生成は pH 7.4 および pH 8.4 条件下で一相性を示した (Figure 21)。この結果は培養ラット BMECs に発現する FMO1、FMO2 および FMO5 のうち、1つの分子種が *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化に関与すると考えられる。

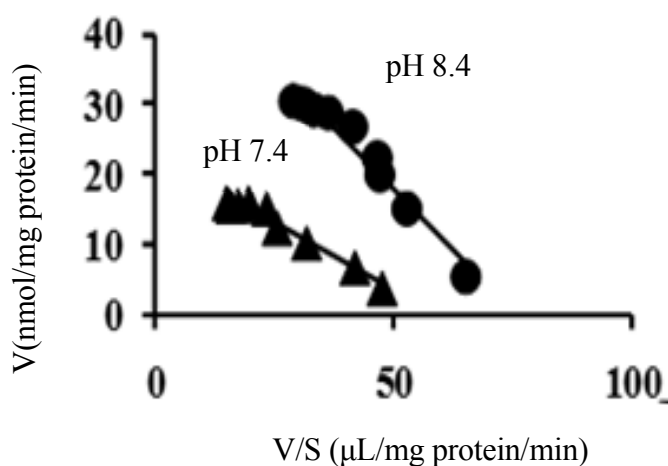


Figure 21. Eadie-Hofstee plots for the formation of *d*-chlorpheniramine *N*-oxide (▲, pH 7.4; ●, pH 8.4) from *d*-chlorpheniramine incubated with homogenized rat BMECs. *d*-Chlorpheniramine metabolism was determined at 37°C for 2 min at concentrations between 0.08 and 1.04 mmol/L. Each point represents the mean ± S.E. of five experiments. V, metabolite formation rate (nmol/mg protein/min); S, *d*-chlorpheniramine concentration (mmol/L).

第五節 肝細胞 (rtNHeps) と BMECs 内 FMO の活性比較

培養ラット BMECs およびラット肝細胞(rtNHep)のホモジネートにおける *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化活性を検討した。培養ラット BMECs およびラット rtNHep における *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成速度は、それぞれ 6.73 および 12.06 nmol/mg protein/min であった(Table 4)。培養ラット BMECs による *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成は、ラット rtNHep による *N*-酸化体生成の約 1/2 であった。

Table 4. Formation of *d*-chlorpheniramine *N*-oxide from *d*-chlorpheniramine in rat BMECs and rtNHeps.

	BMECs	rtNHeps
<i>N</i> -oxidation Formation rate (nmol/mg protein/min)	6.73 ± 1.01	12.06 ± 1.14

FMO enzyme in rat BMECs and rtNHeps was incubated with 0.16 mmol/L *d*-chlorpheniramine for 2 min at 37 °C in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4). Each value is expressed as the mean ± S.E. of five experiments.

第六節 小括

セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害(SNRI)の作用をもつ *d*-クロルフェニラミン、三環系抗うつ薬のイミプラミンおよび総合失調症薬のクロルプロマジンなどの第三級アミンは中枢作用を持ち、ヒト脳ミクロソームで代謝され、*N*-酸化体になる。

血液脳関門を構成するラット脳毛細血管から単離培養した培養ラット BMECs における FMO による *d*-クロルフェニラミン代謝と、FMO 分子種を調べた。pH 8.4 での *N*-酸化の代謝クリアランス値 (V_{\max}/K_m) は pH 7.4 よりも有意に高く、FMO は至適 pH が pH 8.5 付近にある(43)ことから、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成に関与する酵素である可能性がある。このことは、中脳ニューロン細胞でのロテノン誘発パーキンソン病モデルにおいて、Parkin および FMO1 の遺伝子発現は、カスパーゼ 3 の活性化により低下する(41)。ラット脳の微小血管ホモジネート中で FMO に代謝される 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine *N*-酸化活性は全脳ホモジネートを用いた結果と比べると 21 倍と高い(42)。という報告と一致する。さらに、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成に対する FMO 酵素の関与を決定するために、FMO の基質であるメチマゾールの影響を調べた。その結果、Figure 18 および Figure 19 に示すように、メチマゾールによって用量依存的に阻害され、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の阻害様式は競合的なので、培養ラット BMECs における FMO 酵素の存在が考えられる。FMO タンパク質はウエスタンブロット法で確認すると、FMO1、FMO2 および FMO5 の分子種が確認できた。このことは、メチマゾールが、マウス FMO1、FMO2 および FMO3 によって代謝される(44)。報告と一致した。pH 7.4 および 8.4 での培養ラット BMECs における *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体のそれぞれの生成を Eadie-Hofstee プロットし、解析すると一相性であった。したがって、培養ラット BMECs 内タンパク質 FMO1、

FMO2 および FMO5 のうち 1 つの分子種の関与が明らかになった。肝細胞で FMO1、FMO3、FMO4 および FMO5 が発現しており、*d*-クロルフェニラミンは、高純度なブタ肝臓由来の FMO1 で代謝される(45)。報告があることより、培養ラット BMECs での *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化反応は FMO1 の関与が考えられた。

本実験結果から、培養ラット BMECs における *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体への生成とラット肝細胞における生成との比較により、培養ラット BMECs の FMO 活性はラット肝細胞の FMO 活性に匹敵することがわかった。脳内の BBB を構成する培養ラット BMECs は、脳への薬物の代謝バリアーになり得ることが示唆される。

第四章 ラット胸部大動脈血管内皮細胞 (TAECs) におけるイミプラミン *N*-酸化反応と *N*-脱メチル化反応

血管の面積比は、動脈：毛細血管：静脈でおよそ1：700：2、全身の血液量の分布は、動脈に20%、毛細血管に5%、静脈に75%である。大動脈内皮細胞は、健常人であれば最高/最低血圧120/80 mmHg前後の脈圧に絶えず曝され、他の体細胞と異なった特殊環境下にある。

血管内皮細胞の*in vitro*研究では、ブタやウシ由来の大動脈内皮細胞や、ヒト臍帯静脈内皮細胞が使用されている。これらの内皮細胞は小型、類円形で均一な細胞形態を示し敷石状に配列する。ヒト臍帯静脈内皮細胞は、Arochlor 1254 および β -naphthoflavoneに暴露されると、CYP1A2 mRNAが誘導される(46)。ThumとBorlakらはラット大動脈内皮細胞が薬物代謝酵素の遺伝子(CYP1A1、CYP2B1/2、CYP2C11およびCYP2E1)を発現していることを報告している(47)。ブタ大動脈内皮細胞では2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin、3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl、benzo[a]pyreneまたは β -naphthoflavoneに暴露されると、CYP1A1が誘導される(48)。ヒト冠状動脈内皮細胞にCYP1A1、CYP2A6/7、CYP2A13、CYP2B6/7、CYP2C8、CYP2E1、CYP2J2およびサイクロフィリン(ハウスキーピング遺伝子)が発現することを見出し、さらにカルシウム拮抗薬ベラパミルの代謝能力を有することを報告している(49)。

胸部大動脈血管は、経肺吸収された薬物が最初に通過する血管であり、薬物が標的組織に到達する前に、動脈血管の内皮細胞 (Figure 22) で代謝を受けると、組織移行性は低くなる。したがって血管内に長く留まっている薬物では、総延長が数万kmにもおよぶ(50)と言われている動脈血管の内皮細胞での代謝能力は肝や小腸での代謝能力に匹敵することが考えられる。

イミプラミンの代謝経路は多岐にわたり、薬物代謝酵素である CYP (1A、2C、2D6、3A) および FMO の活性を確認する有用な基質である(Figure 23)。臨床では、三環系抗うつ薬のイミプラミンは長期投与される。投与された患者の血液中に常時、長時間存在するため、培養ラット TAECs での代謝が薬物の体内動態に影響を与えることが考えられる。

