

# 小腸有機アニオン輸送体OATP2B1に及ぼす食品作用の多様性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-09-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/00059287">http://hdl.handle.net/2297/00059287</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	藤田 大地
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲 304 号
学位授与の日付	令和元年 9 月 26 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	小腸有機アニオン輸送体 OATP2B1 に及ぼす食品作用の多様性

論文審査委員	主査	玉井 郁巳
	副査	松永 司
	副査	加藤 将夫
	副査	中島 美紀
	副査	深見 達基

# 学位論文要旨

## 【Abstract】

Until now food effect on intestinal function has generally been ascribed to small molecules in food except for fibers which affect intestinal content. However, recently, edible-plant-derived nanoparticles (NPs), containing large molecules, have been suggested to affect intestinal function. Therefore, this thesis mainly aimed to clarify the mechanism of food effect on intestinal organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1, which contributes to drug absorption. Site-directed mutagenesis studies indicated that amino acid residues of the protein, H579 and H618 are involved in the low- and high-affinity sites for estrone-3-sulfate ( $E_13S$ ) transport, respectively. Moreover, uptake characteristics of various substrates of OATP2B1 by mutated OATP2B1, suggest that multiple binding sites (MBS) are present on OATP2B1. Apple-derived NPs (APNPs) were isolated by ultracentrifugation and characterized by measurement of particle size distribution and electron microscopy. mRNA expression levels of several transporters, including OATP2B1, were changed in APNP-treated Caco-2 cells. Moreover, protein expression and activity of OATP2B1 were also decreased by APNP exposure. To clarify involvement of microRNA (miRNA) on APNP effect, candidate miRNA was predicted by RNAhybrid and they were detected in APNP fraction obtained. The inhibitors for candidate miRNA suppressed decreased luciferase activity by APNP. In addition, the mimic for candidate miRNA reduced expression of OATP2B1 mRNA in Caco-2 cells. Accordingly, food-derived NP should mediate delivery of large molecules in food such as miRNA which decreases expression of intestinal transporters.

## 【背景・目的】

食品の生体への作用は全身に及ぶが、中でも食品成分が高濃度に暴露される消化管は、その作用が大きいと考えられる。特に小腸の上皮層を構成する上皮細胞は栄養物や経口薬の吸収、さらには内因性化合物の再吸収・分泌を担う。そのため、食事成分によって小腸上皮細胞の機能が制御される可能性は十分に考えられるため、食品による小腸上皮細胞の機能調節の影響は重大である。したがって、小腸機能に及ぼす食品作用機構の解明や作用成分の同定は、生体に及ぼす食品作用の理解につながり、健康増進や疾患予防への応用が期待できる。

小腸に発現する輸送体は食事の栄養物に限らず内因性化合物や薬物を基質として認識する輸送体も存在する事から、輸送体に対する食品の作用は、内因性の生理活性物質のホメオスタシスや医薬品の体内動態を変動させる因子になる。当研究室は、小腸に発現する OATP2B1 が内因性化合物や一部の薬物を基質として認識することから、小腸における化合物吸収を担っていることを示してきた[1]。また、OATP2B1 はアップルジュース (AJ)をはじめとする果汁によって活性が低下することから、小腸輸送体が薬物 - 食品間相互作用を引き起こす一因となることも示唆した[2]。さらに、輸送体に対する食品作用の応用例として、AJ による OATP2B1 阻害によって抗がん剤 SN-38 の消化管障害が緩和させる可能性を示しており、輸送体上の相互作用の有用性を示してきた[3]。これまで、当研究室では、果汁の作用が OATP2B1 基質間で異なることから、OATP2B1 上には複数の基質認識部位が存在する Multiple Binding Site (MBS)仮説を立て、キネティック解析の結果や阻害剤の感受性の違いから、その仮説を支持してきた[4]。一方で、OATP2B1 を形成するアミノ酸残基の影響が OATP2B1 基質である estrone-3-sulfate ( $E_13S$ )の輸送活性を左右する報告があることから、OATP2B1 基質間で独

