

有機アニオントランスポーターの薬物動態的役割と乳ガン治療への応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野沢, 敬 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26636

氏名	野沢 敬
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第720号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	有機アニオントランスポーターの薬物動態的役割と乳ガン治療への応用
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 横井 毅(医学系研究科・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授), 玉井 郁巳(東京理科大学・教授)

学位論文要旨

Organic anion transporting polypeptide (OATP) family is consisted of 11 members, and some of them are involved in the hepatic handling of endogenous compounds and xenobiotics. Among them, first of all I focused on OATP-B which is expressed in both of intestine and liver. Immunohistochemical analysis revealed that OATP-B is localized at the brush-border membrane in intestinal epithelial cells. When examined in the transfected cultured cells, OATP-B exhibited higher transport activity and broader substrate selectivity in acidic pH compared with neutral pH. Since OATPs transport various drugs, the functional alteration by genetic polymorphisms may cause the inter-individual variability of drug disposition. Measurements of the intrinsic activity of genetic variants of OATP by *in vitro* transfected cells suggested the alteration of activity by genetic polymorphisms. Although many OATPs and other anion transporters recognize estrone-3-sulfate as a substrate, the biological relevance is unclear. Estrone-3-sulfate is a major circulating estrogen precursor, and could be used as active estrogen to breast cancer cells, leading to the progression of hormone-dependent breast cancer cells. Thus, I demonstrated that the internalization of estrone-3-sulfate into breast cancer cells is mediated by specific transporter(s), and inhibition of the transporter can suppress the proliferation of breast cancer cells. These findings will provide useful information for clinical utilization of transporters as the drug targets and optimization of drug therapy.

分子生物学的手法の発達に伴って、トランスポーターの遺伝子クローニングが盛んになされてきた。その数は solute carrier (SLC)ファミリーとして登録されているだけでも、43 ファミリー、319 遺伝子に達する。一方、遺伝子クローニングは目覚ましい勢いで進んだものの、その「薬物動態的意義」および「生理的役割」が明らかになっているものはほんの一部である。Organic anion transporting polypeptide (OATP)ファミリーもまた、徐々にその重要性が明らかになりつつあるものの、未だ不明な点の多いトランスポーター群である。OATP

は当初、胆汁中排泄の第一段階となる血液中から肝細胞内への取り込みを司るトランスポーターとして単離された。現在では、OATPファミリーの一つであるOATP-Cが、肝臓特異的な発現と広い基質認識性から、その役割を果たしていると考えられている。本研究では、OATP-Cの発見と同時期に当研究室によってクローニングされたOATP-Bに注目してきた。

小腸におけるOATP-Bの薬物動態的意義

OATP-BもOATP-Cと同様に肝臓での発現していることに注目し、内因性物質や外来性化合物の肝取り込みに働くトランスポーターとして研究を進めた。しかし、OATP-Bの基質選択性は狭く、同部位に発現するOATP-Cと比較して、肝臓での重要性は低いと考えられた。そこで、OATP-Cが肝臓に特異的に発現し機能するのに対し、OATP-Bは他組織において生理的役割を有する可能性を考え、OATP-Bが小腸に発現している点に注目した。薬物の消化管吸収に関与すると考え、免疫組織化学的検討及び小腸に特異的な酸性pHでの輸送活性の検討を行った。OATP-Bは小腸上皮細胞の刷子縁膜側に発現し、しかも酸性pHで輸送活性が中性pHに比べて増加し、pravastatinやfexofenadineのような薬物を含め、広い基質選択性を示すことが示された。小腸上皮細胞近傍は酸性環境となっており、生理的酸性pHで効果的に薬物の吸収あるいは内因性基質の吸収などに関与するものと考えられた。以上の結果は、ヒトOATPが薬物を含む有機アニオン系物質の消化管吸収に関わる可能性を示した初めての報告であった。現在では、OATP-Bは有機アニオン系化合物の吸収メカニズムを検討する際には不可欠な存在となりつつある。しかし、OATP-Bのヒト小腸からの薬物吸収における量的寄与については明確ではない。基質となる薬物の吸収の非線形性、フルーツジュース併用による薬物の吸収低下や、小腸内pHと薬物吸収の関係などヒトで見られた現象を、OATP-B発現実験系で再現することが、OATP-Bの小腸での薬物動態的意義の証明に繋がると考えられる。

