

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08069

研究課題名(和文)小腸有機カチオントランスポーターの構造・機能解析

研究課題名(英文)Functional and structural analyses of organic cation transporter in the intestine.

研究代表者

橋本 征也 (Hshimoto, Yukiya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：90228429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小腸の有機カチオントランスポーターの基質特異性を評価するため、ヒト腸由来LS180細胞における12種類の化合物の取り込みを測定した。その結果、取り込みは化合物の脂溶性と正の相関を示し、極性表面積と負の相関を示すことが明らかとなった。

小腸に高発現している機能が未知なSLC22A15, 17, 23を腎由来LLC-PK1またはMDCK細胞に強制発現させて、キニジンの輸送活性を測定した。その結果、キニジンの輸送活性の上昇は認められず、SLC22A15, 17, 23は、小腸の有機カチオントランスポーターではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the substrate specificity of organic cation transporter in the intestine, we examine uptake of 12 cationic compounds in human intestinal LS180 cells. As the results, the uptake was positively correlated with lipophilicity, and negatively correlated with polar surface area of drugs.

Orphan SLC22A15, 17, and 23 were expressed considerably in the intestine. We over-expressed these genes in renal LLC-PK1 or MDCK cells. However, the transport activity of quinidine was not increased in renal cells, suggesting that SLC22A15, 17, and 23 are not the organic cation transporter in the intestine.

研究分野：薬物動態学

キーワード：小腸薬物吸収

1. 研究開始当初の背景

医薬品を適正に使用するにあたっては、薬物血中濃度と薬効・副作用の関係を定量化するとともに、薬物動態変動機構を明らかにし、患者個々に投与設計を行うことが必要である。申請者は、平成12年の臨床薬学専攻の新設に伴う研究室の立ち上げ以来、「薬物動態と薬効・毒性の基礎と臨床、特に疾患・薬物併用・遺伝的多型に伴う薬物代謝酵素とトランスポーター機能の変動機構の解析、およびそれらに基づく薬物個別投与設計に関する研究」のテーマで仕事を進めてきた。当初筆者は、小腸や肝臓で初回通過代謝を受けたり、代謝酵素に遺伝的多型が存在する、あるいは薬物間相互作用が多発するなど、薬物動態の変動が大きい肝代謝型薬剤の個別投与設計に重点をおいて、基礎および臨床研究を進めてきた。

一方、腎排泄性薬剤の腎クリアランス (CL_r) は、クレアチニンクリアランス (CL_{cr}) を指標として簡便に計算可能 (CL_r=a・CL_{cr}) であり、一般的に静脈内投与後の血中濃度予測性も比較的良好である。核酸類似構造を有する免疫抑制薬ミゾリピンは、水溶性が高く単純拡散では脂質二重膜を透過できないが、Concentrative Nucleoside Transporter (CNT) と Equilibrative Nucleoside Transporter (ENT) を介して効率的に消化管上皮細胞を透過する。そして、経口投与後に体内に吸収されたミゾリピンは、血漿蛋白結合や代謝を受けず、殆ど全てが未変化体として腎臓から尿中に排泄されるため、患者の腎機能の個体差がミゾリピンの体内動態変動の主要因と考えられてきた。しかし筆者らは、2011年から2013年にかけて、成人および小児腎移植患者における経口免疫抑制薬ミゾリピンの体内動態に極めて大きな個体差があることを明らかにし、その主要因は消化管吸収率 (バイオアベイラビリティ) の個体差であることを解明した。

他方筆者らは、1999年に有機カチオン性の薬物であるジフェンヒドラミンが、培養腸上皮細胞 Caco-2 ヘプロトンとの対向輸送で取り込まれることを報告した。その後2010年までに、別のヒト腸上皮細胞 LS180 にも同一のトランスポーターが存在し、キニジンやプロカインアミド等のカチオン性薬物を輸送することを明らかにした。しかし当時は、このトランスポーターの臨床薬理学的な重要性は認識できていなかったため、機能解析は十分とは言えず、分子種の同定を試みるにも至っていなかった。

ミゾリピンと同様に、受容体遮断薬ピソプロロールも肝初回通過代謝を殆ど受けず、大半は腎臓から排泄される。そのため筆者らは、ピソプロロールの経口クリアランス (CL/F) をクレアチニンクリアランス (CL_{cr}) の関数として記述する母集団動態解析を2005年に報告したが、原因が不明な CL/F の大きな個体間変動が残存することに疑問を