本研究では、大動脈血管内皮細胞での CYP および FMO の酵素の局在を、培養ラット TAECs を用い広範囲の基質であるイミプラミンの代謝活性を評価した。

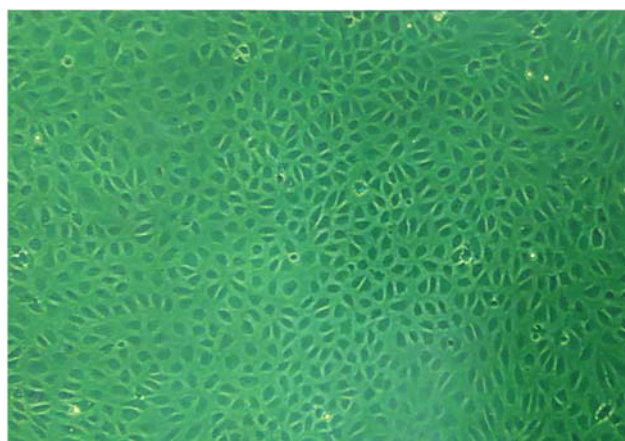


Figure 22. ラット胸部大動脈血管内皮細胞

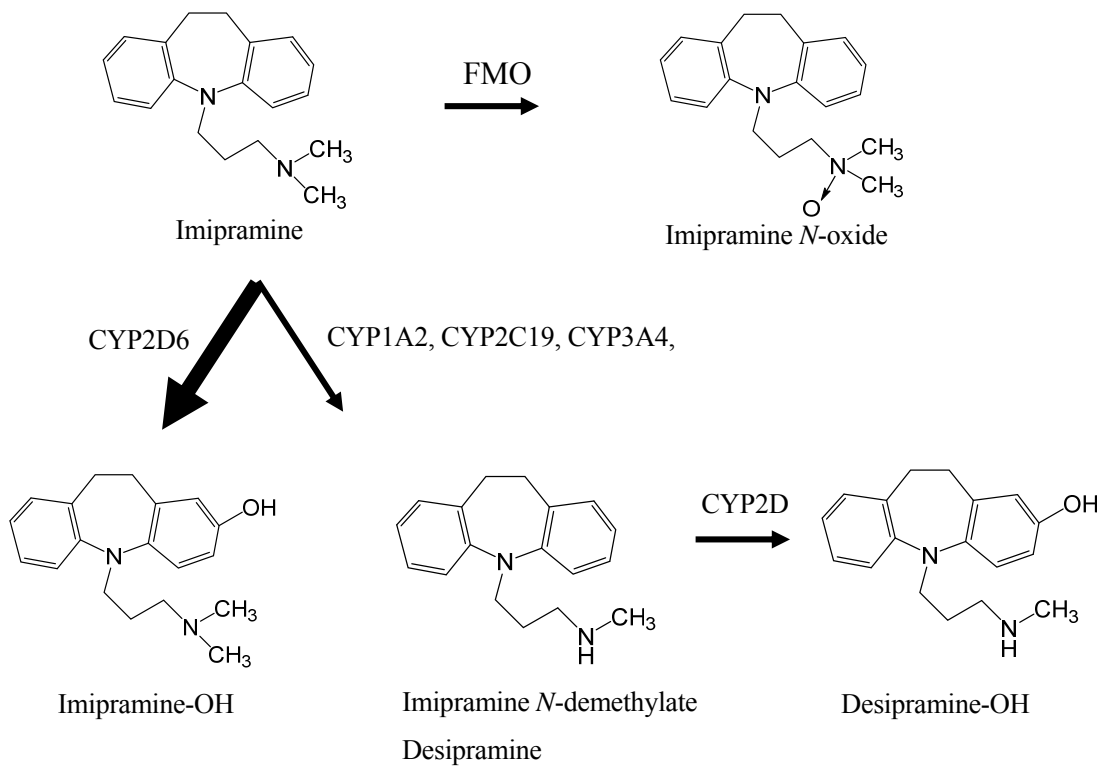


Figure 23. ヒトにおけるイミプラミンの代謝経路

第一節 イミプラミン *N*-酸化反応と *N*-脱メチル化反応

培養ラット TAECs のホモジネートを用い、NADPH 再生系存在下、イミプラミンの *N*-酸化体および *N*-脱メチル化体を測定した。そのデータを Michaelis-Menten 式にあてはめると、イミプラミン *N*-酸化体はイミプラミン *N*-脱メチル化体に比較して反応速度が速かった(Figure 24)。本実験中、肝ミクロソームの代謝物であるイミプラミンおよびデシプラミンの 2-水酸化体は出現しなかった。

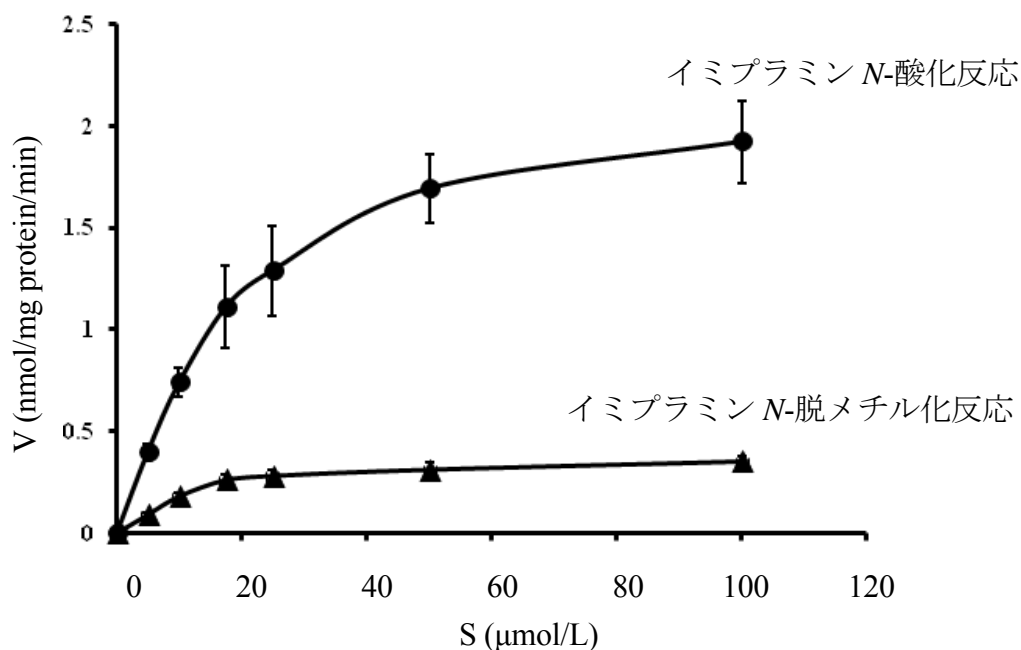


Figure 24. Michaelis-Menten plots for formation of desipramine (▲) and imipramine *N*-oxide (●) from imipramine incubated with homogenized rat TAECs. Imipramine metabolism was determined at 37 °C for 2 min at concentrations between 5.0 and 100 μmol/L. Each point represents the mean ± S.E. of five experiments. V, metabolite formation rate (nmol/mg protein/min); S, imipramine concentration (μmol/L).

先の結果から速度論的パラメーターを算出すると、イミプラミン *N*-酸化反応はイミプラミン *N*-脱メチル化反応に比べ代謝クリアランス値 (V_{\max}/K_m) は、約 5 倍高値を示した(Table 5)。

Table 5. Kinetic parameters for *N*-demethylate and *N*-oxide formation from imipramine in rat TAECs.

	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max} ($\text{nmol/mg protein/min}$)	V_{\max}/K_m (mL/mg protein/min)
<i>N</i> -Demethylation	39.9 \pm 5.3	0.86 \pm 0.42	0.022 \pm 0.003
<i>N</i> -Oxidation	20.0 \pm 4.5	2.27 \pm 0.27	0.114 \pm 0.014

Each value is expressed as the mean \pm standard error of five experiments.

第二節 イミプラミン *N*-脱メチル化反応への抗シトクロム P450

(CYP) 抗体の影響

イミプラミン *N*-脱メチル化に対する CYP 分子種血清抗体による阻害効果の評価した。抗 CYP2C11 血清と抗 CYP3A2 血清は *N*-脱メチル化反応を、それぞれ約 40 % と約 30 % 阻害した。一方、抗 CYP1A1 血清および抗 CYP2B1 血清は、*N*-脱メチル化反応を明らかに阻害しなかった (Figure 25)。このことから培養ラット TAECs におけるイミプラミン *N*-脱メチル化は CYP2C11 および CYP3A2 が関与することが明らかとなった。

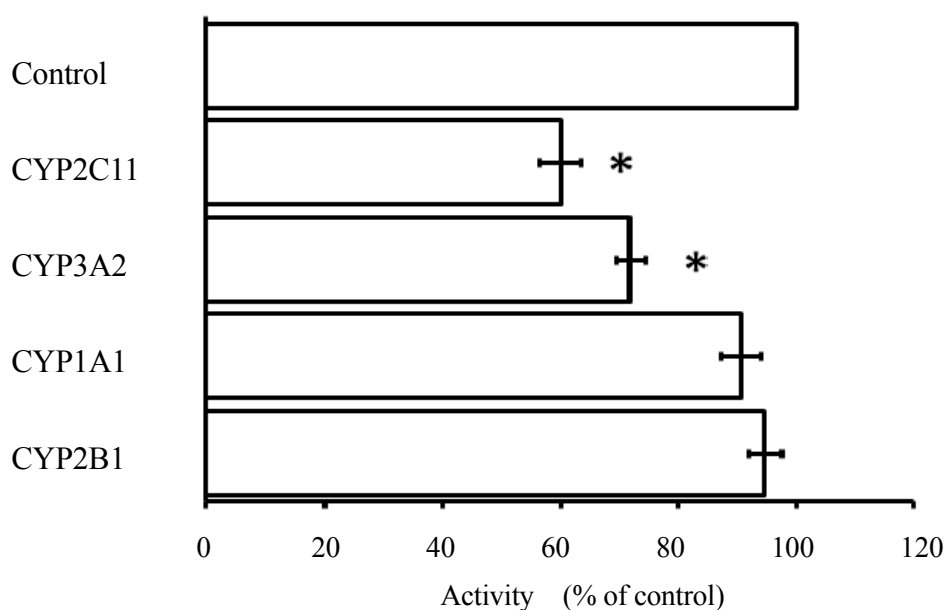
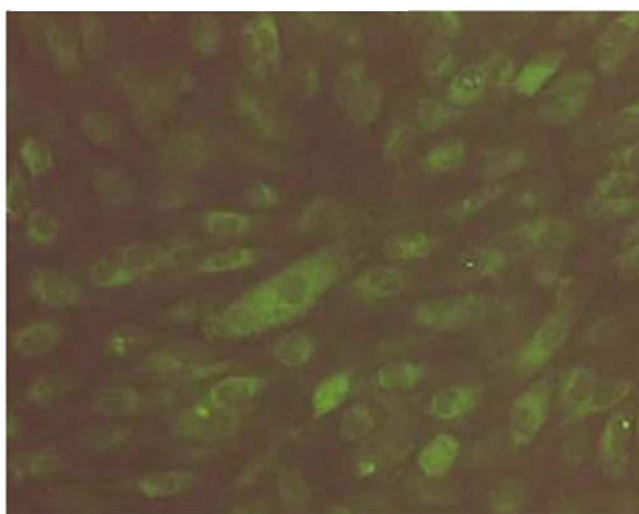


Figure 25. The inhibitory effect of anti-CYP antibodies on the *N*-demethylation activity in rat TAECs. The rat TAECs homogenate proteins (500 μ g) were combined with 10 μ L each of various anti-rat CYP sera and normal goat or rabbit serum and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min before adding the reaction mixture containing 25 μ mol/L imipramine. Values for the antibody-treated group are expressed as a percentage of activity of the control group. * p < 0.05, compared with the control.

