

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390046

研究課題名（和文）有機アニオン輸送体を介した薬物の肝移行性調節とその種差

研究課題名（英文）Species difference in hepatic disposition of organic anions

研究代表者 玉井 郁巳（TAMAI IKUMI）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

研究成果の概要：

医薬品の薬効・毒性への影響が大きい肝動態を決める、肝有機アニオン輸送体の種差に関する研究を行なった。特に OATP と呼ばれる輸送体はヒト動物とも肝臓に複数のサブタイプが発現しており、種間の対応付けが不明であった。そこで、ヒト OATP とラット Oatp 発現系、さらに両種からの肝細胞、ラット全身動態試験を行ない、機能的に対応する分子の同定を試みた。その結果、
-ラクタム抗生物質については、ヒト OATP1B3 とラット oatp1a4 が両種間機能的に対応する分子であることが示された。両者は遺伝子・アミノ酸配列として相同性が高くないため、動物の薬物動態データからヒト予測を行なうためには、タンパク質構造のみならず機能解析も行なう必要性を示し、今後の医薬品の開発・臨床適用における有用な知見を得ることが出来た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学・トランスポーター・肝取り込み・動物種差・有機アニオン・肝毒性・胆汁中排泄

1. 研究開始当初の背景

生理的に必須な生体分子は動物種間で共通した分子の存在が明確な場合が多い。しかし、薬物など生体異物の処理機構は、薬物代謝酵素の例のように種差の存在は稀ではない。即ち、分子的には複数の類似タンパク質

が存在し、明確な種間対応付けが容易ではない。本研究は、医薬品の有効性・毒性に多大な影響を与える肝動態に關与する肝血管側膜に存在する有機アニオントランスポーター（輸送体）に着目した。

本研究対象である肝有機アニオントラン

スポンサー-OATP 分子群は、研究代表者等が従来より着目してきたものである。

研究代表者らは、薬物の肝動態には有機アニオン輸送体が関与していることを 1980 年代から提唱し、2000 年にはその輸送体の分子の実体としてヒトには複数の有機アニオン輸送体分子が存在していることを報告した (Tamai *et al.*, *BBRC*, 273: 251-260(2000))。OATP の最初のヒト分子の同定は、欧州の研究グループによって 1995 年になされた。一方、薬物動態研究では必須なラットにおいては、1994 年に初めて oatp-1 として分子同定されたが、それ以降複数の分子が oatp-2,3,4 として同定され、サブタイプの存在が示された。各 oatp 分子を比較すると、組織分布や機能特性など類似している点があるが一致しておらず、それぞれが異なる特徴を持ち、各分子を特徴付けている。

このようにヒトとラットにおいて肝に発現する分子が明確になることによって有機アニオンの肝動態を分子レベルで解析することが可能になってきた。しかし、ヒトとラットの各 OATP 分子について、肝以外の発現組織や基質選択性、その他の各 OATP 分子の特性が、通常種間に対応分子となるオルトログ分子判断に用いられるアミノ酸相同性の程度と一致しない事実もまた明確になってきた。従って、種間に対応する OATP 分子が曖昧であり、例えばラット oatp-1 で得られる特徴をヒトに外挿する手段がないという状況になった。即ち、本トランスポーター分子のように異物解毒機能も有するような分子は、動物で得られる現象をヒトに外挿する上において、遺伝子やアミノ酸配列の情報では不十分であり、より機能的な解析に基づいた情報による対応付けが求められる状況にあった。そこで本研究のように、種間で機能的に対応する輸送体分子の同定を行なう発想にいたった。

2. 研究の目的

ヒトでの OATP 輸送体が関わる薬物動態を

動物動態から予測するために、ヒト - ラット間に対応する OATP/oatp 分子の情報を得る。得られた情報は薬物の肝動態を中心とした薬物動態の解析・予測に用いる予定であるため、以下のような観点から対応付けを行なう必要がある。

- (1) 基本的なアミノ酸配列ならびに塩基配列の相同性
- (2) 発現組織と組織内極在性
- (3) 基質・阻害剤選択性
- (4) 発現調節機構 (誘導と抑制)
- (5) 生理的役割と関連因子

これらの中で (1) については分子同定の段階で終了しており、その情報は既に存在しており、(2) についても多くの情報がある。しかし、(3) から (5) の課題に関しては、存在する情報は断片的であり、また共通の研究手法で一連の成果が出されていないため、その対応付けは適切にはできない。

そこで本研究内では、上記の中でも特に活性という点で重要な (3) に関する検討を行なうこととした。対象としては、薬物動態に利用される動物としてラットを選び、ヒトとの対応の評価を試みた。