OATP-BおよびOATP-Cの遺伝子多型

生体内におけるSLCトランスポーターの重要性の証明は、医薬品の薬効や副作用の個人差の原因として、SLCトランスポーターの遺伝子多型が影響することを示すことでも可能である。特に、OATP-Cの遺伝子多型に関して、現在、pravastatinの体内動態との関連性が複数報告されてきている。トランスポーターの遺伝子多型と薬物の体内動態との関係を効率よく明らかにするには、変異によるトランスポーター固有の機能変動の有無を評価する必要がある。本研究では、遺伝子クローニングの際に見い出されたOATP-BおよびOATP-CのSNPの*in vitro*発現系における機能評価を試みた。トランスポーター発現系として、

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞とアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。In vitro トランスポーター発現実験系における見かけの輸送活性は、変異による定性的な活性変動、細胞膜へのソーティング異常、ならびに発現量の変化など、複数の影響を受ける。これらは実験系の影響も受けるため、変異体の固有の活性を評価するには、注意深い解析が必要とされる。比較する変異体間の実験系における発現量の相違がそのまま反映される。そこで本研究では、HEK293 細胞において、ソーティング異常の有無を免疫組織化学法により検出し、またトランスポータータンパク質の発現量をウエスタンブロット解析により定量し、この値で見かけの輸送活性を補正する方法、ならびにアフリカツメガエル卵母細胞に cRNA 注入量を増加させ、見かけ上の取り込み活性がプラトーに達した注入量での活性を変異体間で比較する方法を用いた。その結果、OATP-B および OATP-C の遺伝子多型において、トランスポーター固有の活性が低下していると結論付けられる変異体を数種類見い出すに至った。本研究で提唱した方法によって得られた結果は、いずれも他の研究者とほぼ一致した傾向を示した。遺伝子解析から見いだされた数多くの SNP が機能変動を引き起こす可能性を効率よく *in vitro* で評価し、ヒトにおける薬物の体内動態個人差のメカニズム解明に応用されることが期待される。

エストロン 3 硫酸トランスポーターを標的とした乳ガン治療法の提唱

トランスポーターの生理的役割の証明のためには、その基質の持つ意味を考えなければならない。従来、OATP ファミリーの活性解析には、*in vitro* 発現系で高い活性が得られることから estrone-3-sulfate が頻繁に用いられてきた。しかし、何故 estrone-3-sulfate が輸送されるのか、その意義は明らかではなかった。そこで estrone-3-sulfate を輸送する意味に注目した。Estrone-3-sulfate は、女性ホルモンであるエストロゲンの抱合代謝物であり、血中エストロゲンの約 90% を占める。それ自身のエストロゲン活性はないが、脱抱合などを経てエストロゲン活性を示すことから、活性エストロゲンの前駆体となる。エストロゲンは全身において様々な役割を負っているが、乳ガンにおいてはホルモン依存性乳ガン細胞の増殖を増大させる因子となる。従って、estrone-3-sulfate が乳ガン細胞に移行し、エストロゲンとして作用することが乳ガンの進行と関連するという仮説が考えられる。親水性が高い物理的性質から、estrone-3-sulfate の細胞膜を介した輸送は単純拡散によるとは考えにくく、トランスポーターに制御されている可能性が高い。そこで、本研究では、乳ガンの性質と増殖の原因物質である内因性基質の特徴に基づき、有機アニオントランスポーターを標的とした新たな化学療法を提唱することを目的とした。エストロゲン依存性乳ガン細胞である T-47D 細胞および MCF-7 細胞に estrone-3-sulfate トランスポーターが存在

するか、さらにそのトランスポーターがホルモン依存性乳ガン細胞の増殖に関与するかという点を検討し、そのトランスポーターの阻害が乳ガン細胞の増殖抑制につながる可能性を検討した。乳ガン細胞による estrone-3-sulfate の取り込みは、飽和性を示し、算出された Km 値は、既知 OATP トランスポーターで報告された値と近似していた。また、その輸送は、OATP の代表的基質である bromosulphophthalein や taurocholate など種々の有機アニオンで阻害された。さらに、estrone-3-sulfate はエストロゲン依存性乳ガン細胞において、エストロゲン依存的な転写活性と細胞増殖を濃度依存的に促進した。その促進効果は、トランスポーター阻害剤として添加した bromosulphophthalein の添加により濃度依存的に抑制された。なお、細胞内移行にトランスポーターを必要としないと考えられる estrone による細胞増殖促進は、トランスポーター阻害剤によって抑制されなかった。したがって、estrone-3-sulfate のトランスポーターを阻害することが乳ガンの進行を抑える可能性を提唱するに至った。RT-PCR の結果、両細胞には共通して OATP-D および OATP-E の発現が見られた。しかし、これらが estrone-3-sulfate 取り込みにおける責任トランスポーター分子であるかは未だ確認に至っておらず、他のトランスポーターの関与の可能性も否定できない。しかし、トランスポーターの生理的役割に基づいた考えから、トランスポーターを標的とした新規乳ガン治療の可能性を提唱することに成功した。今後、estrone-3-sulfate の取り込みの責任トランスポーター分子の同定、より特異性の高い阻害剤の開発あるいは阻害抗体の作製などにより、乳ガンの新規治療法の確立に繋がることを期待している。

