

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08082

研究課題名(和文) 活性化好中球を標的とした薬物送達システムの開発

研究課題名(英文) Development of a drug delivery system targeting activated neutrophils

研究代表者

井上 勝央 (INOUE, KATSUHISA)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分化型HL-60細胞における顆粒膜は、リソソーム膜と類似の性質を示し、刺激応答によるexocytosisにより細胞膜と融合することが示された。細胞膜におけるトランスポーター発現量を高感度かつリアルタイムに定量するために、OAT1を介したD-luciferin-luciferase反応による化学発光を利用したD-luciferinの輸送評価系を構築した。リソソームにOAT1を特異的に発現させることで、炎症刺激シグナルにより惹起されるexocytosisを介したリソソームの細胞膜との融合を定量できる可能性を示した。薬物送達の分子標的としてリソソームトランスポーターを利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the properties of granule membrane present in differentiated HL-60 cells were similar to those of lysosomes in most types of cells, and stimulus response with ionomycin resulted in exocytosis of granules to fuse with plasma membrane. In order to quantify the expression level of transporter in plasma membrane with high sensitivity real-time monitoring, we established the system to image bioluminescence derived from D-luciferin-luciferase reaction via OAT1 transport of D-luciferin. This system with the expressing of OAT1 in lysosomes could allow to quantify their fusion to plasma membrane, and provide the possibility of drug delivery via lysosomal transporters.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター リソソーム 化学発光 D-ルシフェリン

1. 研究開始当初の背景

2000年にヒトゲノムが解読されて以来、その情報を利用した新しい創薬が加速している。従来の創薬では、天然由来の薬理活性物質や既存の治療薬をリード化合物として膨大な種類の候補化合物を合成し、活性スクリーニングを行うことで医薬品の創製を行ってきたが、現在では、標的となる酵素、レセプター及びシグナル伝達タンパク質に対して特異的に作用する「分子標的薬」の創出が推進されている。本手法により開発された医薬品は、特定分子との相互作用が最適化されているため、用量を最小にすることで薬理的副作用の発現を最小限に抑制できるものと期待されているが、その体内分布は従来と同様に全身循環系を介して行われるため、薬物は治療標的以外の組織・臓器へも分布することができ、依然、予期せぬ副作用が起こるリスクを孕んでいる。したがって、より安全で効果的な薬物治療を行うためには、薬効の標的化に加え、薬物の体内動態特性を最適化する必要がある。

薬物投与の最適化を目指したアプローチは、ドラッグデリバリーシステム(DDS)として創薬に応用されている。しかし、その成功例の多くは、製剤学的な投与剤形の開発や分子修飾した高分子薬物の利用が主体であり、DDSのコンセプトをドラッグデザインに適用した低分子化合物はほとんど見あたらない。その要因として、全身投与を目的とした薬物の分布を制御することは極めて困難であること及びその制御を目的としたドラッグデザイン自体が創薬段階で行われてこなかったことが挙げられる。

これまでの研究により、体内での薬物の組織分布や排泄過程に、細胞膜に存在するトランスポーターが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。特に、腎臓、肝臓及び脳への薬物の移行には、SLCファミリーに分類される有機アニオン・カチオントランスポーターやABCファミリーなどの「薬物トランスポーター」と呼ばれる分子群が関与することが示されている。これらの薬物トランスポーターは、基質特異性が比較的低いため、多種多様な化学構造を認識でき、様々な薬物の組織分布への関与が期待される。しかし、発現部位が肝臓や腎臓に限局しているため、それら以外の特定の治療標的部位へのDDSにおいては利用不適であり、むしろ回避することが望ましいと考えられる。したがって特定部位へ薬物を効率よく送達させるためには、標的部位での発現が高く、通常組織での発現が低い薬物トランスポーターを利用することが効果的である。例えば、患部や炎症時において誘導するトランスポーターを同定し、その基質となる医薬品を創出することで部位特異的なDDSが可能になる。しかし、このような特性を有する薬物トランスポーターは現在のところ知られていない。

