

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06745

研究課題名(和文) 選択的メタボロミクスによる有機カチオン膜輸送体の生体内基質同定と生理的機能の解明

研究課題名(英文) Searching for endogenous substrates of organic cation transporters by selective metabolomics

研究代表者

増尾 友佑 (Masuo, Yusuke)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：90708140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜輸送体OCT1/SLC22A1は、OCT1基質薬の体内動態を規定する因子の一つである。本研究は、OCTs阻害剤の投与で変化する内因性基質を探査し、OCTs輸送機能を反映したバイオマーカーとしての有用性を確立することを目的とした。OCTs阻害剤を投与したマウスの血漿において、acylcarnitines濃度が上昇した。In vitroにおいて、OCT1がacylcarnitineの排出輸送に関与することが示唆された。血漿中acylcarnitinesは、OCTs阻害のバイオマーカー候補であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜輸送体OCTsの輸送機能は、先天的・後天的な要因で個人差があり、輸送機能をin vivoで個人毎に予測することは、薬物治療上重要である。OCTsの生体内基質は、その血漿中濃度を測定することで、薬物相互作用または個人差に起因するOCTs輸送活性の変化をin vivoで予測可能にし、OCTs基質薬による適切な薬物治療を可能にする。本研究で同定したバイオマーカー候補として、血漿中acylcarnitine濃度は、薬物相互作用予測や、機能変化時の適切な基質薬の投与量設計に応用できる。

研究成果の概要(英文)：Organic cation transporters (OCTs) are involved in hepatic and renal distribution of various substrates, and may be primarily involved in pharmacokinetics of some substrate drugs. The aim of the present study is to search endogenous OCTs substrates. According to the untargeted metabolome analysis, plasma concentration of some acylcarnitines in OCT's inhibitors treated mice were higher than that in vehicle-treated mice. Efflux of acetylcarnitine was also observed in from oocytes expressing OCT1. Thus, acylcarnitines were presumably endogenous OCT1 substrates although the role of OCTs in their tissue distribution should be further evaluated.

研究分野：薬物動態学

キーワード：メタボローム解析 有機カチオン膜輸送体 バイオマーカー 膜輸送体 メタボロミクス 生体内基質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜輸送体 organic cation transporter family (OCTs)には、OCT1, 2, 3/SLC22A1, 2, 3が存在し、有機カチオン化合物を輸送する。OCT1は肝臓、OCT2は腎臓、OCT3は全身でユビキタスに発現する。抗糖尿病薬 metformin は、OCT1/OCT2の基質であり、OCT1の遺伝子多型で metformin の細胞内への取り込みが低下する(*J Clin Invest.*117:1422, 2007)。OCT3は、冠動脈疾患(*Nat Genet.*41:283, 2009)、前立腺、大腸、食道がん(*Nat Genet.*40:316, 2008、*Gut.*60:799, 2011、*PNAS.*114:E4631, 2017)と関連する。OCT3の機能も基質化合物の輸送であることから、OCT3の機能変動によって、OCT3の生体内疾患関連基質の組織中濃度が変化し、重篤な疾患に関与すると示唆される。OCT1/OCT2の生体内基質として thiamine が同定されたが(*PNAS.*111:9983, 2014、*Pharm Res.*31:136, 2014)、OCT3の生体内疾患関連基質は不明である。以上、OCTsは基質薬の体内動態や疾患関連基質の輸送を介して、薬効・副作用や生体の恒常性維持に関与している。

OCTsの輸送機能は、個人間で数倍の発現量差があり、抗がん薬 dasatinib による OCT2の不可逆的阻害(*Nat Commun.*7:10800, 2016)、RNA 編集(*PNAS.*114:E4631, 2017)など、複数の要因によって変動する。先天的な遺伝子多型のみならず、後天的な要因でも OCTsの輸送機能が変動するため、OCTsの輸送機能を個人毎に予測できる手法が必要である。

2. 研究の目的

OCT1/OCT3の輸送機能は、先天的・後天的な要因で個人差があり、輸送機能を *in vivo* で個人毎に予測することは、薬物治療上重要である。OCTsの生体内基質の血漿中濃度は、*in vivo* において OCTsの機能や薬物相互作用を予測するバイオマーカーとして有用であり、本研究は、OCTs阻害剤の投与で血漿中濃度が変化する生体内基質を探索し、OCTs機能変化のバイオマーカーとしての有用性を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスに OCTs阻害剤として tetrapentylammonium (TPeA)と imatinib を静脈内投与し、経時的に採血した。血漿サンプルおよび肝臓ホモジネートを LC-TOF-MS で網羅的に測定し、アンターゲットメタボロミクス解析を実施した。Vehicle に比べ OCTs阻害剤投与で血漿サンプル中のシグナル強度が高いピークを、OCTsの生体内基質候補とした。

