薬物の組織への効率的なデリバリー戦略構築を目指した血管内皮細胞の新たな機能探索と解明

櫻井 栄一

Elucidation of New Function in Endothelial Cells for Efficient Delivery Strategy of Drug to Tissues

Eiichi Sakurai

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University;
180 Nishihama-Boji, Yamashiro-cho, Tokushima 770-8514, Japan.

(Received July 7, 2019)

The author has described two new functions of endothelial cells for efficient delivery of drugs to tissues. First, it was indicated that tight junction (TJ)-associated protein, claudin-1, exerts potent paracellular barrier function in cultured mouse lung microvascular endothelial cells (LMECs). This barrier was instantly and reversibly opened by reduction of TJ proteins expression *via* histamine H₁ and H₂ receptors. Histamine was biosynthesized by L-histidine decarboxylase from uptaken L-histidine, and biotransformed by type B of monoamine oxidase, suggesting that histamine concentration is controlled in rat brain MECs (BMECs) and LMECs. Moreover, uptake of L-histidine into BMECs and LMECs markedly increased with addition of ZnSO₄. Second, it was suggested that drug-metabolizing enzymes such as CYP and flavin-containing monooxygenase exist in vascular endothelial cells exposed to blood and to aerobic conditions. These cells have the same ability to metabolize drugs as hepatocytes, demonstrating that vascular endothelial cells are a metabolic barrier against tissue transfer of drugs. From these results, it was suggested that reversible opening of TJ and selective inhibition of drug metabolism in vascular endothelial cells may be efficient delivery strategies of drugs to tissues. Finally, I hope that this research will lead to development of new drugs and possible re-evaluation of discontinued drugs.

Key words—vascular endothelial cells; tight junction protein; histamine; L-histidine; drug-metabolizing enzyme; drug delivery

1. はじめに

筆者は体内での薬物の動きに魅せられ、東北薬科大学（現 東北医科薬科大学）薬剤学教室（丹羽弘司教授）の門を叩いた。この頃、薬剤学は黎明期から黄金期へ移る時期でもあった。以来、東北薬科大学（講師）に22年、青森大学薬学部（教授）に5年、徳島文理大学薬学部（教授）に10年間在籍し、薬剤学教室を主宰した。

当初与えられたテーマは「病態時における薬物の体内動態の変動について」である。しかし、薬は本来病気のときに飲むものだから、と戸惑いつつも薬理学にも興味があったので、いろいろ考えた末「病態時の生体成分の変動と薬物動態の機能変化」を中心に研究を進め、¹⁻³⁾ 現在まで続けてきた。⁴⁻⁶⁾ その

過程で、組織毛細血管の機能変化、特に血管透過性の亢進が薬物の組織移行を高めることを、下痢をモデルに *in vivo* 及び組織レベルの検討から見出し、タイトジャンクション (tight junction; TJ) の開口が薬物の組織移行の増加につながる可能性を示唆した。さらに、そのターゲット物質がヒスタミンであることを突き止めた。当時、薬物の体内動態とヒスタミンの作用との関係についての研究はそれほど異端にみられたと思う。しかし、ヒスタミン研究の第一人者として世界をリードしていた渡邊建彦先生が大阪大学医学部から東北大学医学部第一薬理学教室に教授として就任されたことから、同じ仙台の地で共同研究をする機会に恵まれ、薬物動態との関係を遺伝子レベルまで飛躍的に研究を発展させることができた。

他方、私の大学院時代には、「薬物の代謝酵素活性を測定する」という目的について、考えられる代謝物の合成を片っ端から行ってきた。そのことが、薬物動態学の研究の1つの流れとしてモレキュ

徳島文理大学薬学部薬剤学教室（〒770-8514 徳島市山城町西浜傍 180）

e-mail: esakuraijp@gmail.com

本総説は、2018年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

ラー・キラリティーへと進み、結果として病態時にキラリ識別が容易に失われる可能性を見出した。⁷⁻⁹⁾ 考えてみれば、総延長が数万 km にもおよぶと言われる血管に存在する内皮細胞は、常に血液と接し好氣的条件下に曝されていることを思えば、ここに薬物代謝酵素が存在することで容易に薬物が代謝され、組織への薬物移行を妨げている可能性が十分予想される。