第三節 CYP2C11 および CYP3A2 のタンパク質発現

CYP2C11 および CYP3A2 の細胞内局在を、免疫蛍光染色法により確認した (Figure 26)。その結果、CYP2C11 および CYP3A2 のタンパク質は、いずれも培養ラット TAECs での発現が認められた。

(A)CYP2C11 の局在



(B)CYP3A2 の局在

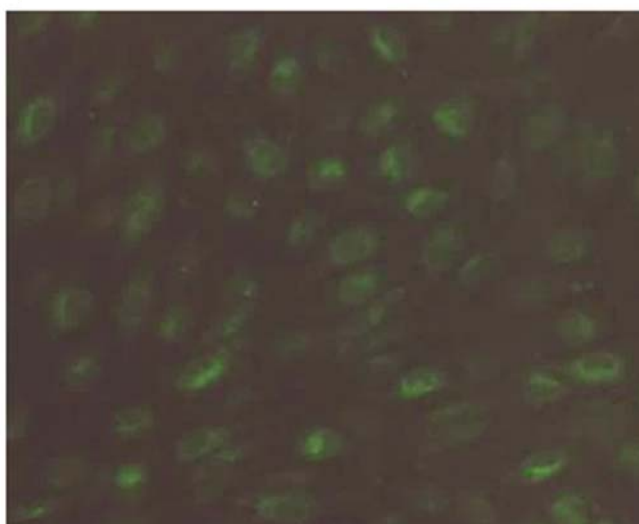


Figure 26. Indirect immunofluorescent histochemistry of rat TAECs using the polyclonal anti-CYP 2C11 (A) and anti-CYP 3A2 (B) antibodies.

第四節 イミプラミン *N*-酸化反応および *N*-脱メチル化反応に対する

pH の影響

イミプラミン *N*-酸化反応は、pH 7.4 条件下と比較して pH 8.4 の条件下において約 1.4 倍高い活性を示した。pH 8.4 条件下でイミプラミン *N*-酸化反応は *N*-脱メチル化反応と比較して約 5 倍高い活性を示した。一方、イミプラミン *N*-脱メチル化反応は pH による影響を受けなかった(Figure 27)。これらの結果からイミプラミン *N*-酸化は主に FMO により代謝されると考えられた。

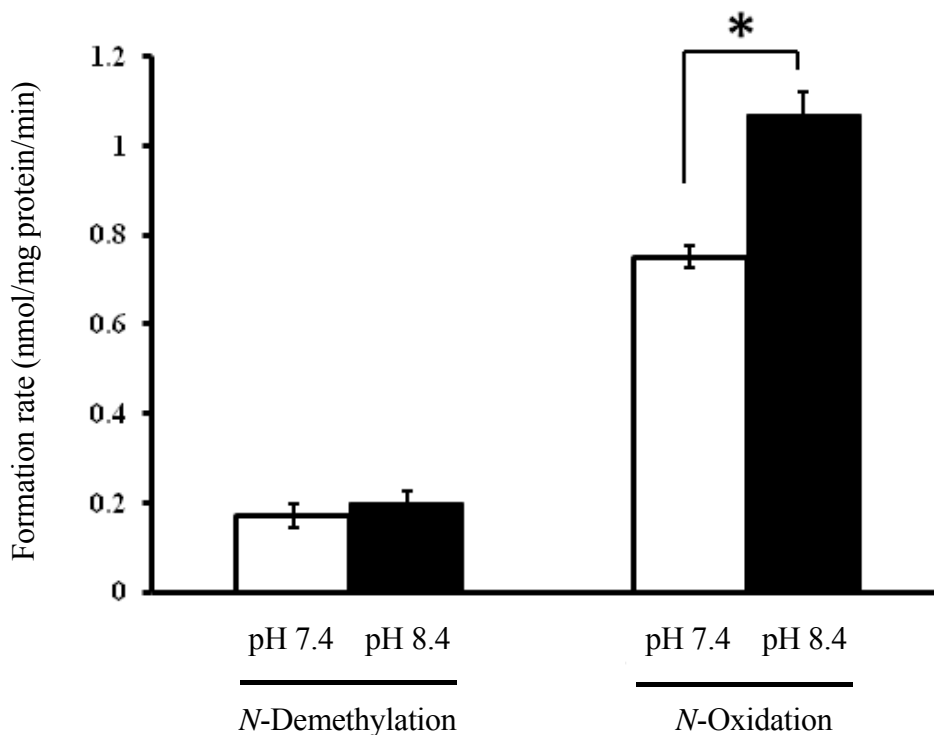


Figure 27. Effect of pH on metabolism of imipramine by rat TAECs homogenates. Imipramine metabolism was determined with 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4 or pH 8.4. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of five experiments. * $P < 0.05$ indicates a statistically significant difference between pH 7.4 and pH 8.4.

第五節 イミプラミンの *N*-酸化反応に対するメチマゾールの阻害様式

メチマゾールを添加し、イミプラミン *N*-酸化体生成量を、Lineweaver-Burk プロットで解析した(Figure 28)。その結果より、阻害様式は競合的で *N*-酸化反応に対する 1 $\mu\text{mol/L}$ のメチマゾールの阻害定数 K_i 値は、0.80 $\mu\text{mol/L}$ であった。

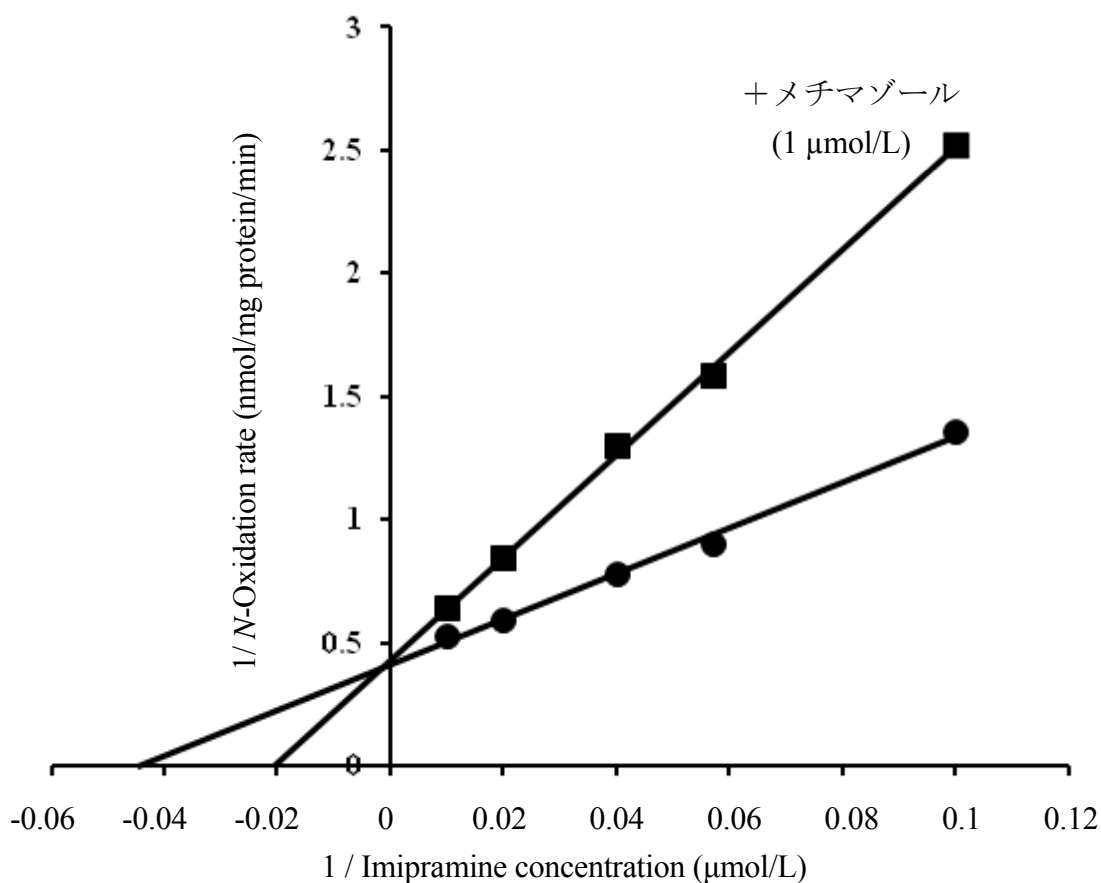


Figure 28. Inhibition of imipramine *N*-oxidation by methimazole in rat TAECs. Lineweaver-Burk plots of the reciprocal of the initial velocity of imipramine *N*-oxidation against the reciprocal of the imipramine concentration in the presence of methimazole. Each line is the best fit through the mean of FMO activities for three data points. ●, no drug added; ■, methimazole (1 $\mu\text{mol/L}$).

第六節 小括

本研究では、イミプラミン代謝酵素の CYP および FMO の活性を定量し、培養ラット TAECs において *N*-脱メチル化反応に関わる CYP 分子種を決定した。培養ラット TAECs において主にイミプラミン *N*-酸化体が生成され、イミプラミン *N*-脱メチル体は比較的少量の生成が認められた。ラット肝ミクロソームによって、主に *N*-脱メチル化のデシプラミンおよび芳香族水酸化のイミプラミン 2-水酸化体が生成され、イミプラミン *N*-酸化体生成はわずかである。培養ラット TAECs によって得られる代謝結果はラット肝臓によって得られる代謝結果と主経路が異なる。

Sakurai らは、培養ラット BMECs において FMO1、FMO2 および FMO5 タンパク質の発現が、ウェスタンブロットティング分析によって確認され、*d*-クロルフェニラミンの *N*-酸化が培養ラット BMECs で行われることをすでに報告している (51)。さらに、培養ラット LMECs では、ニコチンが CYPs (CYP2C11 および CYP3A2) および FMO で、それぞれコチニンおよびニコチン *N'*-酸化体に代謝される (52)。単離された脳微小血管内皮細胞 (BMECs) が、CYP、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADPH) - シトクロム P450 レダクターゼ、1-ナフトールグルクロン酸転移酵素、およびエポキシドヒドロラーゼのような薬物代謝に関与する酵素の活性を有するとの報告もなされている(21)。

抗ラット CYP 抗体 (抗 CYP2C11、抗 CYP3A2、抗 CYP1A1 および抗 CYP2B1) を用いて、イミプラミンの *N*-脱メチル化に関与する CYP 分子種を検討した。その結果、Figure 25 に示すように、抗体の阻害は、CYP2C11 および CYP3A2 が培養ラット TAECs におけるイミプラミンの *N*-脱メチル化に関与する主な分子種であることが示唆された。抗 CYP1A1 および抗 CYP2B1 は、培養ラット TAECs におけるイミプラミンの *N*-脱メチル化を明らかに阻害しなかった。さらに、Figure 26

