

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18930

研究課題名(和文)OATPの迅速機能評価系の構築及び飲食物に含まれるOATP阻害物質の検索

研究課題名(英文)Development of rapid functional assay system of OATP and screening of OATP inhibitor contained in food and drink

研究代表者

太田 欣哉(OHTA, Kinya)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：90448704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：5-carboxyfluorescein(5-CF)がOATP2B1の蛍光性プローブ基質であることを見出し、OATP2B1の迅速簡易機能評価に利用可能であることを明らかにした。5-CFを用いてOATP2B1機能に対する各種飲料の影響を評価し、コーヒー(抽出液)が強力かつ持続的な阻害活性を有することが明らかになった。この原因物質として、抽出液と同様の阻害活性を有していたコーヒー含有成分であるchlorogenic acidが示唆された。以上の結果より、OATP2B1の基質となる医薬品の服用時にコーヒーの摂取に注意が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：5-carboxyfluorescein(5-CF) was found to be a fluorescent probe substrate of OATP2B1, and it was clarified that it can be used for the quick and simple functional evaluation of OATP2B1. We evaluated the effect of various beverages on OATP2B1 function using 5-CF, and revealed that coffee (extract) has potent and sustained inhibitory activity. As a causative substrate, chlorogenic acid, which is a coffee-containing component having the inhibitory activity like the extract solution, was suggested. These results suggest that caution is required for ingestion of coffee when taking medicine which is a substrate of OATP2B1.

研究分野：薬物動態学

キーワード：OATP2B1 トランスポーター 5-carboxyfluorescein 小腸 吸収 スクリーニング 薬物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

比較的高い水溶性や、電荷を有している物質の細胞膜透過には、多くの場合トランスポーターが関与しており、栄養物質や医薬品等の体内動態(吸収・分布・排泄)におけるトランスポーターの重要性が広く認知されてきている。

トランスポーターの機能評価は、一般的には、放射性同位体で標識した基質化合物を用いたり、HPLCやLC/MS等の測定機器を用いて、対象となるトランスポーターにより輸送された基質薬物を定量することにより行われている。しかし、これらの手法では、細胞の可溶化や、細胞からの基質薬物の抽出といった測定サンプルの前処理が必要であり、さらに、1サンプルあたりの測定時間が長い(数分から数十分)ため、大量のサンプルを短時間で測定することが求められる新規の医薬品候補化合物を対象としたスクリーニング試験や、既存の医薬品間のトランスポーターでの相互作用の評価等に用いるには多くの問題点を抱えている。また、放射性同位体標識化合物を扱う場合には特別な取り扱い施設が必要となることも難点である。

代表者らは、有機カチオントランスポーターである multidrug and toxin extrusion protein(MATE/SLC47)及び organic cation transporter(OCT/SLC22)の簡便な迅速機能評価系を構築している(Yasujima T, Ohta K et al., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 715 - 721, 2010; Yasujima T, Ohta K et al., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4006 - 4012, 2011.)。同様の発想で、代表的な有機アニオントランスポーター群である organic anion transporting polypeptide(OATP/SLCO)を対象として蛍光性基質を利用した迅速機能評価系の構築に着手した。OATPには11のアイソフォームが存在し、脳、腎臓、小腸、肝臓、眼、胎盤等に発現しており、胆汁酸等の有機アニオン性物質のほか、一部の有機カチオン性物質の輸送にも関わっている。その中でOATP2B1は小腸の上皮細胞の刷子縁膜に多く発現することが知られており、生体内物質の他、多種の医薬品の吸収への関与が示唆されている。近年、このOATP2B1の基質である医薬品の吸収をフルーツジュースが阻害することが報告され、グレープフルーツ(ジュース)等に多く含まれ、CYP3A4等を阻害することが知られている naringin やその aglycone である naringenin の様なフラボノイド類がOATP2B1の輸送機能を阻害することが明らかにされている。また、OATP2B1には高親和性と低親和性の2つの基質認識部位が存在することが示唆されており、フラボノイド類によるそれぞれの基質認識部位の阻害活性は基質によって異なることが報告されているが、基質認識部位ごとの詳細な阻害メカニズム等は明らかにされておらず、OATP2B1を介した輸送メカニズムの詳細は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