持っていた。後日、ミゾリピンと同様にピソプロロールの消化管吸収も健常被験者では良好と報告されているが、実際の患者では不完全な可能性があるとの仮説を立て、循環器疾患患者を対象とした臨床薬物動態試験を2013年に追加・実施した。そして、臨床薬物動態データの母集団解析を行い、ピソプロロールの CL/F と見かけの分布容積 (V/F) の間に強い正の相関が観察されることを確認した。この知見は、ピソプロロールのバイオアベイラビリティ (F)、すなわち消化管吸収率の個体差が、体内動態の個体差の要因であることを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、まず小腸の有機カチオントランスポーターの基質認識特性を評価した。また、小腸の有機カチオントランスポーターの構造を明らかにする目的で、蛋白分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

Caco-2 細胞に比べて培養期間が大幅に短くてすむ LS180 細胞を用いて、小腸の有機カチオントランスポーターの基質認識特性を評価した。即ち、12種類のカチオン性薬物 (celiprolol, acebutolol, procainamide, pindolol, bisoprolol, metoprolol, flecainide, clonidine, pyrilamine, quinidine, propranolol, verapamil) の LS180 細胞への取り込み活性をジフェンヒドラミン存在、あるいは非存在下で測定した。そして、ジフェンヒドラミン感受性の薬物の取り込みと薬物の種々の物理化学的特性 (脂溶性、極性表面積、分子容積、分子屈折率、分極率) との相関を解析した。

小腸の有機カチオントランスポーターの蛋白分子の同定を試みるため、SLC22A ファミリーに着眼し、機能が未同定なトランスポーターの小腸細胞における発現量を測定した。その際、標的トランスポーターの絞り込みの効率を上げるため、Caco-2 細胞と LS180 細胞に加え、ヒト腸 HT-29 細胞と市販のヒト腸組織における SLC22A 各トランスポーター遺伝子の発現量を測定した。そして、全ての小腸細胞で発現量が比較的高いとして絞り込んだ幾つかのトランスポーター遺伝子を、腎臓由来の MDCK あるいは LLC-PK1 細胞に導入した。遺伝子導入 MDCK あるいは LLC-PK1 細胞におけるキニジンの取り込み活性の増加を測定した。

4. 研究成果

12種類の薬物の LS180 細胞への取り込み活性と分子容積、分子屈折率、および分極率の間には有意な相関は認められなかった。一方、薬物取り込みと脂溶性の間には有意な正の相関が認められた。また、薬物取り込みと極性表面積の間には有意な負の相関が認められた。重回帰分析を行ったところ、脂溶性と

極性表面積は、独立して薬物の小腸吸収に寄与していることが明らかとなった（雑誌論文#8）。

Caco-2, LS180, および HT-29 細胞には、SLC22A15, 17, 23 分子種が共通して比較的多量に発現していることが明らかになった。これはヒトの小腸組織でも同様であった。そこで、これらの分子種の遺伝子を MDCK あるいは LLC-PK1 細胞に導入したところ、何れの分子種の mRNA 量は顕著に増加した。しかし、遺伝子導入細胞におけるキニジンの取り込みには、有意な増加が観察されなかった。従って、SLC22A15, 17, 23 分子種は、小腸の有機カチオントランスポーターの実体とは異なるものと推定された。

一方、遺伝子を導入しない MDCK, あるいは LLC-PK1 細胞においても内因性にキニジンの有意な取り込み活性が認められたことから、腎尿細管にも有機カチオントランスポーターが発現し、薬物の腎排泄に関わる可能性があると考え研究を追加した。その結果、MDCK 細胞におけるキニジンの取り込みは、細胞外 pH に依存的であり、NH₄Cl の前処理による細胞内酸性化により有意に増加した。キニジンの取り込みは、低温化で顕著に低下し、脂溶性有機カチオンの併用によって有意に減少した。従って、腎臓の上皮細胞においても、小腸と同様にプロトンと有機カチオンの対向輸送系が発現していると考えられた。また、細胞内から細胞外へのキニジンの輸送にもこの輸送系が関与することから、有機カチオンの尿細管分泌に関わる可能性が示唆された（雑誌論文#3）。