周知の通り、薬物の組織移行量は、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。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先に述べた組織毛細血管の内皮細胞であり、血液組織関門を構成する。これまで、薬物の組織移行については主に血液組織関門における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、血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明が必要となる。本総説において、その概要を説明したい。

2. TJ の形成とその開口

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 TJ は、細胞間隙経路での物質透過を制御してバリア機能を有している。TJ の構造と機能を担う分子基盤は、Claudin、Occludin 及び 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。¹⁰⁾ Claudin-1 又は 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。¹¹⁾ 現在 Claudin ファミリーは 27 種類のメンバーが存在し、この発現及びバリア機能には組織特異性が認められ、¹²⁾ 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。¹³⁾ 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もあり、¹⁴⁾ TJ 開口に Clau-

Fig. 1. Quantification of Occludin (▲), Claudin-1 (●) and ZO-1 (◆) mRNA levels 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.

din が関与していることが想定できる。

2-1. 肺微小血管内皮細胞における Occludin, Claudin, ZO-1 の遺伝子及びタンパク質の発現

まず本研究で、培養マウス肺微小血管内皮細胞 (lung microvascular endothelial cells; LMECs) の Occludin, Claudin 及び ZO の遺伝子発現及びタンパク質の発現を検討した。二世代培養マウス 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 及び 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 及び 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 (Fig. 1).¹⁵⁾ さらに、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ところ、Occludin, Claudin-1, Claudin-4 及び ZO-1 のタンパク質の発現がそれぞれ認められた。

2-2. 経内皮電気抵抗及び細胞間隙透過クリアランス

肺の毛細血管から単離培養された内皮細胞は、がん化された継代細胞と異なり、毛細血管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、微小血管内皮細胞は初代及び培養二世代ま

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る。そこで、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 (transendothelial electrical resistance; TEER) の測定及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 [Fig. 2 (a)].¹⁵⁾ 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¹⁶⁾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。^{17,18)} 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 [Fig. 2 (b)].¹⁵⁾ 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。Colegio らは、Claudin 発現の変化が経上皮電気抵抗及び透過性に影響があることを明らかにしている。^{19,20)} 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 (blood-brain barrier; BBB) の透過性が亢進し、透過した分子量は 800 Da 以下で分子量に対して選択的であると報告している。²¹⁾ 本実験から得られた遺伝子発現データと考え合わせると、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-1 が大きく関与することが考えられた。¹⁵⁾

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

2.3. 微小血管内皮細胞の TJ 開口物質の探索

1. で述べたように、*in vivo* 及び組織レベルで得られた結果を基に、ヒスタミンを開口物質の 1 つとして細胞及び遺伝子レベルでの研究を進めた。

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ているが、免疫系及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。しかし、一過性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

Fig. 2. (a) The Induction of Transendothelial Electrical Resistance (TEER) in Mouse LMECs, and (b) Transendothelial Permeability (Na-FS clearance) Changes for Paracellular Permeability Marker Na-FS in Mouse LMECs Monolayer

(a) Values of TEER are expressed as the mean $\pm$ S.E. of five experiments. (b) Each value is expressed as the mean $\pm$ S.E. of five experiments.

易くなり、薬物の効率的なデリバリーが可能になると考えられる。そこで筆者は、血中 *in vivo* マイクロダイアリシス法により、ヒスタミンの腹腔内投与後の血中ヒスタミン濃度変化をリアルタイムで測定した。ヒスタミンは 30 分後にはピークに達しその後一過性に消失することがわかった。さらに、ヒスタミン遊離物質である compound 48/80 を同様に腹腔内投与すると一過性の遊離パターンが認められた。²²⁾ ヒスタミンは、一見悪玉物質に捉えられがちであるが、ヒスタミンの血中消失パターンをうまく利用できれば、TJ 開口に対する素晴らしい物質の 1 つになり得ることは容易に推定できる。

そこで、トランスウエルに播種し、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の開口が可逆的であることが明らかになった (Fig. 3)。また、現在投稿中であるが、ヒスタミンの添加によってOccludin, Claudin-4及びZO-1のmRNAレベルが添加後のかなり早い段階で減少していることがわかった。この現象に対して、ヒスタミンH₁受容体拮抗薬であるメピラミン及びH₂受容体拮抗薬であるシメチジンの添加によって透過クリアランスは減少しオリジナルレベルに回復した。このことから、ヒスタミンは膜受容体であるH₁あるいはH₂受容体に結合し、プロテインキナーゼA及びプロテインキナーゼCを活性化させTJタンパク発現を抑制し、TJを開口させることが推測された。