代表者らは、予備的な試験により、OATP2B1が5-crboxyfluorescein(5-CF)を低pH条件下で輸送することを見出した。そこで、蛍光性基質を用い、消化管での医薬品等の吸収に関与しているOATP2B1をはじめとしたOATPsについて、薬物間相互作用の予測などに利用可能な、多検体の迅速機能評価系の構築を試みることにした。

また、上記の蛍光性基質を用いたOATP2B1の迅速機能評価系の高いスループット性を活かし、OATP2B1に対する飲食物及びその含有物質の影響を評価し、OATP2B1の基質である医薬品と飲食物との相互作用を予測に利用できる情報の集積を図ることにした。

## 3. 研究の方法

### (1) OATP 安定発現細胞の作製

イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来のMDCKII細胞に、哺乳動物発現ベクターであるpCI-neoにヒトOATP2B1及び1A2を組み込んだプラスミドを導入し、選択マーカー(抗生物質)であるG418によるセレクションを行い、OATP安定発現細胞として以後の試験に用いた。同様に、対照となるpCI-neoベクターを導入したmock細胞を作製した。

### (2) 各種蛍光性物質を対象としたOATP基質の検索

(1)で作製したOATP安定発現細胞を用いて、既に基質であることを見出ししていた5-CFの他にOATPの基質となる蛍光性の物質の検索を行った。OATPの基質になる蛍光性物質のなかで、mock細胞との蛍光強度差が最も大きいものを迅速機能評価系のプローブ基質として用いた。

### (3) 蛍光性基質を用いたOATP2B1迅速機能評価系の条件設定

蛍光性基質のOATP2B1による輸送活性が最大となる条件を設定するため、取り込み時間や細胞内取り込み実験に用いるbufferのpHやイオン組成の影響の評価を行った。

### (4) 本評価系の妥当性の検証

蛍光性基質とOATP2B1の典型的な基質であるestrone-3-sulfate(ES)の放射性同位体(<sup>3</sup>H)標識化合物のOATP安定発現細胞内取り込みに対する各種化合物(既知の基質や阻害剤を中心とした多様な化合物)による阻害の程度を比較することにより、本評価系の妥当性の検証を行った。

### (5) OATP2B1に対する各種飲料の影響の評価

OATP2B1の輸送機能に対する各種飲料の影響の評価を行い、阻害活性が見い出されたものについて、IC<sub>50</sub>値を求め、飲食物中の濃度と比較することにより、臨床的な影響の有無

についての検討を行った。さらに、阻害活性が見出された飲料中の各成分の影響についての評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種蛍光性物質を対象とした OATP 基質の検索

OATP2B1 安定発現細胞を用い、OATP の基質の多くが有機アニオン性の物質であることをふまえ、fluorescein や rhodamine の誘導体で酸性基を有するものを中心に基質の検索を行ったところ、既に OATP2B1 の基質であることを見出ししていた 5-CF が最も mock 細胞との蛍光強度の差が大きかったため、5-CF を OATP2B1 機能評価のプロブ基質として用いることとした。一方、OATP1A2 については、基質となる蛍光性物質を見出すことはできなかった。

##### (2) 5-CF を用いた OATP2B1 迅速機能評価系の条件設定

OATP2B1 安定発現細胞での 5-CF 取り込みは mock 細胞での取り込みより顕著に大きく、20 分までの線形性が確認できたため、取込時間は 10 分とした (図 1)。

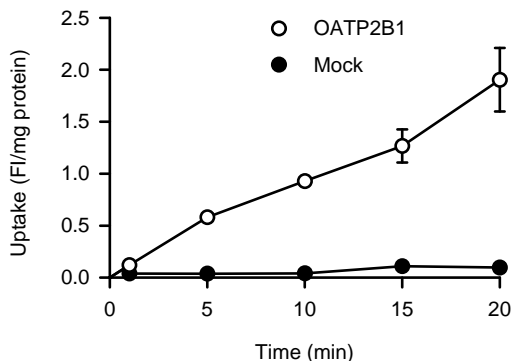


図 1. 5-CF 取り込みの時間依存性

OATP 安定発現細胞 (○) 及び mock 細胞 (●) での 5-CF (0.5 μM) の経時変化を評価した (37 °C, pH5.5)。データは平均値 ± 標準誤差 (例数 4) で示している。

また、OATP2B1 による 5-CF 取り込みの pH 依存性の検討を行ったところ、小腸管腔表面の環境と同等である pH5.5 では mock 細胞よりも OATP2B1 安定発現細胞において 5-CF 取り込みは高く、OATP2B1 の高い 5-CF 輸送活性がみられたが、pH 7.4 では両細胞での 5-CF 取り込みに差がなく、OATP2B1 による輸送活性は検出不能なレベルまで低下していた。この結果より試験は pH5.5 で行うこととした。