一方、基質によって機能的対応は変動する可能性がこれまでの結果から推定されていた。そこで一定の薬物群を選択した検討が適切であると判断される。β-ラクタム抗生物質は多くの誘導体が存在し、その肝動態・胆汁中移行性は多様である。さらに研究代表者らは本薬物群の肝移行には有機アニオン輸送体の関与を示す成果を得ている。そこで β-ラクタム抗生物質群を中心にヒトとラット間での肝動態に関与する輸送体の対応付けを具体的目的とした。

3. 研究の方法

ヒトとラットの肝発現 OATP 輸送体として以下の分子を対象とした。

ヒト : OATP-A (OATP1A2), -B (OATP2B1), -C (OATP1B1), -8 (OATP1B3)

ラット : oatp-1 (oatp1a1), -2 (oatp1a4), -3

(oatp1a5), -4 (oatp1b2), -9 (oatp2b1)

(1) ラットおよびヒトOATP遺伝子のクローニング

1. NCBIの DNA データベースの情報を基に特異的なプライマーの作成した。
2. 肝組織または培養細胞から RNA を抽出し cDNAを合成した。
3. RNA から合成したcDNAを基質としRT-PCRにより cDNAを増幅させTAクローニングを行った。
4. シークエンス解析によりPCRによる変異および欠出の確認を行った。
5. 以降の機能解析に即した発現ベクターにサブクローニングし、発現系における機能解析に用いた。

(2) 各 OATP/oatp の機能解析

上記でクローニングした遺伝子は、以下のようにヒト腎臓由来培養細胞 HEK293 細胞、あるいはアフリカツメガエル卵母細胞に導入し、機能測定に用いた。

(2)-1 HEK293 細胞での安定発現系の樹立と輸送活性評価法。

1. 発現ベクター (pcDNA5/FRT) に遺伝子を組み込み発現プラスミドを構築した。
2. Lipofectamine2000 を用いて形質転換を行い、安定発現 HEK293 株を選別した。
3. 取り込み試験は輸送体の機能解析に通常用いられる方法により行った。
4. 取り込み量測定には、放射標識体あるいは HPLC を用いて行なった。
5. 阻害試験については、各 OATP 分子によって輸送される基質に対して、同時に添加した阻害剤候補化合物による活性低下の有無から判断した。

(2)-2 アフリカツメガエル卵母細胞発現系と輸送活性評価法。

1. 発現ベクター (pGEMHE) に対象遺伝子を組み込み、発現プラスミドを構築した。
2. pGEMHE ベクター上の T7 プロモーターを利用し cRNA の合成を行い、アフリカツメガエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションし、培養によって輸送体を発現させた。

数日培養したアフリカツメガエル卵母細胞内への化合物の取り込みを常法により測定した。

(2)-3 遊離肝細胞による肝取り込みの測定

1. ラット肝のコラゲナーゼ還流により、遊離肝細胞を得た。
2. 常法に従い、各試験化合物の肝細胞内取り込みを測定した。

(2)-4 RAF (Relative Activity Factor)法による各OATP/oatp分子の寄与率評価。

輸送活性を有していた輸送体の中でヒト OATP1B3ならびにラット oatp1a4について、その選択的基質である CCK8 や estrone3-sulfateを基準化合物として用い、常法に従って、各輸送体の全肝取り込みに対する寄与率を推定した。ヒトについては市販の凍結肝細胞を用いてみかけの肝とりこみ活性を評価した。

4. 研究成果

多様な薬物の中で、肝細胞への取り込みが OATP トランスポーターを介していることが推定される医薬品に着目した。中でも胆汁中移行性・肝動態が多様な一連の化合物として -ラクタム抗生物質を考えた。本抗生物質誘導体中에서도著しく胆汁中移行性が高いナフシリンに着目し、そのラットならびにヒト肝細胞で関与する OATP トランスポーター分子の同定を行った。具体的には、ヒト凍結肝細胞、初代培養ラット肝細胞、各種ヒト OATP ならびにラット Oatp 分子発現系を用いた in vitro 実験系での検討を行なった。

その結果、ヒトにおいては OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 など複数の OATP 分子がナフシリン輸送に働いたが、RAF 法や選択的阻害剤を用いた評価によっては、OATP1B3 の寄与率が 50%以上、OATP1B1 が 25%程度と推定された。

一方、ラットについては Oatp1a1, 1a4, 1b2 が肝細胞で働いており、同じく RAF 法を用いた解析では oatp1a4 が 90%程度の寄与を有していることが推定された。