一方、現在までに機能同定されたトランス

ポーターは約400種程度であり、未だ機能不明のトランスポーター様タンパク質が約500種以上存在することが指摘されている(BMC Biol, 7, 50, 2009)。これらの多くは細胞内小器官の局在であると推測されるが、それらの分子群から部位特異的な発現・機能誘導されるものを同定できれば、上述のDDSに適応可能であると考えられる。

最近、細胞内小器官の一部であるリソソームにおいて、細胞刺激シグナルがexocytosisを促進し、リソソームの内容物を細胞外に放出すると共に、LAMP1(リソソームのマーカータンパク質)を細胞膜に局在化することが報告された(Dev Cell, 21, 421-30, 2011)。この知見は、外的刺激によりリソソームが細胞膜へ移動し、リソソームに存在する膜タンパク質群が細胞膜に局在化する可能性を示唆している。リソソームと類似の特殊細胞内小胞を有する細胞として、好中球などの顆粒球がある。好中球は、炎症性の刺激により活性化され、細胞内の顆粒を細胞外に放出する。ここで、顆粒球をリソソームに置き換えて考えると、好中球に存在するリソソームタンパク質は炎症性シグナルに応じて、細胞膜に露出されることになる。これらタンパク質にはトランスポーターも含まれることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、炎症部位への薬物送達を可能にする方法論を確立するため、活性化刺激によるリソソーム膜タンパク質の細胞膜局在化に着眼し、そのタンパク質分子群に含まれるリソソームトランスポーターの細胞膜への移行性の評価及びその利用可能性について検討した。

3. 研究の方法

リソソームでの発現が予想されるトランスポーター様タンパク質群を網羅的にクローニングし、それらを蛍光タンパク質(GFP)と融合させたcDNAを哺乳類発現系ベクターに組み込み、細胞に一過性発現させ、GFPの細胞内局在を蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡により評価した。

各種細胞におけるリソソームマーカーであるLAMP1の局在は、LAMP1抗体/蛍光標識二次抗体を用いて観察した。

細胞膜を介したD-luciferin(D-luc)の輸送現象を可視化するために、D-lucの発光酵素であるヒカリコメツキムシルシフェラーゼ(eLuc)を安定発現させたHEK293細胞(HEK293/eLuc細胞)を作製した。本細胞に各種トランスポーターを発現させ、D-luc存在下における化学発光を測定した。

4. 研究成果

(1) HL-60における刺激応答性リソソームexocytosisとリソソームに発現するトランスポーター分子の同定

好中球への分化能を有するヒト骨髄性白血球細胞 HL-60 細胞を用い、刺激応答によるリソソームの exocytosis について検討した。HL-60 細胞を DMSO 処理し、好中球様細胞へ分化誘導したのち、PKC 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate 及びカルシウムイオノフォアである ionomycin で処理することにより、脱顆粒が認められ、その際、リソソームマーカーである LAMP1 の細胞膜への局在が確認された。このことから、分化型 HL-60 細胞における顆粒膜はリソソームと同様に刺激応答により exocytosis が起こり、リソソーム膜が細胞膜と融合することが示された。

リソソームでの局在が示唆されている各種トランスポーター群について、分化型 HL-60 細胞における発現を RT-PCR 法により確認したところ、SLC46A3、Pqlc2、MFSD1 及び TMEM63A の発現が認められた。そこで、これら遺伝子の cDNA をクローニングし、GFP 融合タンパク質として HEK293 細胞に発現したところ、これらすべての細胞内局在は細胞内のリソソームであることが示された。

これらの結果より、炎症刺激等において好中球のリソソームに発現するトランスポーターは細胞膜へ移行し、その基質化合物の取り込みに関与できる可能性が示唆された。

一方、分化型 HL-60 細胞において発現が認められた SLC46A3、Pqlc2、MFSD1 及び TMEM63A の輸送基質を同定するため、これらを HeLa 細胞に一過性発現させ、exocytosis を惹起した条件下において様々な化合物の輸送評価を行ったが、その輸送活性は検出されなかった。