OATP2B1 には 2 つの基質認識部位が存在することが示唆されているため、高親和性及び低親和性の基質認識部位を仮定し、2 つの Michaelis-Menten 項の和で表されるモデル式を設定して速度論的解析を行ったところ、 $K_m$  値は  $0.703 \pm 0.127 \mu\text{M}$  (高親和性部位)

及び  $48.8 \pm 6.4 \mu\text{M}$  (低親和性部位) と得られた (図 2)。5-CF の濃度に応じた高親和性部位と低親和性部位の 5-CF 取り込みに対する寄与率及び検出感度を勘案し、高親和性部位については 500 nM、低親和性部位については 20 μM を各親和性部位の評価のための試験濃度として設定した。

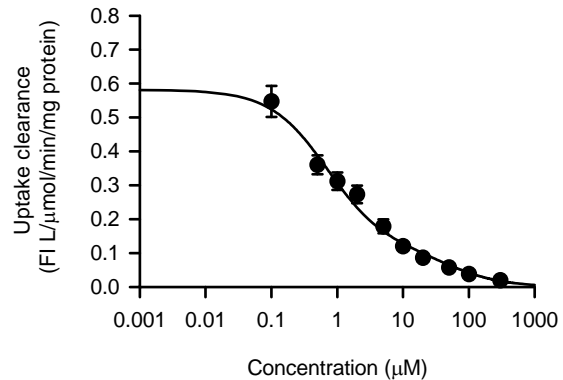


図 2. 5-CF 取り込みの濃度依存性

OATP2B1 安定発現細胞での取り込みから mock 細胞での取り込みを差し引き、OATP2B1 特異的な取り込みを平均値 ± 標準誤差 (例数 3) で示している。

##### (3) 評価系の妥当性の検証

5-CF 輸送に対する各種物質の阻害活性を、代表的な OATP2B1 基質である E-3-S 輸送に対する阻害活性と比較し、相関性を検討した。この検討では、先に設定した 5-CF の試験濃度を、 $[^3\text{H}]$ ES については 1 nM 及び 20 μM の試験濃度を用い、高親和性及び低親和性部位のそれぞれについて、各種試験物質存在下での輸送活性を評価し、比較した。その結果、高親和性部位 (図 3) 及び低親和性部位 (図 4) のそれぞれにおいて良好な相関が認められ、5-CF 輸送評価による OATP2B1 輸送機能評価の妥当性が示された。一部の物質の阻害活性については 5-CF 取り込みに対する強度と

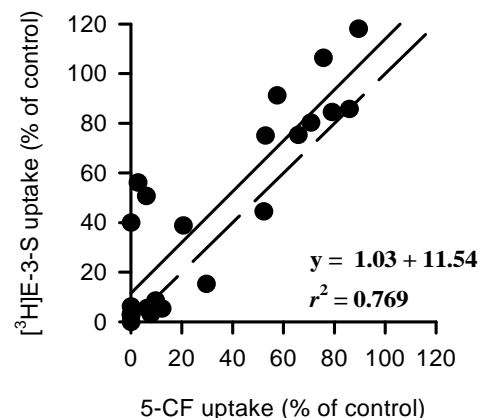


図 3. 5-CF 輸送及び ES 輸送に対する各種物質の影響の比較：高親和性部位

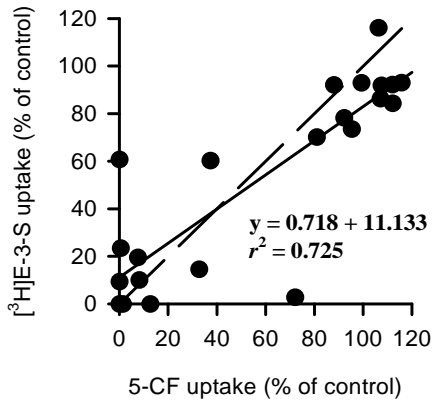


図 4. 5-CF 輸送及び ES 輸送に対する各種物質の影響の比較：低親和性部位

[<sup>3</sup>H]ES 取り込みに対する強度との間に乖離がみられたが、ほとんどの例で、5-CF 輸送に対する阻害強度が ES 輸送に対する阻害強度と比べて同等以上であったことから、false negative の阻害活性判定となる可能性は小さく、5-CF をプローブ基質として用いた本評価法は OATP2B1 阻害剤を検索するための 1 次スクリーニング法として有用であると考えられる。