に示すように、免疫蛍光染色法を用いて培養ラット TAECs における CYP2C11 および CYP3A2 タンパク質の存在を確認し、培養ラット TAECs における *N*-脱メチル化反応に関与する CYP 分子種が、培養ラット LMECs におけるニコチンの *N*-脱メチル化の報告(52)と同一であることが分った。

一般に、FMO は、CYP によって媒介される反応と比較して、反応において比較的熱不安定であり、高い至適 pH である(43)。Stevens らはイミプラミンがイヌ肝臓からの (cDNA) FMO1 (ヒト FMO1 に対して 89 %相同) で *N*-酸化反応されると報告している(53)。本研究では、培養ラット TAECs での pH 8.4 での *N*-酸化体の生成速度は pH 7.4 よりも高いので、FMO はイミプラミン *N*-酸化体の生成を担う酵素であることが考えられる。しかし、pH 7.4 または pH 8.4 で *N*-脱メチル化体の生成に有意差はなかった。さらに、イミプラミン *N*-酸化体の生成による FMO 酵素の関与を決定するために、この活性に対するメチマゾールの効果を調べた。メチマゾールは、FMO の周知の阻害剤である(43)。Figure 27 に示すように、イミプラミン *N*-酸化体の生成は、用量依存的にメチマゾールによって競合的に阻害され、培養ラット TAECs における FMO 酵素の存在を明らかにした。

培養ラット TAECs は脳および肺毛細血管内皮細胞と同様に薬物代謝酵素の CYP および FMO が存在していることが明らかになり、薬物の代謝バリアー機能を有する可能性が示唆される。

第五章 総括および結論

血液中に運ばれた薬物が組織に移行する際、第一関門となるのが毛細血管内皮細胞である。薬物の組織移行量が、その効果に直結する。したがって *in vitro* で優れた効果を示す薬物が合成されても組織移行性が悪ければ、この段階でドロップアウトしてしまう。これまで、薬物の組織移行については主にトランスポーターに関する研究に焦点が当てられていた。しかし、薬物の効率的な組織へのデリバリー戦略を考えるには、毛細血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明が必要となる。本学位論文では、薬物の組織への輸送を理解するため培養微小血管内皮細胞を用い、薬物の細胞間隙に関するタイトジャンクション (TJ) の形成とその開口、さらに薬物の消失に関与する薬物代謝能力の有無を検討した。

第一章では、培養マウス肺微小血管内皮細胞 (LMECs) の播種 1 日目から Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA の発現が確認された。なかでも Claudin-1 の mRNA レベルは培養 6 日目から有意に増加し、7 日目には基準値 (1 日目) の約 7 倍に達し、その後、8 日目に基準値レベルまで戻った。しかし、Occludin、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA レベルは培養 8 日目まで基準値と大きな差はなかった。培養マウス LMECs をフラスコに播種し、コンフルエントに達した培養 6 日目における TJ タンパク質を観察から、Occludin、Claudin-1、-4、および ZO-1 のタンパク質の発現が認められた。培養マウス LMECs は、経日的に経内皮電気抵抗値およびフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスの測定から 6-7 日目に TJ の形成が確認された。このことから、Claudin-1 の mRNA 発現が TJ の強固な形成に関与すると考えられた。今後、培養マウス LMECs の TJ の状態を知る上で Claudin-1 の mRNA 発現が有用な手がかりになる可能性が考えられる。本章において、培養マウス LMECs の TJ が確立されたことから、第二章での TJ の

開口について、その評価検討が可能になった。

第二章では、トランスウエルに播種した培養マウス LMECs にヒスタミンを添加したところ、フルオレセインの細胞間隙透過クリアランスがコントロール群と比べて有意に上昇し、しかもヒスタミンは TJ の開口を可逆的に引き起こした。ヒスタミンが H₁ 受容体に結合する場合には、Gq/11 タンパク質、ホスホリパーゼ C-β を介してプロテインキナーゼ C が活性化し、H₂ 受容体に結合する場合には Gs タンパク質、アデニル酸シクラーゼを介して ATP から cAMP になりプロテインキナーゼ A が活性化し、TJ タンパク発現を低下させ TJ 開口に繋がっていくと推定される。今後、細胞膜に存在する H₁ および H₂ 受容体を介した作用メカニズムについて検討する予定である。一方、培養ラット LMECs に取り込まれた L-ヒスチジンから L-ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスタミンが産生される。細胞内ヒスタミンをリガンドとする核内受容体が存在すると想定した場合、細胞内で産生されるヒスタミンが、TJ の開口に関わることも予想される。本研究では、第一段階として、細胞内への L-ヒスチジン取り込み増加がヒスタミン産生の促進に繋がると考え、L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質の探索を行った。その結果、体内必須微量元素である亜鉛添加により L-ヒスチジン単独で観察された Na⁺ 依存性共輸送型 System-N 系による L-ヒスチジン取り込みは消失し、促進拡散型トランスポーター System-L のみで細胞内へ輸送されることが判明した。亜鉛添加が L-ヒスチジンの取り込みを顕著に増加し、ヒスタミンの産生を増加させる可能性が示唆された。前述した細胞外に存在するヒスタミンとは別に、微小血管内皮細胞内で HDC によって産生されたヒスタミンに作用について今後、特にヒスタミンをリガンドとする核内受容体の解明に着手する予定である。

第三章では、血液脳関門 (BBB) を構成するラット脳微小血管内皮細胞 (BMECs) での FMO 活性を検討するために FMO の基質である第三級アミンを持つ *d*-クロルフェニラミンを用いて検討した。培養ラット BMECs は、pH 7.4 およ

び pH 8.4 条件下で *d*-クロルフェニラミンを *N*-酸化した。*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化への代謝クリアランス値 (V_{\max}/K_m) は pH 7.4 条件下に比べ pH 8.4 条件下で約 1.3 倍高い値を示した。FMO の代表的な基質であるメチマゾールの添加は、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成を用量依存的に阻害し、その阻害様式は競合的であることがわかった。また、培養ラット BMECs に発現する FMO 分子種をウェスタンブロット法で確認すると、FMO1、FMO2 および FMO5 のバンドが確認された。Eadie-Hofstee プロット解析から、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成は pH 7.4 および pH 8.4 条件下で一相性を示した。FMO 分子種 FMO1、FMO2 および FMO5 のうち、1つの分子種が *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成に関与すると考えられる。培養ラット BMECs とラット肝細胞の FMO 発現を比較し、*d*-クロルフェニラミンが肝臓で FMO1 により代謝されることから、培養ラット BMECs での *N*-酸化体生成は FMO1 によって触媒されると考えられる。培養ラット BMECs の *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成は、ラット肝細胞における *N*-酸化体生成の約 1/2 を示した。しかし、脳毛細血管内皮細胞数の存在を考えると肝細胞と同程度の FMO 活性を有していると推察される。これらの結果は、BBB を構成する培養ラット BMECs は FMO を有する重要な薬物の代謝バリアーであることがわかった。

第四章では、培養したラット胸部大動脈血管内皮細胞 (TAECs) が三環系抗うつ薬で、第三級アミンであるイミプラミンを代謝する能力を有するかを検討した。培養ラット TAECs は、イミプラミンを CYPs および FMO によりそれぞれ *N*-脱メチル化体および *N*-酸化体を生成した。イミプラミン *N*-酸化体反応の代謝クリアランス値 (V_{\max}/K_m) は、*N*-脱メチル化体反応の約 5 倍であり、FMO による反応が CYP による反応よりも速い速度で進行することが認められた。さらに、培養ラット TAECs におけるイミプラミン *N*-脱メチル化反応は、抗ラット抗 CYP2C11 血清および抗 CYP3A2 血清を用いた代謝反応により CYP2C11 および CYP3A2 が関与

することが示唆された。CYP2C11 および CYP3A2 タンパク質は、ポリクローナル抗 CYP 抗体を用いた免疫蛍光染色法により培養ラット TAECs に発現していることが明らかになった。一方、イミプラミン *N*-酸化反応は、pH 7.4 条件下と比較して pH 8.4 条件下において約 1.4 倍高い活性を示した。FMO の基質であるメチマゾール添加により *N*-酸化反応の阻害効果が認められ、阻害様式は競合的であった。イミプラミン *N*-酸化は培養ラット TAECs において主に FMO により代謝されると考えられる。これらの結果は、培養ラット TAECs が肝細胞の他に薬物の代謝能力を有する重要な機能を持つことが示唆された。

以上の知見より、タイトジャンクション (TJ) の開口と血管内皮細胞内薬物代謝の回避は組織への薬物の効率的なデリバリー戦略構築の鍵となり、新薬の開発およびこれまでドロップアウトした薬物の新薬開発への再評価に繋がるものと考ええる。

実験の部

第一章 関連実験

1-1 実験動物

3 週齢 C57 BL/6 雄性マウス (日本エスエルシー) を用いた。日内変動を考慮して温度 23 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、照度サイクル 12 時間 (明期 ; 7:00-19:00) の環境にて、一定期間、固形飼料 (MF、オリエンタル酵母) と水を自由に摂取させて飼育した。

1-2 試薬

ゲンタマイシン硫酸塩、アンホテリシン B およびフルオレセインナトリウムはシグマ - アルドリッチから購入した。D-MEM/F-12、ヘパリン、HEPES、FBS、HS は Gibco BRL、Percoll は Pharmacia から購入したものを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

組織培養液

M199 培地は M199 に 20 mmol/L HEPES、25 mmol/L NaHCO_3 、50 mg/L ゲンタマイシン硫酸塩、2.5mg/L アンホテリシン B、10 kU/L ヘパリンを 0.2 μm のフィルターを用いてろ過を行い無菌に回収した。