(2) 化学発光を利用した有機酸輸送系の高感度検出法の開発

上記の検討により、本研究を遂行していくためには、リソソームトランスポーターの細胞膜局在化及びその機能を高感度に検出するための方法論の構築が必要であると考えられた。そこで、高感度かつリアルタイムな細胞膜を介した物質輸送現象を捉える方法として、D-luc-eLuc によるルシフェラーゼ反応による化学発光を利用した D-luc の輸送評価系を構築した。すなわち、eLuc を安定発現させた細胞に細胞膜非透過性の D-luc を添加し、細胞膜トランスポーターを介して細胞内へ移行した D-luc をルシフェラーゼ反応により生じる化学発光により検出するものである。本検出系に利用可能な細胞膜トランスポーターを同定するために、様々な薬物トランスポーター(OAT1、OAT2、OAT3、OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OCTN1 及び OCTN2) を HEK/eLuc 細胞に一過性発現させ、D-luc (2 μ M) 存在下における化学発光を測定した。その結果、発光強度は、OAT1 発現細胞において著しく増大した(対コントロール: 13.6 倍)。また、OAT3 においても有意な増大が認められたが、他のトランスポー

ターにおいては認められなかった。eLuc を発現していない HEK293 細胞に OAT1 を一過性に発現させ、D-luc の細胞内取り込みを評価したところ、コントロール細胞と比較して顕著な輸送活性が認められ、その K_m 値は 0.23 μ M と算出された。この値は OAT1 の生体内基質である *p*-アミノ馬尿酸の K_m 値(28.5 μ M) よりもはるかに小さいことから、D-luc は OAT1 に対して非常に高親和性の基質であり、D-luc-eLuc によるルシフェラーゼ反応を強力に増強するトランスポーターであることが示された。OAT1 が D-luc を基質として認識することは、OAT1 の典型的な基質である 6-carboxyfluorescein 取り込みに対する D-luc の阻害活性 (IC_{50} 値: 1.14 μ M) が先の D-luc の K_m 値と同等となることから確認された。

OAT1 を安定発現させた HEK/eLuc/OAT1 細胞での各濃度 D-luc 存在下における発光強度の解析より、定常状態での発光反応は濃度依存性を示し、見かけの K_m 値は 0.36 μ M と算出された。この値は eLuc に対する D-luc の K_m 値 (80 μ M) よりも、上述の OAT1 に対する D-luc の K_m 値 (0.23 μ M) に近いため、その反応における律速段階は、eLuc による D-luc の酸化反応ではなく、OAT1 による D-luc の取り込み過程であることが示唆された。また、OAT1 により増強された発光強度は、OAT1 特異的阻害剤によって用量依存的に阻害され、OAT1 介在性の発光強度に対する probenecid、mefenamic acid および telmisartan の IC_{50} 値は、それぞれ文献で報告された値と同等の 13.9 ± 2.8 、 5.43 ± 0.82 および 0.89 ± 0.16 μ M であった。したがって、OAT1 を介した D-luc-eLuc 反応によるルシフェラーゼ反応は、細胞膜上に発現する OAT1 に依存して発光強度が増強することが示唆された。

(3) OAT1 を介した D-luc-eLuc 化学発光反応を応用したリソソーム膜タンパク質の細胞膜局在化の評価法の開発

上述の検討により、eLuc を発現した細胞における D-luc の取り込みは、細胞膜に発現する OAT1 の発現量に依存することが示された。そこで D-luc による化学発光をプローブとし、exocytosis によるリソソーム膜の細胞膜との融合を検出することを試みた。すなわち、リソソーム膜への局在化シグナルを有する LAMP1 と OAT1 との融合タンパク質(及び蛍光タンパク質 mKate) をコードする遺伝子 (mKate-LAMP1-OAT1) 発現コンストラクトを作製し、exocytosis による mKate-LAMP1-OAT1 の細胞膜への局在化及び OAT1 を介した D-luc-eLuc 反応による化学発光を検出しようとするものである。HeLa 細胞に mKate-LAMP1-OAT1 を一過性発現させ、蛍光顕微鏡により観察したところ、リソソームでの局在が示された。そこで eLuc と mKate-LAMP1-OAT1 を共発現させ、ionomycin 処理条件下における D-luc-eLuc 反応による化学発光を検出したところ、無刺激細胞に対して増加傾向が