#### (4) OATP2B1 輸送活性に対するコーヒー抽出液の影響

上記評価系を用い、OATP2B1 輸送活性に対する各種飲料の影響を評価したところ、コーヒー抽出液（以下、コーヒー）による強力な阻害活性がみられた（図 5）。

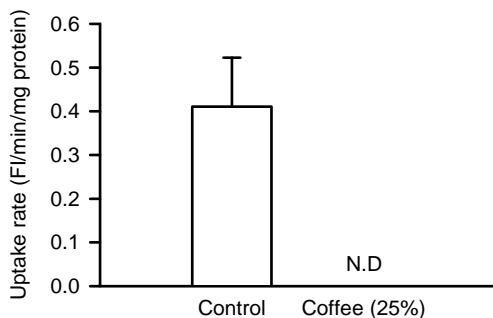


図 5. 5-CF 輸送に対するコーヒーの影響

平均値 ± 標準誤差（例数 8）で示している。5-CF (0.5 μM) 輸送をコーヒーが完全に阻害した。

コーヒーの OATP2B1 輸送活性への影響をより詳細に解析するため、[<sup>3</sup>H]ES 輸送に対する影響の評価を行った。その結果、コーヒーは OATP2B1 も高親和性及び低親和性の両部位に対して有意な阻害活性を示し、特に高親和性部位に対して強力な阻害活性を有することが明らかとなった。さらに、OATP2B1 安定発

現細胞をコーヒーにあらかじめ暴露させ、コーヒー除去後に [<sup>3</sup>H]ES 輸送を評価したところ、有意な阻害がみられ、コーヒーの阻害効果が除去後 2 時間以上持続することが示唆された。また、コーヒーによる阻害効果の IC<sub>50</sub> 値は 1% 未満であり、消化管内でコーヒーが希釈されても有意な阻害効果を有している可能性が示唆された。このコーヒーによる阻害効果がどの成分によるものであるか解明するため、コーヒーに含まれる各種物質について影響を評価したところ、chlorogenic acid、trigonelline、quinic acid が強力な阻害活性を有しており、特に chlorogenic acid はコーヒーに含有されていると想定される濃度域において強力な阻害効果を示したことから、コーヒーによる OATP2B1 阻害活性の主たる原因物質は chlorogenic acid であると考えられる。

#### (5) まとめ

5-CF を用いることで、OATP2B1 の迅速な簡易機能評価が可能であることを明らかにした。また、コーヒーが OATP2B1 機能を強力に阻害することを見出し、OATP2B1 の基質である医薬品の吸収に影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。この知見は薬物療法の最適化のための基盤情報になると考えられる。今後、OATP2B1 の基質の吸収に対するコーヒーの影響が個体レベルで明らかにされることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

渡辺理奈, 保嶋智也, 太田欣哉, 湯浅博昭  
蛍光基質利用による OATP2B1 に対するフラボノイド類の即時性作用の解析  
日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日 (仙台)。

中村恭子, 関口裕太郎, 保嶋智也, 太田欣哉, 湯浅博昭  
消化管における各種医薬品の吸収を担う OATP2B1 に対するコーヒーの影響。  
日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 2016 年 10 月 30 日 (岐阜)。

関口裕太郎, 太田欣哉, 保嶋智也, 井上勝央, 湯浅博昭

Characterization of OATP2B1-Mediated Transport of 5-Carboxyfluorescein for its Utilization for Fluorometric Rapid Assessment of the Functionality of OATP2B1.

日本薬物動態学会第 30 回年会, 2015 年 11 月 12-14 日 (東京)。

中村恭子, 太田欣哉, 保嶋智也, 湯浅博昭

OATP2B1 に対するコーヒーの影響。  
第 10 回トランスポーター研究会年会，  
2015 年 6 月 20-21 日（東京）。  
関口裕太郎，太田欣哉，保嶋智也，井上  
勝央，湯浅博昭  
蛍光基質を用いた OATP2B1 迅速機能評価  
系での二相性輸送の評価。  
日本薬剤学会第 30 年会，2015 年 5 月 21-23  
日（長崎）。

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

太田 欣哉 (OHTA Kinya)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：9 0 4 4 8 7 0 4