LMECs culture medium は、D-MEM/F-12 に 20 mmol/L HEPES、25 mmol/L NaHCO_3 、50 mg/L ゲンタマイシン硫酸塩、2.5 mg/L アンホテリシン B、20 kU/L ヘパリン、3 μg /L 亜セレン酸、10 μg /L EGF、これに 5 % FBS、HS をそれぞれ加え 0.2 μm のフィルターを用いてろ過を行い、無菌に回収した。

1-3 培養マウス肺微小血管内皮細胞(LMECs)の単離および培養法

マウス 30 匹を断頭後、全肺を摘出し、肺葉の外側部を削ぎ落とした。取り出した肺塊を、剃刀 3 枚を合わせた器具を用いて肺を細切し、M199 培地 25 mL で洗浄し、40 μm のナイロンメッシュでろ過した。ナイロンメッシュ上の肺細切を取り、M199 培地 25 mL を入れ手でよく振った。その後、600 $\times\text{g}$ にて 10 分間遠心し、上澄みを取り除いた後、0.6% コラゲナーゼ 10 mL 調製し、ろ過フィルターを通して沈査に入れた。激しく振とうしながら、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした。その後さらに 2.1% ディスパーゼ 2 mL を、ろ過フィルターを通して加え、20 分間インキュベートした。これに、5% FBS の入った M199 培地を適量入れ、600 $\times\text{g}$ にて 10 分間遠心し、上澄みを取り除いた後、M199 培地 25 mL に懸濁させ 100 μm のナイロンメッシュでろ過した。得られたろ液を 600 $\times\text{g}$ にて 10 分間遠心した。一方、Percoll : 1.5 mol/L NaCl : M199 (9 : 1 : 10 v/v) 7 mL の遠心管を 6 本準備し 26,000 $\times\text{g}$ で 60 分間遠心し、密度勾配を作製した。再懸濁した溶液各 2 mL を密度勾配上に重層し、600 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心後、3 層となり、おもに血管内皮細胞からなる密度 1.44 付近の中央層を、滅菌の注射針を用いて採取した。これを 5% FBS M199 培地 25 mL にて再懸濁し、600 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心した。上清を吸引除去し、ペレットを 30 mL の LMECs culture medium で再懸濁し、コラーゲンコートしたフラスコ (岩城硝子) にまき、5% CO_2 -95% 空気の条件下で培養した。培養 3 時間後に LMECs culture medium を交換した。2 日後からは、2~3 日ごとに LMECs culture medium を交換した。初代培養は、7~9 日でコンフルエントになった。

1-4 培養マウス LMECs の継代培養と保存

培養中のフラスコから培地を除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)緩衝液 10 mL/75 cm^2 で洗い、PBS 緩衝液を除去した。Accutase™ (nacalai tesque) 液 10 mL/75 cm^2 で細胞を覆い、37 $^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターに入れ、10 分間処理を行っ

た。顕微鏡で細胞が丸くなってはがれ始めたことを確認してから、よくピペッティングし、フラスコを軽くたたき細胞を培養表面から剥がした。細胞が剥離したのを確認し、回収した。残っている細胞を回収するため PBS 緩衝液 10 mL/75 cm² で洗浄し遠心チューブに入れた。800 ×g で 5 分間遠心した。セルリザーバーワン (DMSO 含有) (nacalai tesque) で細胞を再浮遊させ細胞数を血球計算盤でカウントした。1×10⁵ 個/mL になるように希釈し、液体窒素に保存した。

1-5 経内皮電気抵抗および細胞間隙透過クリアランス

培養マウス LMECs を 12 mm Transwell (0.4 μm Pore Polyester Membrane、1.12 cm² Costar、Cambridge、USA) に 5 μg/cm² collagen typeIV(sigma)、1 μg/cm² fibronectin (sigma) でコート処理した透過性のポリカーボネート膜上に 1.0×10⁵ cells/cm² になるように播種し、37°C 5% CO² インキュベーターで培養した。経内皮電気抵抗値は、Millicell ESR (Millipore) を用い、経日的にドナー側とレシーバー側に電極を指し、メンブレン上に単層培養されたマウス LMECs の電気抵抗 Ω×cm² を測定した。

トランスポート buffer (122 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl、25mmol/L NaHCO₃、1.2 mmol/L MgSO₄、0.4 mmol/L KHPO₄、1.4 mmol/L CaCl₂、10 mmol/L D-glucose、10 mmol/L HEPES) を Transwell のレシーバー側に 1.5 mL 入れ、ドナー側には水溶性マーカー細胞間隙のみを通過する物質である 250 ng/mL フルオレセインを含むトランスポート buffer 0.5 mL を入れた。インキュベート 0、15、30、45、60 分後ドナー側から 10 μL、レシーブ側から 30 μL、採取後、トランスポート buffer を採取量と同量ドナー側およびレシーブ側に加えた。分光蛍光光度計でフルオレセイン (Ex : 485 nm、Em : 535 nm) を測定し、細胞間隙透過クリアランス CL (μL/min/cm²) を算出した。

1-6 ウェスタンブロット

培養マウス LMECs を播種し培養 6 日後に、冷 PBS で洗浄後、PIPA buffer (Nacalai tesque) で、氷上 15 分インキュベートし、4 °C 10,000 ×g 20 分遠心サンプルを作製した。タンパク質濃度は、BCA protein assay (Thermo Scientific)で決定した。10 % SDS-PAGE にタンパク質 10 μg を電気泳動し、Immobilon-P transfer membrane (Millipore) に転写した。メンブレンは、Blocking One (Nacalai tesque)でブロッキングした。Occludin (Rabbit polyclonal IgG、Abcam) 1/1000、Claudin-1、Claudin-4 (Rabbit polyclonal IgG、Abcam) 1/1000、ZO-1 (Rabbit polyclonal IgG、Abcam) 1/1500 をシグナル増強剤 HIKARI(Nacalai tesque)の A 液で希釈し、一次抗体とした。二次抗体は HRP-conjugated anti-rabbit antibody (GE Healthcare) をシグナル増強剤 HIKARI B 液で 1/20000 に希釈し、検出は ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を使用した。

1-7 リアルタイム RT-PCR

培養マウス LMECs を 96 well に播種し培養数日後、注意深く培地を吸引し、冷 100 μL PBS で細胞を洗浄した。Real Time Ready Cell Lysis Kit (Roche Applied Science) の 40 μL Cell Lysis Reagent を添加し、室温で 5 分間インキュベートし、細胞ライセートを作製した。2 μL の細胞ライセートと Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Applied Science) の 18 μL 逆転写調製液で逆転写を行い 20 μL の cDNA を作製した。リアルタイム PCR は、FastStart Universal Probe Master(Rox) (Roche Applied Science) を使用し、Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で Ct 値を測定した。Occludin、Claudin-1、-4、ZO-1 のプライマーおよびプローブは、online Universal ProbeLibrary System によりデザインした。mRNA レベルは、housekeeping gene beta actin を使用し、得られた Ct 値を $\Delta \Delta Ct$ 法により相対値を算出した。

1-8 統計処理

実験結果は平均値と標準誤差で示した。統計学的有意差は分散分析処理後 Student't-test により行い、 $p < 0.05$ を有意差として示した。

第二章 関連実験

2-1 実験動物

3 週齢の Wistar 系雄性ラット (日本エスエルシー) を用いた。日内変動を考慮して温度 23 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、照度サイクル 12 時間 (CE-2、日本クレア) と水を自由に摂取されて飼育した。

2-2 試薬

M199 培地、D-MEM/F-12 培地、ペニシリンーストレプトマイシン、ヘパリン、HEPES、HBSS、ディスパーゼ、EGF、Trypsin-EDTA、Trypsin-inhibitor-soybean、ウシ胎児血清 ; FBS、ウマ血清 ; HS、重炭酸ナトリウムは GIBCO から購入し、塩化コリン、2,4-ジニトロフェノールは和光純薬から購入し使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

細胞培養液

前章 1-2 参照

2-3 培養ラット肺微小血管内皮細胞(LMECs)の単離および培養法

ラット 20 匹の断頭後全肺を摘出し、肺葉の外側部を削ぎ落とした。取り出した肺塊を、剃刀 2 枚を合わせるように用いて肺を細切した。細切した肺を M199 培

地 25 mL で洗浄し、40 μ m のナイロンメッシュでろ過した。その後、600 \times g にて 10 分間遠心し、上澄みを取り除いた後、0.6 % コラゲナーゼ液 25 mL 調製し、細切した肺を入れ、激しく振とうしながら、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その後さらに 2.1 % ディスパーゼ 0.8 mL を、ろ過フィルターを通して加え、30 分間インキュベートした。これに、5 % FBS の入った M199 培地を適量入れ、600 \times g にて 10 分間遠心し、上澄みを取り除いた後、M199 培地 25 mL に懸濁させ 40 μ m のナイロンメッシュでろ過した。得られたろ液を 600 \times g にて 10 分間遠心した。一方、Percoll : 1.5 mol/L NaCl : F199 (9 : 1 : 10 v/v) 7 mL の遠心管を 6 本準備し、26,000 \times g で 60 分間遠心し、密度勾配を作製した。再懸濁した溶液各 2 mL を密度勾配上に重層し、600 \times g で 10 分間遠心後、3 層となり、おもに血管内皮細胞からなる密度 1.44 付近の中央層を、滅菌の注射針を用いて採取した。これを 5 % FBS-M199 培地 10 mL にて再懸濁し、600 \times g で 10 分間遠心した。上清を吸引除去し、ペレットを LMECs culture medium で再懸濁し、細胞数を血球計算盤でカウントした。5 \times 10⁵ 個/cm² になるように希釈し、コラーゲンコートしたフラスコ (岩城硝子) にまき、5 % CO₂ - 95 % 空気の条件下で培養した。培養 5 時間後、LMECs culture medium を交換した。2 日後からは、2~3 日ごとに LMECs culture medium を交換した。初代培養は、7~9 日でコンフルエントになった。

2-4 培養ラット LMECs の継代培養

培養中のフラスコから培地を除去し、細胞を HEPES 緩衝液 (Gibco) 9 mL/75 cm² で洗浄し、HEPES を除去した。その後、細胞をトリプシン・EDTA 液 9 mL/75 cm² で細胞を覆い、37 $^{\circ}$ C のインキュベーターに入れ、5 分間トリプシン処理を行った。顕微鏡で細胞が丸くなってはがれ始めたことを確認してから、よくピペッティングし、フラスコを軽くたたき細胞を培養表面から剥がした。細胞が剥離したのを確認し、トリプシン中和液 9 mL/75 cm² で中和した。残っている細胞を回収するた