2-4. 微小血管内皮細胞におけるヒスタミンの産生 ヒスタミンはL-ヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase; HDC) によりL-ヒスチジンから生成される。そこで、ラット脳微小血管内皮細胞 (brain microvascular endothelial cells; BMECs) がヒスタミン産生能を持つか確認するため、細胞内HDCの存在について検討した。²³⁾

BMECsにおけるヒスタミン産生酵素であるHDCの活性値は 0.14 ± 0.05 pmol/mg protein/minであり (Table 1)。²³⁾ この活性はHDCの特異的阻害剤である α -フルオロメチルヒスチジンにより阻害された (Fig. 4)。²³⁾ また、ラット好塩基球性白血病細胞と比較するとその発現は少ないものの、BMECsにHDCのmRNAの存在が確認された。さらに、HDC抗体を用い免疫蛍光染色を行ったところ、BMECsにHDCの酵素タンパク質の存在を確認した。

2-5. 微小血管内皮細胞におけるヒスタミンの代謝 ヒスタミンは、N-メチルトランスフェラーゼによりN-tele-メチルヒスタミンに、そしてモノアミン酸化酵素 (monoamine oxygenase; MAO) のBタイプ (type B of MAO; MAO-B) によりさらに代謝を受ける。筆者は、MAOの研究に従事するチャンスを頂き、スウェーデンウプサラ大学バイオメディカルセンターに留学した。この頃はまだ、

Fig. 3. Effect of Histamine on Transendothelial 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.

Table 1. Regulation of Histamine Biosynthesis in Rat BMECs

Histidine (nmol/mg protein)	3.00 ± 0.14
HDC (pmol/mg protein/min)	0.14 ± 0.05
Histamine (pmol/mg protein)	2.18 ± 0.10

Fig. 4. Inactivation of HDC Activity by (S)- α -fluoromethylhistidine (FMH) in Rat BMECs

Samples containing HDC activity were preincubated with various concentrations of FMH for 30 min, then the remaining HDC activity was assayed. * $p < 0.01$, compared with control.

MAOと微小血管内皮細胞内のヒスタミン代謝機能についての発想には至っていなかった。ウプサラ大学医学部のLars Oreland教授の下、当時、「拒食症や過食症における血小板MAO活性とセロトニン取り込み・遊離との関係」²⁴⁾などの論文をまとめた。脳のサンプルを直接取ることなしに、血小板のMAO活性とモノアミン動態から脳疾患のメカニズムを解明するという画期的な研究結果を報告するこ

Fig. 5. Concentration Dependence of L-Histidine Uptake by Cultured Monolayers of Rat LMECs in the Absence (▲) or Presence (●) of ZnSO_4

(a) Michaelis-Menten and (b) Eadie-Hofstee plots. L-Histidine uptake at concentrations between 0.01 and 3 mmol/L was determined at 37°C for 2 min. 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).

とができた。このような経緯を経て、BBBとMAOの関係についての着想に至り、現在まだ予試験の段階ではあるが免疫蛍光染色法により、BBBを構成するラットBMECsにMAO-Bの存在とその酵素活性のあることが明らかになってきている。

2-6. ヒスタミン前駆体であるL-ヒスチジンの微小血管内皮細胞内取り込み メカニズムの詳細は後述するが、筆者は、ラット脳²⁵⁾及び肺²⁶⁾微小血管内皮細胞におけるL-ヒスチジンは Na^+ 依存性共輸送型トランスポーターSystem-N輸送系及び促進拡散型トランスポーターSystem-L輸送系で取り込まれること、組織の違いによる取り込み機構に大きな差は認められないことを明らかにした。

したがって、ヒスタミンは微小血管内皮細胞においてその生成が制御されていると考えられる。そこで、L-ヒスチジンの取り込みの増大、HDC活性の誘導あるいはヒスタミン代謝の抑制によって細胞内のヒスタミン産生を増加させることができれば、効率よいTJ開口につながるのではと考へた。まず、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。

2-7. L-ヒスチジンの微小血管内皮細胞内取り込みを増加させる物質の探索 L-ヒスチジンは機能タンパクの成分としてイミダゾール基を持ち、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様々な役割を演じていることが報告されてい

る。^{27,28)}特に、亜鉛との生理的相互作用についての報告は数多く見受けられる。^{29,30)}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。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言える。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-ヒスチジンが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。^{31,32)}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なんらかの影響をおよぼしている可能性が考えられた。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。

亜鉛の添加によりL-ヒスチジンの取り込み速度は無添加時に比べ約4倍と顕著に増加した。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。そのため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 5(a)³³⁾に示したように、Michaelis-Mentenプロットの解析から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た。Figure 5(b)³³⁾のEadie-Hofsteeプロットの解析か

Fig. 6. 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. BCH: 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (system-L transporter), L-Glu-γ-MH: L-glutamic acid γ-monohydroxamate (system-N transporter).