認められた。しかし、バックグラウンドでの D-luc の細胞膜透過性が高く、mKate-LAMP1-OAT1 介在性のシグナルを高感度に検出することができなかった。今後、D-luc の細胞膜透過性が低く、刺激により exocytosis を示す宿主細胞を検索し、検討する必要性がある。

以上の研究は、リソソームトランスポーターを介した炎症部位への薬物送達の可能性を示すとともに、OAT1 を介した D-luc-eLuc 反応による化学発光を利用したリソソームの exocytosis の可視化・検出を可能にする技術を提供するものである。今後、更なる研究により、より高感度な検出システムの構築が期待される。

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5件)

Furukawa J, Inoue K, Maeda J, Yasujima T, Ohta K, Kanai Y, Takada T, Matsuo H, Yuasa H: Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep*, 5, 15057, 2015.

Yamashiro T, Ohta K, Inoue K, Furumiya M, Hayashi Y, Yuasa H: Kinetic and time-dependent features of sustained inhibitory effect of myricetin on folate transport by proton-coupled folate transporter. *Drug Metab Pharmacokin*, 30, 341 - 346, 2015.

Furukawa J, Inoue K, Ohta K, Yasujima T, Mimura Y, Yuasa H: Role of equilibrative nucleobase transporter 1/SLC43A3 as a ganciclovir transporter in the induction of cytotoxic effect of ganciclovir in a suicide gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, 360, 59 - 68 2017.

Inoue K, Molecular basis of nucleobase transport systems in mammals. *Biol Pharm Bull*, 40, 1130-1138, 2017.

Furuya T, Takehara I, Shimura A, Kishimoto H, Yasujima T, Ohta K, Shirasaka Y, Yuasa H, Inoue K: Organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6) enhances bioluminescence based on d-luciferin -luciferase reaction in living cells by facilitating the intracellular accumulation of d-luciferin. *Biochem Biophys Res Commun*, 495, 2152 - 2157, 2018.

[学会発表](計8件)

古屋貴人、竹原一成、志村明日香、岸本久直、湯浅博昭、白坂善之、井上勝央: トランスポーターを利用した bioluminescence イメージングの最適化. 第1回黒潮カンファレンス, 2016年10月23日 - 24日(千葉)

古屋貴人、竹原一成、志村明日香、岸本久直、湯浅博昭、白坂善之、井上勝央: D-Luciferin を基質とするトランスポーターの探索及び bioluminescence イメージングへの応用. 日本薬学会第137年会, 2017年3月24日 - 27日(仙台)

古屋貴人、竹原一成、志村明日香、岸本久直、湯浅博昭、白坂善之、井上勝央: D-Luciferin トランスポーターを利用した in vivo 化学発光イメージング. 日本薬剤学会第32年会, 2017年5月11日 - 13日(大宮)

古屋貴人、志村明日香、岸本久直、白坂善之、井上勝央: 各種培養細胞における in vivo イメージングを指向した D-ルシフェリントランスポーターの探索. 第12回トランスポーター研究会年会, 2017年7月8日 - 9日(仙台)

井上勝央: トランスポーターと代謝酵素の協奏的作用を利用した細胞特異的薬物ターゲティング. 第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2017年11月17日 - 18日(名古屋)

Furuya T, Shimura A, Kishimoto H, Shirasaka Y, Inoue K: Identification of D-luciferin transporters and their application for in vivo bioluminescence imaging. 日本薬物動態学会第32回年会, 2017年11月28日 - 12月1日(東京)

Inoue K: Impact of interplay between facilitated diffusion and metabolism on intracellular accumulation of purine nucleobases and their analogues. 日本薬物動態学会第32回年会, 2017年11月28日 - 12月1日(東京)

古屋貴人、志村優太、志村明日香、岸本久直、白坂善之、井上勝央: D-Luciferin の体内動態に関するトランスポーターの同定. 日本薬学会第138年会, 2018年3月25日 - 28日(金沢)

[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〕

ホームページ等

東京薬科大学薬学部薬物動態制御学教室 HP

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsudotai/>

6．研究組織

(1)研究代表者

井上 勝央（INOUE, Katsuhisa）

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315892