め HEPES 9 mL/75 cm² で洗い遠心チューブに入れた。1000 rpm で 5 分間遠心した。培養液を加え細胞を再浮遊させ細胞数を血球計算盤でカウントした。1×10⁵ 個/cm² になるように希釈し、継代培養した。

2-5 培養ラット LMECs への L-ヒスチジン取り込み

フラスコから培養液を吸引除去後、5 mL の krebs buffer pH 7.4 (118 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、25 mmol/L NaHCO₃、2.5 mmol/L CaCl₂×2H₂O、1.2 mmol/L KH₂PO₄、1.2 mmol/L MgSO₄、11.1 mmol/L glucose) で 2 回洗浄した。あらかじめ 37 °C に温めた 0.01~3.0 mmol/L の L-ヒスチジンと 0.1 mmol/L ZnSO₄ を含有する krebs buffer 2 mL を添加し、37 °C で各時間インキュベートした。その後、基質溶液をアスピレーターに接続したパスツールピペットですばやく吸引除去し、氷冷した krebs buffer 2 mL で 3 回洗浄した。1 mL の氷冷した krebs buffer を添加し、細胞をセルスクレーパー (Nunc) でかきとった。さらにフラスコを 2 mL の氷冷した krebs buffer で洗浄し、先のサンプルとあわせた。1000 rpm、10 min で遠心し、上清を吸引除去した。細胞に 150 μL の 0.4 mol/L 過塩素酸で徐タンパクし、ソニケーター (Sonifier-450, BRANSON, USA) 5 sec、3 回で細胞を破壊し、薬物およびタンパク定量用 (0.1 mol/L NaOH 0.2 mL に溶解) のサンプルとした。サンプル中ヒスチジン濃度は、L-8500 形日立高速アミノ酸分析計を用いて定量した。固定相にはイオン交換樹脂カラム (日立カスタムイオン交換樹脂カラム #2622SC, 4.6 mm I.D.×60 mm) を使用した。移動相には、L-8500 形日立高速アミノ酸分析計用緩衝液キット L-8500-PH-KIT (三菱化成) を用いて 0.4 mL/min の流速でグラジェントを施し、ニンヒドリン試薬 L-8500 セット (和光純薬) 流速 0.35 mL/min と反応 (57 °C) させた後、波長 570 nm における吸光度を測定した。肺微小血管内皮細胞内 HDC 活性は、Watanabe(54)らの方法に準拠して測定した。細胞中のタンパク質量は血清アルブミンを標準として Lowry 法(55)により求めた。

2-6 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対する代謝阻害剤および Na イオンの影響

培養ラット LMECs に 2,4-ジニトロフェノール (250 $\mu\text{mol/L}$) を加え、あらかじめ 37°C で 15 分間プレインキュベートすることによりその影響を調べた。一方、 Na^+ の影響については、krebs buffer の NaCl (60 mmol/L) を塩化コリンに置換した buffer を Na^+ free 溶液として検討を行った。

2-7 亜鉛添加による L-ヒスチジン取り込みに対するアミノ酸輸送系阻害剤の影響

阻害剤には、それ自身が亜鉛と相互作用を示さないものを選択しなければならない。使用したアミノ酸は system-N の基質として、L-グルタミン酸 γ ヒドロキサメート、system-L の基質として BCH の各取り込みを硫酸亜鉛、添加時と非添加時で測定した。その結果亜鉛による影響が認められないことから阻害剤として使用した。

硫酸亜鉛の添加時と非添加時で、上記のアミノ酸各 5 mmol/L と L-ヒスチジン 0.1 mmol/L 共存させたものを細胞に添加し阻害効果を行った。

2-8 統計処理

実験結果は平均値と標準誤差で示した。統計学的有意差は分散分析処理後 Student't-test により行い、 $p < 0.05$ を有意差として示した。

第三章 関連実験

3-1 実験動物

前章 2-1 参照

3-2 試薬類

d-クロルフェニラミン *N*-酸化体は Craig and Purushothamam の合成法(56)により合成し、HPLC により分離した。*d*-クロルフェニラミンマレイン酸塩、glucose 6-phosphate dehydrogenase、NADP、glucose 6-phosphate は和光純薬から購入した。硫酸ゲンタマイシン、アンホテリシン B は Sigma-Aldrich から購入し、D-MEM/F-12、heparin、HEPES、デイスパーゼ、epidermal growth factor (EGF)、FBS、HS は、Gibco から購入し、Dextren T-70、パーコールは Pharmacia から購入し、コラゲナーゼ/デイスパーゼは、Boehringer Mannheim から購入し、SD rat normal hepatocytes (rtNHeps) は、タカラバイオ株式会社から購入したものを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

細胞培養液

BMECs culture medium は、D-MEM/F-12 に 20 mmol/L HEPES、25 mmol/L NaHCO₃、50 mg/L ゲンタマイシン硫酸塩、2.5mg/L アンホテリシン B、20 kU/L ヘパリン、3 μg/L 亜セレン酸、10 μg/L EGF、1 mg/L ヒドロコルチゾン、0.5 mL BPE これに 5% FBS、HS をそれぞれ加え 0.2 μm のフィルターを用いてろ過を行い、無菌に回収した。

3-3 培養ラット脳微小血管内皮細胞(BMECs)の単離および培養法

ラット 20 匹を断頭後、全脳を摘出し、脳幹、小脳、硬膜および脳表の血管を取り除き M199 培地にて洗浄した。取り出した脳塊を、剃刀 2 枚を合わせるように用いて、脳を細切し、その後 M199 培地を加え 1000 ×g にて 10 分間遠心し上澄みを取り除いた。細切した脳は 0.2% デイスパーゼを含む M199 溶液を加え、37°C、

2時間酵素処理した。酵素処理後、再び1000×gで10分間遠心洗浄し、上澄みを取り除いた後、13%デキストランを含むM199溶液を加え5800×gで10分間遠心し、この操作を二度繰り返した。これによって得られた沈査をM199培地で懸濁させ、孔径300μmのナイロンメッシュでろ過した後、600×g、10分間の遠心によって得られた沈査を微小血管とした。この微小血管を、さらに1mg/mLコラゲナーゼ/ディスパーゼを含むM199培地溶液に浮遊させ、37°C、1時間酵素処理を行った。酵素処理後、5%FBSを含むM199培地溶液で洗浄し、コラゲナーゼ/ディスパーゼを除いた。得られた沈査をM199培地に懸濁させ、50%パーコール(Percoll-1.5 mol/L NaCl-M199 = 9 : 1 : 10 v/v% のものを26,000×gで60分間遠心をかけて、予め密度勾配を作製しておく。)に重層し600×g、10分間遠心した。パーコールによって3層に分離した細胞層が得られるが、おもに数個の内皮細胞からなる上層約1/3の中央層を、注射針を用いて採取し、これを5%FBSを含むM199培地溶液にて洗浄し、600×g、10分間遠心した。上清を吸引除去し、組織培養液BMECs culture mediumに加え細胞を再浮遊させ、コラーゲンコートしたフラスコ(岩城硝子)にまき、5%CO₂-95%空気の条件下で初代培養を行った。培養後1日目にBMECs culture mediumを交換した。3日後からは、2~3日ごとにBMECs culture mediumで交換した。初代培養ラットBMECsは12~15日でコンフルエントとなった。

3-4 培養ラットBMECsの継代培養

培養中のフラスコから培地を除去し、細胞をハンクス平衡塩緩衝液(HBSS, Gibco)で洗浄し、HBSSを除去した。その後細胞を0.5%トリプシン・EDTA液で覆い37°C、5分間トリプシン処理を行った。酵素処理後フラスコを軽くたたいた後よくピペッティングすることで細胞を培養表面から剥がした。細胞剥離を確認後、トリプシン阻害液を(Gibco)で中和し、残っている細胞を回収するため5%

FBS 加 M199 培地を加え洗淨した。遠心後、上清を吸引除去し、細胞に組織培養液を加え、再浮遊させ継代培養した。

3-5 ウェスタンブロット解析

培養ラット BMECs を冷 PBS(-)で洗淨後、PIPA buffer (Nacalai tesque)で、氷上 15 分インキュベートし、4°C 10,000 ×g 20 分遠心サンプルを作製した。タンパク質濃度は、BCA protein assay (Thermo Scientific)で決定した。10 % SDS-PAGE にタンパク質 10.0 μg を電気泳動し、Immobilon-P transfer membrane (Millipore) に転写した。メンブレンは、Blocking One(Nacalai tesque)でブロッキングした。一次抗体 FMO1 (Rabbit polyclonal IgG、Santa Cruz) 1/1500、FMO2 (Rabbit polyclonal IgG、Protein Tech Group) 1/1000、FMO3 (Goat polyclonal IgG、Santa Cruz) 1/1000、FMO4 (Rabbit polyclonal IgG、Protein Tech Group) 1/1000、FMO5 (Rabbit polyclonal IgG、Protein Tech Group) 1/1000 を使用した。二次抗体は HRP-conjugated anti-rabbit antibody (GE Healthcare) を 1/20000 に希釈、検出は ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を使用した。

3-6 培養ラット BMECs ホモジネートの調製

フラスコ中の細胞を 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)で 3 回洗淨し、適量の PBS を添加して細胞をセルスクレーパーでかき取り、ホモジナイズした。*d*-クロルフェニラミンの代謝実験にはタンパク質濃度を 0.25 mg protein/mL に調製したものを使用した。なお、培養ラット BMECs のタンパク質濃度はウシ血清アルブミンを標準物質として Lowry 法(55)により測定した。