さらに、LLC-PK1 細胞におけるキニジンの取り込みと排出特性は、MDCK 細胞とほぼ同様であった。また、LLC-PK1 の単細胞シートを用いたキニジンの取り込み実験から、有機カチオントランスポーターは、側底膜側より長足膜側に多く発現していると考えられた。さらに、ピソプロロールをモデル薬物として、ラットにおける腎クリアランス (CL_r) を評価したところ、糸球体濾過速度 (CL_{cr}) の約 6 倍であり、静脈内 NaHCO₃ 注入による尿のアルカリ化によって、ピソプロローの CL_r は有意に減少した。従って、尿細管に発現する有機カチオントランスポーターは、薬物の分泌に関わるものと推定された（雑誌論文#1、学会発表#2）。さらに、キニジンの輸送活性は、ヒト腎臓由来の HEK293 細胞においても認められたことから、動物種を超えて腎臓に有機カチオントランスポーターが発現しているものと考えられた（学会発表#6）。

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 8 件)

1) Matsui R., Hattori R., Usami Y., Koyama M., Hirayama Y., Matsuba E., Hashimoto Y.

Functional characteristics of a renal H⁺/lipophilic cation antiport system in a porcine LLC-PK1 cells and rats. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **33**, 96-102 (2018). 査読有

2) Nagai T., Uemura O., Kaneda H., Ushijima K., Ohta K., Gotoh Y., Satomura K., Shimizu M., Fujieda M., Morooka M., Yamada T., Yamada M., Wada N., Hashimoto Y. The true distribution volume and bioavailability of mizoribine in children with chronic kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.*, **21**, 884-888 (2017). 査読有

3) Fukao M., Kondo E., Nishino H., Hattori R., Horie A., Hashimoto Y. Presence of an H⁺/quinidine antiport system in Madin-Darby canine kidney cells. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **41**, 819-824 (2016). 査読有

4) Kaneda H., Shimizu M., Ohta K., Ushijima K., Gotoh Y., Satomura K., Nagai T., Fujieda M., Morooka M., Yamada T., Yamada M., Wada N., Takaai M., Hashimoto Y., Uemura O. Population pharmacokinetics of mizoribine in pediatric patients with kidney disease. *Clin. Exp. Nephrol.*, **20**, 757-763 (2016). 査読有

5) 松葉映美, 宇佐美陽平, 服部龍太郎, 深尾美紀, 橋本征也. バイオアベイラビリティの個体差を考慮した母集団薬物動態解析の有用性評価 (2). *医療薬学*, **42**, 809-816(2016). 査読有

6) 松葉映美, 服部龍太郎, 大久保翔悟, 深尾美紀, 橋本征也. バイオアベイラビリティの個体差を考慮した母集団薬物動態解析の有用性評価. *医療薬学*, **42**, 408-415 (2016). 査読有

7) 吉田慧悟, 坂井友里絵, 深尾美紀, 橋本征也. ナトリウム非摂取時におけるミゾリビンの消化管吸収機構. *医療薬学*, **42**, 129-134 (2016). 査読有

8) Ishida K., Horie A., Matsuba E., Watanabe Y., Fukao M., Hashimoto Y. Importance of lipophilicity and polar surface area of compounds on the transport activity of intestinal H⁺/tertiary amine antiporter. *Jap. J. Pharm. Health Care Sci.*, **41**, 236-243 (2015). 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Hattori R., Usami Y., Matsuba E., Hashimoto Y. Evaluation of usefulness of population pharmacokinetic analysis considering interindividual variability of bioavailability (2). 32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017, November 29-December 1.

2) Matsui R., Hattori R., Usami Y., Koyama

M., Hirayama Y., Matsuba E., Hashimoto Y.
32nd JSSX Annual Meeting in Tokyo, 2017,
November 29-December 1.

- 3) 松葉映美, 松井隆太郎, 西野博喜, 小山真澄, 橋本征也 腎上皮 LLC-PK1 細胞およびラットにおける H⁺/脂溶性カチオン対向輸送機構. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25-27 日, 仙台.
- 4) 松葉映美, 服部龍太郎, 大久保翔悟, 深尾美紀, 橋本征也 バイオアベイラビリティの個体差を考慮した母集団薬物動態解析の有用性評価. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13-15 日, 松本.
- 5) 坂井友里絵, 深尾美紀, 橋本征也 バイオアベイラビリティの個体差を考慮したミゾリピンの母集団動態解析. 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 21-23 日, 横浜.
- 6) 近藤栄里, 大久保翔悟, 松葉映美, 深尾美紀, 石田和也, 橋本征也 ヒト腎上皮 HEK293 細胞におけるキニジンの輸送機構. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会, 2015 年 11 月 15 日, 富山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 征也 (HASHIMOTO, Yukiya)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)
研究者番号: 9 0 2 2 8 4 2 0