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1つのSystem系だけが関与することが考えられた。

他方、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。

さらに、ATP合成阻害剤である2,4-ジニトロフェノール(2,4-dinitrophenol; DNP)の前処理、及び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前処理でも、Na⁺ free溶液でもL-ヒスチジンの取り込み量は有意に低下した。しかし、これに亜鉛を添加した場合にはDNP前処理でも、Na⁺ free溶液でも、L-ヒスチジンの取り込みは抑制されなかった。次に、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。促進拡散輸送系の阻害剤である2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH)を用いた検討では、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及び亜鉛添加とともに有意に阻害された(Fig. 6).³³⁾ 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

たところ、BCHとL-Glu-γ-MHを添加すると単独では有意な阻害がみられたが、亜鉛添加時の条件では阻害は認められなかった(Fig. 6)。なお、この実験系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。これらのことから、亜鉛を添加することにより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。一方、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ところ、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では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いという結果になった。³³⁾

これまでの結果から、ヒスタミンはLMECsの膜表面にあるH₁及びH₂受容体を介したTJタンパク質発現の低下によって、フルオレセインの細胞間隙透過クリアランスを一時的に上昇させ、薬物の組織移行を瞬時に増加させる可能性が唆された。また、亜鉛はLMECsへのL-ヒスチジンの取り込みを増加させ、結果としてLMECs内でヒスタミン産生が促進されることが推測された。現在、細胞内で産生されたヒスタミンの核内受容体の結合とTJ開口との関係について研究を進め、培養液に直接添加さ

れたヒスタミンの作用と比較することを試みている。

3. 脳と肺の微小血管内皮細胞及び胸部大動脈血管内皮細胞における薬物代謝能力

わが国では、うつ病で入院、通院中の患者、そして他の気分障害を含めると神経精神疾患患者は数十万人と言われていて、潜在的患者はさらに多くこの10倍以上と推定されている。また、自殺、パニック障害、感情障害を持つニートは現代日本、いや世界の社会問題となっている。したがって、早急な薬物療法の確立は必然的に求められている。現在抗うつ薬は第四世代まで開発が進んでいるが、抗うつ薬は古くから指摘されているように遅効性である。筆者は薬物動態学的観点から、脳内への抗うつ薬の送達で大きな障害になるのはBBBの通過過程ではないかと考えた。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になる。BBBを構成する脳毛細血管内皮細胞は常に好氣的条件下に曝されているため、ここに薬物代謝酵素が備わっていれば解毒(薬物代謝)作用がバリアーの1つの機能をして働いている可能性がある。すなわち、ここでの薬物代謝の選択的回避が、中枢への薬物デリバリー戦略にかかせないものであると筆者は考えた。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で代謝を受けると、組織移行性は低くなる。したがって、総延長が数万kmにもおよぶと言われている動脈血管の内皮細胞や組織に接触している毛細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しているかもしれないと推定している。

3-1. 脳微小血管内皮細胞内のフラビン含有モノオキシゲナーゼタンパク質の発現とその活性 フラビン含有モノオキシゲナーゼ(flavin-containing monooxygenase; FMO)は、求核性ヘテロ原子含有薬物及び生体異物と反応して、*N*-及び*S*-酸化する哺乳動物の非CYP酸化酵素である。³⁴⁾ 5つのFMO分子種がヒト及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及び酸素を必要とする。FMO発現は、種、組織、年齢及び性別に依存する。興味深いことに、FMO1は胎児のヒト肝臓で見い出されるが、出生後の酵素発現の著しい変化の過程で、年月の経過とともにヒトFMOでは