HEK293細胞またはアフリカツメガエル卵母細胞に OCT1発現ベクターまたは OCT1 cRNA を導入し、OCT1発現系を作成した。発現系を OCT1基質化合物または候補化合物とインキュベーション後に、細胞内および培地中の化合物濃度を LC-MS/MS で定量し、取り込みまたは排出活性を評価した。

mOct1 に対する miRNA を発現するアデノウィルスを作成し、マウスに静脈内投与して肝臓に発現する Oct1 を knockdown 後に、候補化合物の血漿中濃度を LC-MS/MS で定量した。

4. 研究成果

アンターゲットメタボローム解析の結果、複数の acylcarnitines の血漿中濃度が、TPeA および imatinib 投与群において vehicle 群よりも高かった。マウスに OCTs阻害剤として TPeA または imatinib を投与後の acylcarnitines の血漿中濃度推移を LC-MS/MS で測定した結果、複数の acylcarnitine の血漿中濃度が、vehicle 投与群に比べ経時的に増加した。Acylcarnitines は 4級アンモニウムカチオンであるため、有機カチオンを基質とする OCT1 で輸送される可能性がある。肝特異的 *oct1*^{-/-}マウスでは、野生型よりも血漿中 acylcarnitines 濃度が高いとの報告があるものの、OCT1阻害剤投与での血漿中濃度の変動は報告がない。一方、本研究においては acylcarnitines のうち、水酸化体および長鎖 acylcarnitines の血漿中濃度が TPeA や imatinib 投与後、時間依存的に増加した。

HEK293/OCT1 で acylcarnitines は時間依存的に細胞内に取り込まれたものの、その取り込みは OCTs阻害剤で減少しなかった。Acylcarnitines は細胞内で速やかに代謝され、細胞内取り込みの評価が困難であった。そこで、細胞内での代謝活性が弱いことが示唆されるアフリカツメガエル卵母細胞において、mOCT1の発現系を構築した。mOCT1を発現系させた卵母細胞において、典型的 OCT1基質である tetraethylammonium の取り込みは、*in vivo* で用いた OCTs阻害剤(TPeA および imatinib)によって阻害されることが示された。一方、培地中に palmitoyl carnitine を添加後、acetyl carnitine の培地中への排出を mOCT1が促進することが示され、OCTsが acylcarnitines の輸送に関与することが示唆された。

mOct1 に対する miRNA 発現アデノウィルスを野生型マウスに投与すると、肝臓における Oct1 mRNA 発現が低下すること、遊離肝細胞における tetraethylammonium の取り込みが低