結論

本研究では、OATP-B の発現臓器、発現部位を考慮した機能解析を行い、OATP-B が薬物および内因性基質の消化管吸収に関与する可能性を示唆することが出来た。また、OATP の遺伝子多型の解析において、*in vitro* におけるトランスポーター固有の輸送活性の評価方法を提唱した。SNP は輸送機能だけでなく、発現量やソーティングにも影響する可能性があり、*in vivo* での影響の推定は容易ではないが、まずはトランスポーター分子固有の輸送活性の評価が重要である。本研究で提案した方法がどの程度の精度を持つかは、今後の検討で明らかにされるが、より良い評価方法に繋がる価値のある成果であると考えている。また、OATP トランスポーターの基質の生体内での意味を考えることによって、トランスポーターを標的とした新規乳ガン治療の可能性を提唱するに至った。責任トランスポーターの分子同定が達成されれば、トランスポーター機能に基づいた医薬品の開発も夢ではないのかもしれない。

トランスポーター研究は、分子同定と基本的な輸送活性に関して、目覚まし

い勢いで進歩しており、今後はその情報をどのように医学・医療に利用することが出来るかが重要となる。本研究で得られた成果が、医薬品開発や、今後のテーラーメイド医療への有用な情報になることを期待する。

学位論文審査結果の要旨

本研究は、ヒト肝臓に選択的に発現する OATP-C (SLCO1B1) ならびに肝臓や腸管など複数の組織に発現する OATP-B (SLCO2B1) の薬物動態における影響を明らかにするとともに、これら知見に基づき有機アニオントランスポーターの生理的意味付けの一つとして細胞増殖のホルモン依存性に着目し、乳癌治療において有機アニオントランスポーターを治療標的とする可能性を提唱したものである。

アニオン性薬物の消化管吸収におけるトランスポーターの関与の示唆はあるが、ヒトにおけるその分子の実体の解明はなされていない。本研究では OATP-B 遺伝子が小腸に発現することを基に、小腸上皮細胞頂側膜における発現、ならびに pH 依存的輸送活性を有することを見だし、小腸の生理的環境下で、フェキソフェナジンやプラバスタチンのような薬物吸収に働くことを示した。また、薬物の肝動態に重要な OATP-C の遺伝子多型に関して *in vitro* 発現系にて解析を行い、ハプロタイプである OATP-C*15 が野生型に比べ活性が半減することを見だした。本結果は、同時期に他機関より報告された *in vivo* における薬物動態変動現象を支持するものとなった。さらに、OATP-B についても活性が低下する遺伝子多型を見だし、活性変動が懸念される OATP の遺伝子多型の解析に成功した。

これら有機アニオントランスポーターの生理的基質のエストロン 3 硫酸 (E_13S) に着目し、乳癌の一部が示すホルモン依存性との関連研究に発展させた。本研究では、エストロゲンとして最も血中に高濃度に存在する E_13S がトランスポーターによって細胞内に取り込まれ、脱抱合等により活性型になり、エストロゲン作用を示すこと、さらに E_13S の取り込み阻害により乳癌細胞増殖が抑制できることを示した。乳癌のホルモン療法には、エストロゲン受容体拮抗剤やアロマターゼ阻害剤が用いられているが、本成果は乳癌細胞に備わる E_13S トランスポーターが新しいホルモン療法の標的となることを示すものである。

以上、本研究はヒト有機アニオントランスポーター OATP の薬物動態における重要性を示すとともに、有機アニオントランスポーターが有する生理的役割の解明を通じて新しい薬物標的を提案するに至る成果を得た。かかる研究は、今後のトランスポーター研究における重要な知見を与えており、博士(薬学)論文に値すると評価された。