FMO3が優勢になる。^{35,36)} マウスでは雌雄ともに、FMO1タンパク質は高発現されるが、肝FMO3タンパク質は雌に対して性特異的に発現している。³⁷⁾ ラット及びマウスの性ホルモンはFMO1及びFMO3の発現を調節し、³⁸⁻⁴¹⁾ グルココルチコイド及び17 β -エストラジオールは、げっ歯類及びヒトにおいてFMO1及びFMO3遺伝子転写の調節因子であると考えられている。^{42,43)} FMO3は、主要ヒト肝臓CYP3A4と同様の発現量で存在する。⁴⁴⁾ FMO4タンパク質は、ヒト及びマウスの肝臓で発現される⁴⁵⁾が、FMO4はヒトの薬物代謝に大きく関与しない。⁴⁶⁾ FMO2は、ヒトの肝臓でほとんど発現されない。⁴⁷⁾ FMO5は、マウス⁴⁸⁾及びヒト⁴⁹⁾の肝臓で高発現される。しかし、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、⁵⁰⁾ FMO5の異物代謝への関与は明らかではない。したがって、FMOに関して述べると、FMO1及びFMO3が、化学物質の代謝に関してFMO分子種の中で最も重要であると考えられている。⁵¹⁾ ヒト脳ミクロソームに関して、抗精神病薬であるクロルプロマジン、イミプラミン、フルオキセチンはFMOで代謝されるという報告があるが、⁵²⁾ 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い。筆者は、単離培養したラットBMECsのFMO活性に係わる分子種を調べるために*d*-クロルフェニラミンのFMO代謝で調べた。

培養ラットBMECsホモジネートに、NADPH再生系存在下で、*d*-クロルフェニラミン代謝に対するpHの影響を検討し、生成物*d*-クロルフェニラミン*N*-酸化体の生成を測定した。その値をMichaelis-Menten式にあてはめると、pH 7.4条件下に比べてpH 8.4の条件下で、高い K_m 値と V_{max} 値が得られた。*N*-酸化への代謝クリアランス値(V_{max}/K_m)はpH 7.4条件下よりも、pH 8.4条件下で約1.3倍高い値であった。FMOは至適pHがpH 8.5付近にある⁵³⁾ことから、*d*-クロルフェニラミン*N*-酸化体の生成にFMOが関与する可能性がある。また、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⁵⁴⁾を添加し、*d*-フェニルクロラミンの*N*-酸化活性を検討したところ、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、このときの IC_{50} は1 μ mol/Lと算出され

Fig. 7. Western Blots for FMOs in Rat BMECs

た。そこで、メチマゾール $1 \mu\text{mol/L}$ を添加したときの *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成量を測定した結果を Lineweaver-Burk プロットで解析したところ、その阻害様式は競合的であることが明らかになり、阻害定数 K_i 値は $0.53 \mu\text{mol/L}$ が得られた。

また、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を用いて検索すると、FMO1、FMO2 及び 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 (Fig. 7).⁵⁵⁾ ここで、Eadie-Hofstee プロット解析したところ、*N*-酸化体生成は pH 7.4 及び pH 8.4 条件下で一相性を示した。これらの結果は培養ラット

Table 2. 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

BMECs に発現する FMO1、FMO2 及び 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た。*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⁵⁶⁾ ことから、培養ラット BMECs での *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化反応には FMO1 の関与が示唆された。

培養ラット BMECs 及びラット肝細胞 (rat normal hepatocytes; 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 及びラット 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 及び $12.06 \text{ nmol/mg protein/min}$ であり (Table 2).⁵⁵⁾ 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。⁵⁵⁾

3-2. 肺微小血管内皮細胞におけるニコチンの代謝 培養ラット LMECs において、ニコチンは CYPs (CYP2C11 及び CYP3A2) 及び FMO によって、それぞれコチニン及びニコチン *N'*-酸化体に代謝される。CYP による酸化反応は、FMO によるそれよりもかなり高いことがわかった。さらに、ニコチン *N'*-酸化体は *cis*-と *trans*-体に立体選択的に代謝された (Table 3).⁵⁷⁾ この結果からは、肺微小血管内皮細胞がニコチンを代謝し、喫煙によって