立したアミノ酸残基が関与している可能性があると考えた。そこで、OATP2B1の輸送活性に対するアミノ酸残基の影響を評価することで、立体構造上からMBSの存在を実証できる可能性がある。OATP2B1におけるMBSの存在を示すことは、OAPT2B1の輸送特性として、食品作用の発生機序の解明につながると期待できる。一方、OATP2B1に限らず小腸輸送体に対する食品作用は、食品中の低分子化合物の作用で説明されてきた。食品中には低分子のみならず高分子も含まれているが、消化管管腔内における安定性や膜透過性の問題点から、その消化管機能への影響は考慮されてこなかった。しかし最近、食品中には低分子に加え、核酸やタンパク質等の高分子も含む数百nm程度のベシクル様ナノ粒子(nanoparticle; NP)の存在が報告されている[5]。食品中のナノ粒子はエクソソームと同様に標的細胞への内容物の輸送を担うと報告されているため、食品由来ナノ粒子を介することで、既知の低分子とは異なる食品由来高分子の作用を示すことができるのではないかと考えた。そこで、本研究は、小腸機能に及ぼす食品作用機構の解明を目指して、主要な小腸機能である化合物吸収を担う輸送体への影響に着目することで、食品作用の発現を左右する輸送特性の解明及び、食品作用の新規メカニズム・作用成分の探索を目的とした。食品作用に及ぼす輸送特性の解明として、これまでのキネティック解析や阻害剤感受性に加え、OATP2B1の立体構造上における基質活性部位の予測及びMBSの実証のため、アミノ酸変異体を用いて検討を行った。一方で、これまでOATP2B1に対する作用を評価してきたりんご果汁を用いて、りんご中に含まれるNPがOATP2B1機能に及ぼす作用を評価した。さらに、OATP2B1に対するりんご由来NP(Apple-derived nanoparticle: APNP)の作用について、食品中高分子による作用の可能性についてはマイクロRNA(miRNA)の関与について検討した。

## 【方法】

OATP2B1のアミノ酸残基置換体はSite-directed mutagenesisによって作製した後、アフリカツメガエル卵母細胞(*Xenopus laevis* oocyte、以下 oocyte)に合成したcRNAを注入し、野生型及び変異体OATP2B1を発現させた。各OATP2B1基質のOATP2B1輸送活性は、各基質を暴露後のoocyte内の基質量を液体シンチレーションカウンターあるいはLC-MS/MSによって測定することで、取り込み量として評価した。りんごに含まれるNPの回収は、新鮮なりんごをすりおろし、得られた果汁を2,000×g、20分の遠心と13,000×g、70分の遠心によって果肉を除いた後、120,000×g、130分の遠心によって得られた沈殿の懸濁液をNPが含まれる画分とした。画分中のAPNPの存在を示すため、qNanoによる粒子径測定と電子顕微鏡による形態の観察を行った。OATP2B1に対するAPNPの作用については、Caco-2細胞を用いて、遺伝子発現変動をqRT-PCR及びWestern blottingによって評価した。また、輸送活性はE<sub>1</sub>S<sub>3</sub>の取り込み量によって評価した。Caco-2細胞へのAPNPの移行については、PKH26色素によって蛍光標識した画分をCaco-2細胞に処置し、蛍光顕微鏡による観察によって検討した。さらに、OATP2B1 mRNA発現に対するAPNPの作用部位を探索するために、OATP2B1 mRNAを欠失させた配列を組み込んだプラスミドDNAを導入したHEK293細胞を用いたdeletion assayにおいて、mRNA発現の変化をqRT-PCR及びRT-PCRにより測定した。また、OATP2B1遺伝子(SLCO2B1)の3'非翻訳領域(untranslated region: UTR)へのAPNPの作用を評価するため、OATP2B1-3'UTRを組み込んだプラスミドDNAを導入したHEK293細胞を宿主細胞とし、luciferase assayによって評価した。OAPT2B1に作用するmiRNAは、RNAhybridによって予測し、APNP画分中の候補miRNAの存在及びCaco-2細胞への移行をRT-PCRによって評価した。また、apple miRNAの作用は、候補miRNAと相補的な配列を有する一本鎖RNAを特異的な阻害剤としてHEK293細胞に導入した後、luciferase assayによってAPNPによるOATP2B1発現低下の抑制効果を評価した。さ