3-7 *d*-クロルフェニラミンの代謝

反応液は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート

(NADPH) 再生系 (0.5 mmol/L NADP、6.7 mmol/L グルコース - 6-リン酸、グルコース - 6-リン酸脱水素酵素 0.7 Unit/mL)、17 mmol/L 塩化マグネシウム、2.5 mmol/L ニコチンアミド、培養ラット BMECs ホモジネート、PBS および基質として *d*-クロルフェニラミン各濃度を含み全量が 3 mL となるように調製した。上記反応系に *d*-クロルフェニラミン溶液を添加することにより酵素反応を開始し、好氣的条件下、37 °C にて 2 分間インキュベートした。反応停止には 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した。

3-8 HPLC による代謝物の定量

5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液添加後、塩化ナトリウム 2 g、酢酸エチル 7 mL を加えて 15 分間振とうし、800 ×g で 10 分間遠心分離を行い、有機溶媒層を 5 mL 分取した。得られた有機溶媒層を減圧乾固し、残渣をメタノール 200 μL で溶解したものを HPLC 分析試料とした。*d*-クロルフェニラミンおよびその代謝物の HPLC による定量分析条件は Masubuchi ら(57)の方法を一部改変して行った。HPLC は Shimazu LC-6A に UV 検出器 (Shimazu SPD-10A VP) 接続し使用した。カラムは LiChrospher Si 60 (250-4.6 mm、5 μm、関東化学) を用い、移動相としてアセトニトリル - メタノール - 28 %アンモニア水 (73 : 25 : 2 v/v) を流速 1.0 mL/min、カラム温度を 30 °C に設定し、上記試料を 50 μL 注入した。クロマトグラム上のピークはデータ解析処理装置 (D-2500、日立製作所) により得られた面積より算出し、定量した。

3-9 *d*-クロルフェニラミンの代謝に対する pH の影響

pH 7.4 および pH 8.4 の 0.1 mol/L リン酸緩衝液を用いて培養ラット BMECs のホモジナイズを行った。*d*-クロルフェニラミンは、それぞれ pH 7.4 および pH 8.4 の 0.1 mol/L リン酸緩衝液で最終濃度が 0.08 から 1.04 mmol/L になるように希釈した

ものを使用した。前述 3-7 の代謝を行った。

3-10 *d*-クロルフェニラミン代謝に対するメチマゾールの阻害効果

反応液中に最終濃度がメチマゾール 10^{-8} - 10^{-3} mol/L になるように添加した。前述 3-7 の代謝を行った。

3-11 *d*-クロルフェニラミン代謝に対するメチマゾールの阻害様式

反応液中に最終濃度が 1 μ mol/L メチマゾールになるように添加した。*d*-クロルフェニラミンは 0.08 から 1.04 mmol/L の濃度で、前述 3-7 の代謝を行った。

3-12 培養ラット BMECs およびラット肝細胞内 FMO の活性比較

培養ラット BMECs およびラット肝細胞は 0.1 mol/L のリン酸緩衝液(pH 7.4)でそれぞれホモジナイズした。0.16 mmol/L *d*-クロルフェニラミンを用い、前述 3-7 の代謝を行った。

3-13 統計処理

実験結果は平均値と標準誤差で示した。統計学的有意差は分散分析処理後 Student't-test により行い、 $p < 0.05$ を有意差として示した。

第四章 関連実験

4-1 実験動物

前章 2-1 参照

4-2 試薬類

イミプラミン *N*-酸化体はノバルティス・ファーマ社より供与を受けた。阻害試験用抗ラット CYP1A1 抗体、阻害試験用抗 CYP2B1 抗体、阻害実験用抗 CYP2C11 抗体、阻害試験用抗 CYP3A2 抗体は、第一化学薬品から、FITC 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体は Jackson Immuno Research 社から購入したものを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

細胞培養液

D-MEM/F-12 に 15 mmol/L NaHCO₃、ヘパリンナトリウム (20 U/mL)、アンホテリシン B (2.5 µg/mL)、硫酸ゲンタマイシン (30 µg/mL)、17 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、EGF (10 ng/mL)、5 % FBS、5 % HS を加え 0.22 µm のフィルターを用いてろ過を行い無菌的に回収したものを D-MEM/F-12 組織培養液とした。

HBSS に 4 mmol/L NaHCO₃、アンホテリシン B (2.5 µg/mL)、硫酸ゲンタマイシン (30 µg/mL) を加え 0.22 µm のフィルターを用いてろ過を行い無菌的に回収したものを HBSS 緩衝液とした。

4-3 ラット胸部大動脈内皮細胞 (TAECs) の単離および培養法

ラット胸部大動脈内皮細胞の単離および培養は Junod ら(58)の方法を一部改変して行った。ラット 20 匹を断頭後胸部を開き全肺を除去した。大動脈を露出し付着する脂肪分を剥がし取り、血管上流側および下流側に切り込みを入れ、内径 0.5 mm-外径 1.0 mm の医療用チューブ (カネカメディクス) を数 mm 挿入後、縫合糸にて血管とチューブからリングル液 (扶桑薬品工業) を流し血管内を洗浄した後、血管内のリングル液を 0.07 % コラゲナーゼおよび 0.19 % ディスパーゼを添加した M199 培地で置換した。その後、チューブの両端をクレンメで閉じ、大動脈を 37 °C の M199 培地中で 30 分間酵素処理した。酵素処理後、血管内の酵素液を M199 培地で洗い出し、遠心管に回収した。なお、この酵素処理は 2 回行った。回

収した酵素液を孔径 100 μm のナイロンメッシュでろ過した後 600 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心分離し、得られた沈査を 5 % FBS 含有 M199 培地で懸濁し、再び 600 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心分離した。上清を吸引除去し D-MEM/F-12 組織培養液を加え細胞を再懸濁させ、コラーゲンコート (タイプ I) した 75 cm^2 フラスコ (岩城硝子) にまき、5 % CO_2 -95 % 空気の条件下で初代培養を行った。培養液は 2~3 日ごとに交換し、初代培養ラット TAECs は 12~14 日でコンフルエントとなった。

4-4 培養ラット TAECs の継代培養

培養中のフラスコから培地を除去し、細胞を HBSS で洗浄した。HBSS を吸引除去後、細胞を 0.05 % Trypsin-EDTA 液で覆い 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間酵素処理を行った。その後、フラスコを軽くたたき、よくピペッティングすることで接着面から細胞を剥がし、細胞剥離を確認後 0.05 % Trypsin-Inhibitor-soybean 液で中和し遠心管に回収した。フラスコ内に残っている細胞を回収するため、5 % FBS 含有 M199 培地を加え洗浄した。600 $\times\text{g}$ で 10 分間遠心分離した後上清を吸引除去し、D-MEM/F-12 組織培養液を加え細胞を再懸濁させ継代培養した。

4-5 培養ラット TAECs ホモジネートの調製

フラスコ中の細胞を 0.1 mol/L リン酸緩衝液で 3 回洗浄し、適量のリン酸緩衝液を添加して細胞をセルスクレーパーでかき取り、ホモジナイズした。イミプラミンの代謝実験にはタンパク質濃度を 0.35 mg protein/mL に調製したものを使用した。なお、培養ラット TAECs のタンパク質濃度はウシ血清アルブミンを標準物質として Lowry 法(54)により測定した。

4-6 イミプラミンの代謝

反応液は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート

(NADPH) 再生系 (0.5 mmol/L NADP、6.7 mmol/L グルコース - 6-リン酸、グルコース - 6-リン酸脱水素酵素 0.7 Unit/mL)、17 mmol/L 塩化マグネシウム、2.5 mmol/L ニコチンアミド、培養ラット TAEC ホモジネート (1.5 mL)、PBS および基質としてイミプラミン各濃度を含み全量が 3 mL となるように調製した。上記反応系にイミプラミン溶液を添加することにより酵素反応を開始し、好氣的条件下、37°C にて 0.5~5 分間インキュベートした。反応停止には 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した。

4-7 HPLC による代謝物の定量

5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液添加後、塩化ナトリウム 2 g、酢酸エチル 7 mL を加えて 15 分間振とうし、800 ×g で 10 分間遠心分離を行い、有機溶媒層を 5 mL 分取した。得られた有機溶媒層を減圧乾固し、残渣をメタノール 200 μL で溶解したものを HPLC 分析試料とした。イミプラミンおよびその代謝物の HPLC による定量分析条件は Masubuchi ら(56)の方法を一部改変して行った。HPLC は Shimazu LC-6A に UV 検出器 (Shimazu SPD-10A VP) 接続し使用した。カラムは LiChrospher Si 60 (250-4.6 mm、5 μm、関東化学) を用い、移動相としてアセトニトリル - メタノール - 28%アンモニア水 (73:25:2 v/v) を流速 1.0 mL/min、カラム温度を 30°C に設定し、上記試料を 50 μL 注入した。クロマトグラム上のピークはデータ解析処理装置 (D-2500、日立製作所)により得られた面積より算出し、定量した。

4-8 イミプラミン代謝の速度論的解析

培養ラット TAECs ホモジネートにおけるイミプラミン代謝の K_m 、 V_{max} 値の測定にあたって、前述 4-6 の実験条件により反応時間を 2 分、基質の最終濃度を 5~100 μmol/L に設定した。また、 K_m 、 V_{max} 値は Eadie-Hofstee の式にあてはめて求めた。

4-9 各種 CYP 分子種血清抗体を用いた酵素反応阻害実験

培養ラット TAECs ホモジネートに各抗 CYP 血清 10 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間プレインキュベートすることにより検討した。また、対照には試薬添付の正常ヤギ血清、または正常ウサギ血清を用い、前述 4-6 同様の操作を行った。

4-10 培養ラット TAECs における CYP2C11 および CYP3A2 の細胞内局在

一次抗体はヤギ抗ラット CYP2C11 抗体およびウサギ抗ラット CYP3A2 抗体を、二次抗体には、FITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体および FITC 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ用いた。形態は、位相差顕微鏡 (IM、オリンパス光学工業) で観察した。

4-11 イミプラミン代謝に対する pH の影響

pH 7.4 および pH 8.4 の 0.1 mol/L リン酸緩衝液を用いて培養ラット TAECs ホモジネートを用いて前述 4-6 の代謝を行った。

4-12 イミプラミン代謝に対するメチマゾールの影響

前述 4-6 参照

なお、反応液中に最終濃度が 1 μ mol/L となるようにメチマゾールを添加した。反応条件は、37 $^{\circ}$ C、2 分、pH 7.4 に設定した。