さらに、ラットにおいては in vivo での体内動態解析を行なった。選択性のある阻害剤としてリファンピンをを用いた。リファンピンは Oatp1a4 を高親和性で阻害するためナフシリンと併用投与により選択的に Oatp1a4 活性が阻害される条件を見出した。その結果、ナフシリンの肝動態は、リファンピンにより大きく変動した。特に、肝固有クリアランスの低下は大きく、この現象は Oatp1a4 がナフシリンの体内動態に大きく寄与することを裏付けるものであった。

以上より、ヒト OATP1B3 とラット Oatp1a4 がナフシリン動態に最も寄与が大きいヒトおよびラット分子であることが示された。

そこでこの対応性について一般化のために、他の β -ラクタム抗生物質への応用性について考えた。ナフシリン以外に胆汁中排泄率の異なる 10 種類程度の β -ラクタム抗生物質について輸送性を測定した。その結果、一部を除いてヒト OATP1B3 とラット Oatp1a4 によって輸送され、その輸送効率のランクオーダーは、両トランスポーターで一致するものであった。

アミノ酸配列的にはラット Oatp1a4 とヒト OATP1B3 は高くなく、種間での対応付けのためには輸送体の構造のみならず機能的側面の解析を含める必要のあることが明らかになった。

このような種間対応付けは一連の化合物ごとに一定の傾向が示されると考えられ、今後の肝動態の種差を克服するためには、輸送体分子の対応付けを機能的側面からも行なう必要性を示すことに成功した。これらの成果は今後の医薬品開発に活用できる情報になると期待できるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

玉井郁巳、動態における薬物トランスポーターの役割、消化管と肝臓、(株)メディカルドゥ、2009年。(査読無し)。

Nakakariya M., Shimada T., Irokawa M., Maeda T., Tamai I. Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of β -lactam antibiotics. *Drug Metab. Pharmacoki.* **23**(5):347-355 (2008). 査読あり。

Fukuda H., Ohashi R., Tsuda-Tsukimoto M., Tamai I. Effect of plasma protein binding on in vitro-in vivo correlation of biliary excretion of drugs evaluated by sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 1275-1282 (2008). 査読あり。

Maeda T., Yotsumoto T., Oyabu M., Tamai I., Effect of glucocorticoid receptor ligand dexamethasone on the expression of the organic cation transport in rat liver. *Drug Metab. Pharmacoki.*, **23**(1), 67-72 (2008). 査読あり。

Nakakariya M., Shimada D., Koibuchi H., Irokawa M., Iwanaga T., Yabuuchi H., Maeda T., Tamai I. Characterization of Oatp-mediated hepatic uptake of nafcillin, a high biliary excretion type of β -lactam antibiotics. *Pharm. Res.*, **25**(3): 578-585 (2008). 査読あり。

Tani, T., Gram, LK., Arakawa, H., Kikuchi, A., Chiba, M., Ishii, Y., Steffansen, B., Tamai, I. Involvement of organic anion transporting polypeptide 1a5 (Oatp1a5) in the intestinal absorption of endothelin receptor antagonist in rats. *Pharm. Res.*, **25**:1085-1091 (2008). 査読あり。

[学会発表](計6件)

Yasushi Morohashi, Taiki Shimada, Yuta Shibue, Yoshiyuki Shirasaka, Yukio Kato, Ikumi Tamai. ROLE OF ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDE 1A4 IN HEPATIC UPTAKE OF NAFCILLIN IN RATS., 日本薬物動態学会, 2008.10.31、熊本。

玉井郁巳、トランスポーターと創薬:

メジャーをおさえてニッチで攻める、日本薬物動態学会、2008.11.1、熊本。

Ikumi Tamai, _____ Drug-induced Inhibition and Activation of

Physiological Transporters.
Asian-Pacific ISSX Meeting、2008.5.10,
Shanghai, China.

玉井郁巳、有機アニオントランスポーター
を利用した医薬品の吸収・組織移行最適化と
薬効標的への応用、日本 DDS 学会、2008.6.29、
東京。

吉田憲司、中村利通、白坂善之、玉井郁巳、
Sandwich culture を評価系として用いた肝ト
ランスポーター活性可視化に関する研究。第
128 回日本薬学会年会
2008.3.28、横浜。

Masanori Irokawa, Taiki Shimada,
Masanori Nakakariya, Yoshiyuki Shirasaka
and Ikumi Tamai, Comparison of Hepatic
Uptake of Beta-Lactam Antibiotics
Mediated by OATP Transporters between Rat
and Human. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用
シンポジウム、2007.11.27 (仙台)。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~doutai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号: 20155237

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

白坂 善之 (SHIRASAKA YOSHIYUKI)

金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 60453833