らに、候補 miRNA の配列を持つ二本鎖 RNA オリゴヌクレオチドを Caco-2 細胞に導入した後、qRT-PCR によって評価した。

### 【結果・考察】

野生型 OATP2B1 を発現させた E<sub>1</sub>S の細胞内取り込みの濃度依存性試験を行ったところ、二種類の飽和過程 ( $K_m$ 、 $V_{max}$ ) が観測され、従来報告通りのキネティック解析によって E<sub>1</sub>S 輸送における高親和性部位(high affinity site)と低親和性部位(low affinity site)の複数の基質結合部位 (MBS) の存在が示された。MBS の存在を裏付けるために、OATP2B1 タンパク質上の E<sub>1</sub>S 輸送に影響するアミノ酸の同定を試みた。OATP2B1 上のすべてのヒスチジン残基をそれぞれグルタミンに置換した OATP2B1 変異体及び、顕著な活性低下が報告されている R607 のアラニン置換 OATP2B1 変異体を作成し、E<sub>1</sub>S の輸送活性を野生型と比較した。H579Q-OATP2B1 及び H618Q-OATP2B1 の E<sub>1</sub>S 取り込み活性は、それぞれ E<sub>1</sub>S 高濃度および低濃度条件において選択的に低下した。したがって、H579 は E<sub>1</sub>S low affinity site への関与が、H618 は E<sub>1</sub>S high affinity site への関与が示唆された。即ち、OATP2B1 による E<sub>1</sub>S 輸送において異なる結合部位の存在が示唆された。さらに、他の OATP2B1 基質の結合部位との関係を探るため、E<sub>1</sub>S 結合部位への関与が示唆された H579Q-および H618Q-OATP2B1 による輸送活性、ならびに E<sub>1</sub>S high affinity site に対して阻害作用を示す naringin と輸送促進を示す progesterone による作用を比較した。OATP2B1 基質として、fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine 及び PGE<sub>2</sub> を評価対象とした。その結果、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine は、H579Q-および H618Q-OATP2B1 において、輸送活性の低下を示したことから E<sub>1</sub>S affinity site と活性部位を共有していることが示唆された。また、H618Q-OATP2B1 における阻害剤感受性について、progesterone によって輸送活性は変化せず、naringin による輸送低下が認められたことから、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine は E<sub>1</sub>S low affinity site とは異なる結合部位を介して輸送されると考えられる。一方で、fexofenadine と PGE<sub>2</sub> については、H579-及び H618Q-OATP2B1 における輸送活性の低下が認められず、progesterone や naringin による輸送活性の変動も認められず、E<sub>1</sub>S とは異なる独立した活性部位の存在が示唆された。一方、R607A-OATP2B1 においては、全試験化合物の輸送活性を顕著に低下させたことから、全基質の共通部位に位置するアミノ酸残基と考えられた。以上輸送活性への影響が基質毎に異なる複数のアミノ酸残基置換の影響がみられたことから、従来のキネティックな解析に加え、OATP2B1 上に MBS の存在を分子論的に示すことができた。このような MBS の存在は食品作用の多様性を生じる一因となる。

食品作用を示す新規成分及び作用機構の探索を目的に、植物中に存在が報告されている NP の影響を評価した。まず、リンゴより得られた NP (APNP) 画分の特徴を調べた。粒子径測定と電子顕微鏡による観察像から、直径 100-400nm 程度の球形粒子が観察され、画分中に APNP の含有が確認できた。脂質膜を蛍光標識した APNP 画分を Caco-2 細胞に処置した時、Caco-2 細胞内に蛍光が観察されたことから、APNP の Caco-2 細胞内への移行が示された。そこで、APNP 画分処置による OATP2B1 mRNA の発現変動を測定したところ、APNP の濃度及び処置時間に依存した OATP2B1 mRNA 発現量の低下がみられた。しかし、APNP を超音波処理あるいは高熱処理した場合には mRNA 低下作用が抑制され、APNP 粒子を必要とする mRNA 低下作用であることが示された。さらに、タンパク質発現量や輸送活性を評価したところ、APNP 処置により OATP2B1 のタンパク質発現量及び E<sub>1</sub>S 取り込みの有意な低下が認められ、mRNA 発現低下に起因すると考えられた。そこで次に、

APNP による OATP2B1 発現低下に及ぼす、原因成分と作用機序の解明を目的として、食品由来 NP に含まれる高分子成分に着目して、作用成分の解明を目指した。OATP2B1 に対する APNP 作用が mRNA 発現低下であることから、OATP2B1 遺伝子 (SLCO2B1) 上の APNP の作用部位を探索するため、SLCO2B1 遺伝子の長さを変えて作成したプラスミドを用いた deletion assay を行った。その結果、OATP2B1 3'UTR が存在する場合に、APNP による OATP2B1 mRNA 発現低下が観察されたことから、作用成分は 3'UTR を介した発現制御であると考えられた。OATP2B1 3'UTR への作用は、各種 SLCO2B1 遺伝子発現コンストラクトを作成して測定した luciferase assay によっても裏付けられた。以上より、APNP 中に存在する高分子の中でも、主要な作用機序が標的 mRNA 3'UTR との結合によって生じる mRNA 分解あるいは翻訳抑制とされている miRNA を作用成分の候補分子と考えた。そこで、APNP 画分中の miRNA の存在を示すため、バイオアナライザを用いた電気泳動を行った結果、20-30 塩基の核酸が検出され、miRNA 存在が示唆された。miRNA は細胞質中で機能することから、apple miRNA の細胞内移行を示すため、核酸を蛍光標識反応させた APNP 画分を Caco-2 細胞へ処置することで、蛍光顕微鏡によって核酸由来蛍光を観察した。顕微鏡観察の結果、Caco-2 細胞の細胞質中に APNP 画分中の核酸由来の蛍光が観察されたことから、apple miRNA が Caco-2 細胞内で機能している可能性が示された。そこで、作用する miRNA の同定のため、RNAhybrid を用いて OATP2B1 3'UTR と結合性の高い apple miRNA として 7 種の miRNA を候補として、以降の検討に用いた。予測した候補 miRNA が APNP 画分中に存在することは、APNP 画分を用いた RT-PCR で示された。また、microRNA と相補的な配列をもつ一本鎖 RNA を特異的な miRNA inhibitor として用いて、APNP による OATP2B1 発現低下に対する miRNA の関与を luciferase assay で評価した。7 種の候補 miRNA に対する 特異的阻害剤の内、miR-160a-e、miR-7121a-c 及び miR-7121d-h について、APNP による luciferase 活性の低下を有意に抑制した。さらに、miRNA 阻害剤の作用が観察された 3 種について、実際に OATP2B1 の発現低下を示すかを評価するため、化学合成された二本鎖 RNA オリゴヌクレオチドを用いて Caco-2 細胞における OATP2B1 mRNA 発現変動を評価したところ、miR-7121a-c 及び miR-7121d-h の配列を持つ RNA オリゴヌクレオチドによって、OATP2B1 mRNA が低下する傾向が示された。十分な解析結果は得られてはいないが、以上の結果は APNP 画分による OATP2B1 の発現低下は、APNP 中に存在する miR-7121a-c 及び miR-7121d-h の関与を示唆するものであった。