Table 3. Kinetic Parameters for Nicotine Metabolism in Rat LMECs

Low- K_m phase	K_{m1} (mM)	V_{max1} [nmol (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹]	V_{max1}/K_{m1} [mL (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹]
Cotinine	0.23 ± 0.02	46.5 ± 3.56	202.1 ± 10.2
<i>Cis</i> -nicotine <i>N'</i> -oxide	—	—	—
<i>Trans</i> -nicotine <i>N'</i> -oxide	0.17 ± 0.05	3.36 ± 0.23	19.8 ± 2.23
High- K_m phase	K_{m2} (mM)	V_{max2} [nmol (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹]	V_{max2}/K_{m2} [mL (mg protein) ⁻¹ min ⁻¹]
Cotinine	1.43 ± 0.11	81.7 ± 7.24	57.2 ± 3.21
<i>Cis</i> -nicotine <i>N'</i> -oxide	1.49 ± 0.01	7.27 ± 0.06	4.88 ± 0.11
<i>Trans</i> -nicotine <i>N'</i> -oxide	2.41 ± 0.08	7.03 ± 2.24	2.92 ± 2.11

For nicotine metabolism in rat LMECs K_{m1} and V_{max1} represent apparent affinity constant and apparent maximum metabolic activity for low- K_m phase, and K_{m2} and V_{max2} represent apparent affinity constant and apparent maximum metabolic activity for high- K_m phase.

Fig. 8. Inhibitory Effect of Anti-CYP Antibodies on the *N*-Demethylation Activity in Rat TAECs

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°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.

摂取されたニコチンを代謝することにより、ニコチンの血中への移行を阻止する作用を有することが見いだされた。⁵⁷⁾

3-3. 胸部大動脈血管内皮細胞におけるイミプラミン *N*-酸化反応と *N*-脱メチル化反応 培養ラット胸部大動脈血管内皮細胞 (thoracic aortic endothelial cells; 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*-酸化体及び *N*-脱メチル化体を測定した。⁵⁸⁾ その結果を 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いことが明らかになった。本実験中、肝ミクロソームの代謝物であるイミプラミン及びデシプラミンの 2-水酸化体は出現せず、ラット肝臓によって得られる代謝結果と TAECs の代謝では主経路が異なっていた。この結果を基に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。

次に、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を評価した。抗 CYP2C11 血清と抗 CYP3A2 血清はイミプラミンの *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 血清及び抗 CYP2B1 血清は、*N*-脱メチル化反応を明らかに阻害しなかった (Fig. 8).⁵⁸⁾ このことから、培養ラット TAECs

A CYP2C11

B CYP3A2

Fig. 9. Indirect Immunofluorescent Histochemistry of Rat TAECs Using the Polyclonal Anti-CYP 2C11 (A) and Anti-CYP 3A2 (B) Antibodies

におけるイミプラミン *N*-脱メチル化反応では CYP2C11 及び CYP3A2 が関与することが明らかとなった。さらに、CYP2C11 及び CYP3A2 の細胞内局在を免疫蛍光染色法により確認したところ、CYP2C11 及び 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 (Fig. 9).⁵⁸⁾

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。また、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。しかし、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。したがって、これらの結果からはイミプラミン *N*-酸化が主に FMO により代謝されると推定された。また、メチマゾールを添加して、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結果から、阻害様式は競合的で *N*-酸化反応に対する 1 μ mol/L のメチマゾールの阻害定数 K_i 値は、0.80 μ mol/L となった。

Fig. 10. Schematic Illustration on New Function in Endothelial Cells

以上のように、各組織の毛細血管及び大動脈血管の内皮細胞は薬物代謝酵素の CYP 及び FMO を有し、その代謝活性は肝細胞のそれに匹敵する能力を持つことが明らかになった。臓器血管内皮細胞は組織への薬物移行に対する代謝バリアーになり得ることが示唆された。

4. おわりに

毛細血管内皮細胞の新たな機能として、TJ の強固な形成には TJ タンパク質である Claudin-1 が大きく関与することが分かった。また、ヒスタミンが瞬時にしかも可逆的に TJ を開口することを見出した。さらに、ヒスタミンの前駆物質である L-ヒスチジンの取り込みを亜鉛が増加させ、微小血管内皮細胞内に存在する HDC によってヒスタミンが産生するのを増加させることが明らかになった。一方、常に血液に接し好气的条件下に曝されている血管内皮細胞に CYP 及び FMO などの薬物代謝酵素が存在することが見いだされた。その代謝活性は、動脈及び毛細血管内皮細胞の数から推測すると肝細胞と同程度の薬物代謝能を有することが考えられ、薬物の組織移行に対する代謝機構がバリアーの役割をになっていることを明らかにした (Fig. 10)。