4-13 統計処理

実験結果は平均値と標準誤差で示した。統計学的有意差は分散分析処理後 Student't-test により行い、 $p < 0.05$ を有意差として示した。

引用文献

1. J. Yamakami, E. Sakurai, A. Kuramasu, E. Sakurai, K. Yanai, T. Watanabe and Y. Tanaka, (2000) *Inflamm. res.*, 49: 231-235
2. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. and Tsukita S., (1998) *J. Cell. Biol.*, 141: 1539-1550.
3. Furuse M., Sasaki H. and Tsukita S., (1998) *J. Cell Biol.*, 143: 391-401.
4. Tamura A., Tsukita S., (2014) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 36: 177 -185.
5. Watari A., Hasegawa M., Yagi K, Kondoh M., (2016) *PLoS. One*, 11(1), e0145631.
6. Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T., Yagi K., (2010) *Biochem. Pharmacol.*, 79(10): 1437-1444.
7. Kuwabara H., Kokai Y., Kojima T., Takakuwa R., Mori M. and Sawada N., (2001) *Cell Structure and Function*, 26: 109-116.
8. Krause D., Mischeck U., Galla H.J. and Dermietzel R., (1991) *Neuroscience Letters*, 128: 310-304.
9. Nakagawa S., Deli M.A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoke, R., Kataoka Y. and Niwa M., (2007) *Cellular Molecular Neurobiology*, 27: 687-694.
10. Colegio O.R., Van Itallie C.M., McCrea H.J., Rahner C. and Anderson J.M., (2002) *American Journal of Physiology*, 283: C142-C147.
11. Van Itallie C., Rahner C. and Anderson J.M., (2001) *Journal of Clinical Investigation*, 107: 1319-1327.
12. Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M. and

- Tsukita S., (2003) *Journal of Cell Biology*, 161: 653-660.
13. Dovat Sinisa, Kirk A. Gilbert, Lidija Petrovic-Dovert, D. Eugene Rannels., (1998) *Am. J. Physiol.*, 275: L30-L37,
 14. Bert L. Vallee, David S. Auld., (1990) *Biochemistry*, 29: 5647-5659.
 15. Andrew T. Gray, Dmitri J. Leonoudakis, C. Spencer Yost., (1997) *Molecular Brain Research.*, 52: 157-161.
 16. Robert J. Vandenberg, ann D. Mitrovic, Graham A. R. Johnston., (1998) *Molecular Pharmacology*, 54: 189-196.
 17. Reyes Juan G., (1996) *Am. J. Physiol.*, 270: C401-C410.
 18. S. Buxani-Rice, F. Ueda, M. W. B. Bradbury., (1994) *J. Neurochem.*, 62: 665-672.
 19. Robert D. Raffanillo and Raul A. Wapnir., *P. S. E. B. M.*, (1989) 192: 219-224.
 20. Dennis J. Bobilya, Mary Briske-Anderson, Philip G. Reeves. *P. S. E. B. M.*, (1993) 202: 159-166.
 21. Ghersi-Egea JF, Minn A, Siest G, (1988) *Life Sci.* 42(24): 2515-2523.
 22. Rettie AE., Meier GP. and Sadeque AJM., (1995) *Chem. Biol. Interact.* 96: 3-15.
 23. Dolphin CT., Cullingford TE., Shephard EA., Smith RL. and Phillips IR., (1996) *Eur. J. Biochem.*, 235: 683–689.
 24. Koukouritaki S.B, Simpson P., Yeung CK, Rettie AE. and Hines RN., (2002) *Pediatr. Res.*, 51: 236–243.
 25. Cherrington NJ., Cao Y, Cherrington JW., Rose RL. and Hodgson E., (1998) *Xenobiotica.*, 28:673–682.
 26. Dannan GA., Guengerich FP. and Waxman DJ, (1986) *J. Biol. Chem.*, 261: 10728–10735.
 27. Lemoine A., Williams DE., Cresteil T. and Leroux JP., (1991) *Mol. Pharmacol.*,

- 40: 211-217.
28. Falls JG., Ryu DY., Cao Y., Levi PE. and Hodgson E., (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, 342: 212-223.
 29. Coecke S., Debast G., Phillips IR., Vercruysse A., Shephard EA. and Rogiers V., (1998) *Biochem. Pharmacol.* 56: 1047–1051.
 30. Dixit A. and Roche TE., (1984) *Arch. Biochem. Biophys.*, 233: 50-63.
 31. Esposito T., Varriale B., D'Angelo R., Amato A. and Sidoti A., (2014) *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, 20: 99-109.
 32. Haining RL., Hunter AP., Sadeque AJM., Philpot RM. and Rettie AE., (1997) *Drug Metab. Dispos.*, 25: 790-797.
 33. Novick RM., Mitzey AM., Brownfield MS. and Elfarra AA., (2009) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 329: 1148-1155.
 34. Krueger SK. and Williams DE., (2005) *Pharmacol. Ther.*, 106: 357-387.
 35. Dolphin CT., Beckett DJ., Janmohamed A., Cullingford TE., Smith RL., Shephard EA. and Phillips IR., (1998) *J. Biol. Chem.*, 273: 30599-30607.
 36. Janmohamed A., Hernandez D., Phillips IR. and Shephard EA., (2004) *Biochem. Pharmacol.*, 68: 73-83.
 37. Cashman JR. and Zhang J., (2006) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46: 65-100.
 38. Zhang J., Cerny MA., Lawson M., Mosadeghi R. and Cashman JR., (2007) *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 21: 206-215.
 39. Ziegler DM., (1993) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33: 179-199.
 40. Shubhada B., Shripad V. B., Susarla K.S., Michel R. B., Vijayalakshmi R., (1995) *Brain Res.*, 672: 276-280.
 41. Boyu L., Yuhe Y., Wanqing Z., Wenbin H., Jinfeng H., Naihong C., (2014) *Neuroscience Letters*, 566: 11-16.

42. Mushiroda T., Ariyoshi N., Yokoi T., Takahara E., Nagata O., Kato H., Kamataki T., *Chem Res Toxicol.* (2001) 14(2): 228-32.
43. Ziegler DM., (1988) *Drug Metab. Rev.*, 19(1): 1-32.
44. Siddens L, K.Henderson MC., Vandyke JE., Williams DE. and Krueger SK. (2008) *Biochem. Pharmacol.*, 75: 570-579
45. Cashman JR., Celestial JR., Leach AR., (1992) *Xenobiotica.*, 22(4): 459-69.
46. Farin FM., Pohlman TH., Omiecinski CJ., (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 124(1): 1-9.
47. Thum T., Borlak J., (2000) *Lancet.* 355: 979-983.
48. Stegemann JJ., Hahn ME., Weisbrod R., Woodin BR., Joy JS., Najibi S., Cohen RA., (1995) *Mol. Pharmacol.*, 47(2): 296-306.
49. Borlak J., Walles M., Levsen K., Thum T., (2003) *Drug Metab. Dispos.*, 31:888-891.
50. 児玉龍彦、高橋潔、渋谷正史、‘血管生物学’、講談社(1997)
51. Sakurai E., Ueda Y., Mori Y., Shinmyouzu Y., Sakurai E., (2013) *Pharmacol. Pharm.* 4: 1-6.
52. Ochiai Y., Sakurai E., Nomura A., Itoh K., Tanaka Y., (2006) *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 403-407.
53. Stevens JC., Melton RJ., Zaya MJ., Engel LC.,(2003) *Mol. Pharmacol.*, 63(2): 271-5.
54. Watanabe T., nakamura H., Leu Y.L., Yamatodani A., Wada H. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1149-1979.
55. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R., (1951) *J.Biol. Chem.* 193: 265.
56. J. C. Craig and K. K. Purushothaman, (1970) *Journal of Orgnic Chemistry*, Vol.

35, No. 5: pp. 1721-1722.

57. Masubuchi Y., Igarashi S., Suzuki T., Horie T., Narimatsu S., (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279: 724.
58. Junod A.F., Ody C., (1977) *Am. J. Physiol.*, 232: C88.

本論文の内容は以下の雑誌に発表済み

発表論文

第一章 **Ueda Y.**, Shinmyouzu Y., Nakayama H., Tanino T., Sakurai E., Sakurai E.

Claudin-1 Leads to Strong Formation of Tight Junction in Cultured Mouse Lung
Microvascular Endothelial Cells.

Pharmacol. Pharm. 7, 133-139 (2016)

第二章 Sakurai E., Sakurai E., **Ueda Y.**, Yagi Y.,

Enhancing Effect of Zinc on L -Histidine Transport in Rat Lung Microvascular
Endothelial Cells.

Biol. Trace Elem. Res. 142, 713–722 (2011)

第三章 Sakurai E., **Ueda Y.**, Mori Y., Shinmyouzu Y., Sakurai E.

Flavin-Containing Monooxygenase (FMO) Protein Expression and Activity in Rat
Brain Microvascular Endothelial Cells.

Pharmacol. Pharm. 4, 1-6 (2013)

第四章 **Ueda Y.**, Yaginuma T., Sakurai E., Sakurai E.

N-Demethylation and N-Oxidation of Imipramine in Rat Thoracic Aortic
Endothelial Cells.

In Vitro Cell. Dev. Biol. –Animal 50, 496-501 (2014)

謝辞

本研究にあたり、始終多大な御指導と御鞭撻を賜りました恩師櫻井栄一教授に衷心より感謝致します。

また、本論文の御校閲を賜りました永浜政博教授、京谷庄二郎教授、井上正久教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 石田竜弘教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、有益なる御助言と御指示を賜りましたいわき明星大学薬学部 櫻井映子教授に深謝すると共に本研究に御協力頂きました谷野公俊准教授、並びに薬剤学教室の皆様に厚く感謝致します。

最後に、公私に御助言、激励を頂きました本学薬学部の職員の皆様、そして今まで支えてくれた家族に感謝致します。

平成三十年