## 【結論】

本研究は、消化管機能に及ぼす食品作用における、小腸輸送体を対象とした食品作用の発現要因として、OATP2B1 上における基質認識部位の多様性と、輸送体の発現制御に対して NP を介した miRNA の関与を見出した研究であり、小腸組織に及ぼす食品作用の多様性を生み出す機序の一端を解明することができた。OATP2B1 による複数の基質結合部位の存在をアミノ酸残基の観点から実証し、輸送体特性が食品作用の多様性を生じさせる一因となることが示された。また、本研究により明らかになった、APNP 及び apple miRNA による OATP2B1 への作用は、既知の低分子による機序とは異なる、新しい概念を提唱するものである。今後、輸送体の輸送特性のさらなる解析と、NP や他の高分子成分による作用の評価によって、より詳細な食品作用の理解が望まれる。また、得られた食品作用の機序に基づいた、健康増進あるいは疾患治療に応用されることが期待される。

## 【引用】

- [1] Nakanishi T. and Tamai I., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27**:106-121.
- [2] Imanaga J. *et al.*, *Pharmacogenet. Genomics.*, **21**:84-93.
- [3] Fujita D. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **44**:1-7.
- [4] Shirasaka Y. *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet.*, **27**:360-364.
- [5] Mu J. *et al.*, *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**:1561-1573.

## 審査結果の要旨

薬物動態を決める輸送体や薬物代謝酵素上での薬物間相互作用の臨床的重要性が指摘され対応が進んでいるが、同様に医薬品の動態・作用に影響する食品との相互作用についての情報は不十分である。消化管は食品成分が高濃度に存在することから食品の影響は大きいと考えられる。本研究は、小腸薬物輸送体に着目し、食品の作用機構の多様性について詳細な検討を行ったものである。小腸薬物吸収にかかわる OATP2B1 輸送体に着目し、既に情報のあるリンゴなど果物を食品として用い、二つの観点から検討を行った。第一は、OATP2B1 輸送体に作用する食品成分の影響が、基質薬物間で異なる点に関するもので、OATP2B1 タンパク質上には複数の機能部位 (Multiple Binding Sites, MBS) が存在するという仮説のもと解析を行った。手法として OATP2B1 を構成するアミノ酸残基を置換した変異体タンパク質を作成して機能部位の特定を行った。その結果、アミノ酸置換の影響が、基質および作用物質によって異なることを見出した。即ち、独立した機能部位が OATP2B1 上に存在することを示し、MBS 仮説を裏付ける成果を得た。第二は、通常の商品作用は、含有されるあるいは代謝により生成する低分子化合物によるものであり、含有高分子は安定性や低膜透過性のために直接消化管に作用しないとされている。これに対し、本研究では食品中のナノ粒子に着目し、粒子に含有された microRNA の作用により OATP2B1 タンパク質発現が低下することを多様な試験により示唆した。本結果は、ナノ粒子を経由することで食品含有高分子が直接消化管機能に影響することを示した初めての例であり、食品の新たな作用機構の提唱に至った。以上、本論文は、小腸輸送体への食品の多様な作用機構を示すことで薬物 - 食品間相互作用の理解に貢献するとともに、ナノ粒子を介した食品高分子成分の作用という新しい考え方を示唆しており、博士(創薬科学)に値すると判断された。