本総説で、TJ の可逆的な開口とその開口物質の新たな探索、及び血管内皮細胞内薬物代謝の選択的回避が、組織への薬物の効率的なデリバリー戦略となる可能性があることを示した。新薬の開発、さら

には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つながることを願っている。

謝辞 筆者の研究は、仙台、青森、そして北の地から大飛行して温かく迎えられた徳島の地で、多くの先生方によって支えられ成し遂げられたものであります。また、伝統校、新設校、中堅校で出会った学生は、様々な学風の人々でしたが、朝から晩まで苦楽をともにしてくれました。ここに、心から感謝申し上げます。最後に、家族の温かさに改めて感謝しつつ、これからの人生もまた、思い出深いものにしたいと考えています。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Niwa H., Hikichi N., Sakurai E., Sasaki K., Ueda M., *Yakuzaigaku*, **40**, 32–41 (1980).
- 2) Sakurai E., Fukuse G., Ueda M., Murata R., Hikichi N., Niwa H., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **76**, 293–299 (1980).
- 3) Sakurai E., Hikichi N., Niwa H., *J. Pharmacobio-Dyn*, **8**, 186–192 (1985).
- 4) Tanino T., Komada A., Ueda K., Bando T., Nojiri Y., Ueda Y., Sakurai E., *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1950–1957 (2016).
- 5) Tanino T., Bando T., Komada A., Nojiri Y.,

- Okada Y., Ueda Y., Sakurai E., *Drug Metab. Dispos.*, **45**, 1189–1196 (2017).
- 6) Tanino T., Bando T., Nojiri Y., Okada Y., Nagai N., Ueda Y., Sakurai E., *Biochem. Pharmacol.*, **158**, 318–326 (2018).
- 7) Nomura A., Sakurai E., Hikichi N., *Yakugaku Zasshi*, **115**, 633–640 (1995).
- 8) Nomura A., Sakurai E., Hikichi N., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 257–262 (1997).
- 9) Nomura A., Sakurai E., Hikichi N., *Yakugaku Zasshi*, **118**, 317–323 (1998).
- 10) Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **141**, 1539–1550 (1998).
- 11) Furuse M., Sasaki H., Fujimoto K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **143**, 391–401 (1998).
- 12) Tamura A., Tsukita S., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **36**, 177–185 (2014).
- 13) Watari A., Hasegawa M., Yagi K., Kondoh M., *PLoS. One*, **11**, e0145631 (2016).
- 14) Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T., Yagi K., *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1437–1444 (2010).
- 15) Ueda Y., Shinmyouzu Y., Nakayama H., Tanino T., Sakurai E., Sakurai E., *Pharmacol. Pharm.*, **7**, 133–139 (2016).
- 16) Kuwabara H., Kokai Y., Kojima T., Takakuwa R., Mori M., Sawada N., *Cell Struct. Func.*, **26**, 109–116 (2001).
- 17) Krause D., Mischeck U., Galla H. J., Dermietzel R., *Neurosci. Lett.*, **128**, 301–304 (1991).
- 18) Nakagawa S., Deli M. A., Nakao S., Honda M., Hayashi K., Nakaoke R., Kataoka Y., Niwa M., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **27**, 687–694 (2007).
- 19) Colegio O. R., Van Itallie C. M., McCrea H. J., Rahner C., Anderson J. M., *Am. J. Physiol.*, **283**, C142–C147 (2002).
- 20) Van Itallie C., Rahner C., Anderson J. M., *J. Clin. Invest.*, **107**, 1319–1327 (2001).
- 21) Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **161**, 653–660 (2003).
- 22) Sakurai E., Gunji E., Iizuka Y., Hikichi N., Maeyama K., Watanabe T., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **29**, 105–109 (1993).
- 23) Yamakami J., Sakurai E., Kuramasu A., Sakurai E., Yanai K., Watanabe T., Tanaka Y., *Inflamm. Res.*, **49**, 231–235 (2000).
- 24) Hallman J., Sakurai E., Orelund L., *Acta Psychiatr. Scand.*, **81**, 73–77 (1990).
- 25) Yamakami J., Sakurai E., Sakurada T., Maeda K., Hikichi N., *Brain Res.*, **812**, 105–112 (1998).
- 26) Sakurai E., Sakurada T., Ochiai Y., Yamakami J., Tanaka Y., *Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol.*, **282**, L1192–L1197 (2002).
- 27) Dovat S., Gilbert K. A., Petrovic-Dovat L., Rannels. D. E., *Am. J. Physiol.*, **275**, L30–L37 (1998).
- 28) Vallee B. L., Auld D. S., *Biochemistry*, **29**, 5647–5659 (1990).
- 29) Gray A. T., Leonoudakis D. J., Yost C. S., *Mol. Brain Res.*, **52**, 157–161 (1997).
- 30) Vandenberg R. J., Mitrovic A. D., Johnston G. A. R., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 189–196 (1998).
- 31) Reyes J. G., *Am. J. Physiol.*, **270**, C401–C410 (1996).
- 32) Buxani-Rice S., Ueda F., Bradbury M. W. B., *J. Neurochem.*, **62**, 665–672 (1994).
- 33) Sakurai E., Sakurai E., Ueda Y., Yagi Y., *Biol. Trace Elem. Res.*, **142**, 713–722 (2011).
- 34) Rettie A. E., Meier G. P., Sadeque A. J. M., *Chem. Biol. Interact.*, **96**, 3–15 (1995).
- 35) Dolphin C. T., Cullingford T. E., Shephard E. A., Smith R. L., Phillips I. R., *Eur. J. Biochem.*, **235**, 683–689 (1996).
- 36) Koukouritaki S. B., Simpson P., Yeung C. K., Rettie A. E., Hines R. N., *Pediatr. Res.*, **51**, 236–243 (2002).
- 37) Cherrington N. J., Cao Y., Cherrington J. W., Rose R. L., Hodgson E., *Xenobiotica*, **28**, 673–682 (1998).
- 38) Dannan G. A., Guengerich F. P., Waxman D. J., *J. Biol. Chem.*, **261**, 10728–10735 (1986).
- 39) Lemoine A., Williams D. E., Cresteil T., Leroux J. P., *Mol. Pharmacol.*, **40**, 211–217 (1991).
- 40) Falls J. G., Ryu D. Y., Cao Y., Levi P. E., Hodgson E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 212–223 (1997).
- 41) Coecke S., Debast G., Phillips I. R., Ver-cruysse A., Shephard E. A., Rogiers V., *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1047–1051 (1998).
- 42) Dixit A., Roche T. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **233**, 50–63 (1984).
- 43) Esposito T., Varriale B., D’Angelo R., Amato

- A., Sidoti A., *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, **20**, 99–109 (2014).
- 44) Haining R. L., Hunter A. P., Sadeque A. J., Philpot R. M., Rettie A. E., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 790–797 (1997).
- 45) Novick R. M., Mitzey A. M., Brownfield M. S., Elfarrar A. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**, 1148–1155 (2009).
- 46) Krueger S. K., Williams D. E., *Pharmacol. Ther.*, **106**, 357–387 (2005).
- 47) Dolphin C. T., Beckett D. J., Janmohamed A., Cullingford T. E., Smith R. L., Shephard E. A., Phillips I. R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 30599–30607 (1998).
- 48) Janmohamed A., Hernandez D., Phillips I. R., Shephard E. A., *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 73–83 (2004).
- 49) Cashman J. R., Zhang J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **46**, 65–100 (2006).
- 50) Zhang J., Cerny M. A., Lawson M., Mosadeghi R., Cashman J. R., *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **21**, 206–215 (2007).
- 51) Ziegler D. M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **33**, 179–199 (1993).
- 52) Bhamre S., Bhagwat S. V., Shankar S. K., Boyd M. R., Ravindranath V., *Brain Res.*, **672**, 276–280 (1995).
- 53) Ziegler D. M., *Drug Metab. Rev.*, **19**, 1–32 (1988).
- 54) Siddens L. K., Henderson M. C., VanDyke J. E., Williams D. E., Krueger S. K., *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 570–579 (2008).
- 55) Sakurai E., Ueda Y., Mori Y., Shinmyozu Y., Sakurai E., *Pharmacol. Pharm.*, **4**, 1–6 (2013).
- 56) Cashman J. R., Celestial J. R., Leach A. R., *Xenobiotica*, **22**, 459–469 (1992).
- 57) Ochiai Y., Sakurai E., Nomura A., Itoh K., Tanaka Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 403–407 (2006).
- 58) Ueda Y., Yaginuma T., Sakurai E., Sakurai E., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **50**, 496–501 (2014).