下したことから、in vivo で肝における Oct1 がノックダウンできたことが確認された。アデノウィルス投与後のマウス血漿サンプルにおける acylcarnitine 濃度を定量したところ、Oct1 のノックダウンしたマウスにおいて acylcarnitines の血漿中濃度は増加しなかった。Acylcarnitines の血漿中濃度への OCT1 以外の他の膜輸送体の寄与等について更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Futatsugi A, Masuo Y, Kato Y	4. 巻 110
2. 論文標題 Effects of probenecid on hepatic and renal disposition of hexadecanedioate, an endogenous substrate of organic anion transporting polypeptide 1B in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 2274-2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2021.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masuo Y, Fujita K, Mishiro K, Seba N, Kogi T, Okumura H, Matsumoto N, Kunishima M, Kato Y	4. 巻 35
2. 論文標題 6-Hydroxyindole is an endogenous long-lasting OATP1B1 inhibitor elevated in renal failure patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 555-562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama M, Nakamichi N, Yoshimura T, Masuo Y, Komori T, Ishimoto T, Matsuo J, Kato Y	4. 巻 45
2. 論文標題 Homostachydrine is a xenobiotic substrate of OCTN1/SLC22A4 and potentially sensitizes pentylentetrazole-induced seizures in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochem Res.	6. 最初と最後の頁 2664-2678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-020-03118-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi T, Masuo Y, Futatsugi A, Kato Y	4. 巻 48
2. 論文標題 Static model based assessment of OATP1B1-mediated drug interactions with preincubation-dependent inhibitors based on inactivation and recovery kinetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metab Dispos.	6. 最初と最後の頁 750-758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.120.000020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Y, Fujita KI, Takahashi T, Sunakawa Y, Ishida H, Hamada K, Ichikawa W, Tsunoda T, Shimada K, Masuo Y, Kato Y, Sasaki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Higher systemic exposure to unbound active metabolites of regorafenib is associated with short progression-free survival in colorectal cancer patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpt.1810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi T, Masuo Y, Sakai Y, Kato Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Short-lasting inhibition of hepatic uptake transporter OATP1B1 by tyrosine kinase inhibitor pazopanib	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 372-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2019.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto N, Nakamichi N, Nanmo H, Kimura KI, Masuo Y, Sakai Y, Schinkel AH, Sato S, Soga T, Kato Y	4. 巻 36
2. 論文標題 Metabolome analysis reveals dermal histamine accumulation in murine dermatitis provoked by genetic deletion of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharm Res.	6. 最初と最後の頁 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-019-2695-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwase M, Fujita KI, Nishimura Y, Seba N, Masuo Y, Ishida H, Kato Y, Kiuchi Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Pazopanib interacts with irinotecan by inhibiting UGT1A1-mediated glucuronidation, but not OATP1B1-mediated hepatic uptake, of an active metabolite SN-38	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Chemother Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 993-998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-019-03784-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Al-Shammari AH, Masuo Y, Fujita K, Yoshikawa Y, Nakamichi N, Kubota Y, Sasaki Y, Kato Y	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Influx and efflux transporters contribute to the increased dermal exposure to active metabolite of regorafenib after repeated oral administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2019.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuo Y, Ohba Y, Yamada K, Al-Shammari AH, Seba N, Nakamichi N, Ogihara T, Kunishima M, Kato Y	4. 巻 35
2. 論文標題 Combination metabolomics approach for identifying endogenous substrates of carnitine/organic cation transporter OCTN1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharm Res.	6. 最初と最後の頁 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-018-2507-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 及川夏月、増尾友佑、三代憲司、国嶋崇隆、加藤 将夫
2. 発表標題 有効腎血漿流量の評価に応用可能な生体内化合物の網羅的探索
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aya Hasan、増尾友佑、島田和弘、藤田健一、若山友彦、加藤将夫
2. 発表標題 Association between pharmacokinetics and dermal toxicology of tyrosine kinase inhibitors in a mouse model
3. 学会等名 第35回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増尾友佑、小池彩花、石本尚大、加藤将夫
2. 発表標題 高分子DNAはpyrimidine nucleosideとして消化管吸収される
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増尾友佑、島田和弘、石本尚大、加藤 将夫
2. 発表標題 チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群と表皮角化細胞への毒性との関連
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増尾友佑、加藤将夫
2. 発表標題 チロシンキナーゼ阻害薬のケラチノサイトにおける分布・毒性と皮膚障害との関連
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森永真理恵、増尾友佑、石本尚大、鎌田春彦、加藤将夫
2. 発表標題 BCRP細胞外領域に対する抗体作製を目指したBCRP発現系の最適化
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹田京佑、増尾友佑、石本尚大、加藤将夫
2. 発表標題 BCRPのin vivoでの輸送機能評価に適用可能なBCRP生体内基質の網羅的探索
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田和弘、増尾友佑、藤田健一、加藤将夫
2. 発表標題 チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群の発症機構：表皮角化細胞への毒性との関連
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Masuo, Yukio Kato
2. 発表標題 Identification of endogenous substrates of gastrointestinal inflammation-associated transporters, OCTN1/SLC22A4
3. 学会等名 The 27th Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤友美、増尾友佑、今村龍、水谷栄彦、松本邦夫、加藤将夫
2. 発表標題 妊娠高血圧症候群治療への応用を目指したヒトaminopeptidase A組換えタンパク質の体内動態解析
3. 学会等名 第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Masuo, Megumi Kato, Shiori Komura, Takahiro Ishimoto, Yukio Kato
2. 発表標題 Screening of endogenous OCTs substrates applicable for prediction of drug interactions
3. 学会等名 12th International ISSX Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増尾友佑、加藤愛、石本尚大、加藤将夫
2. 発表標題 膜輸送体OCTsのin vivoでの機能評価を目指した内因性基質の網羅的探索
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中杏奈、増尾友佑、松本建、加藤将夫
2. 発表標題 マウス単離骨髓細胞へのゲムシタピン取り込み機構の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Masuo, Yuri Ohba, Kohei Yamada, Noritaka Nakamichi, Munetaka Kunishima, Yukio Kato
2. 発表標題 Identification of Endogenous Substrates of SLC22A4 by Metabolomic Approach Based on Transporter and Structure Selective Strategies
3. 学会等名 PharmSci 360 American Association of Pharmaceutical Scientists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Masuo, Ayaka Koike, Yukio Kato
2. 発表標題 Comparison of Intestinal Absorption of Nucleic Acids: Comprehensive Quantification-based Analysis using Mass Spectrometry
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Kato, Yusuke Masuo, Yukio Kato
2. 発表標題 Screening of endogenous OCTs substrates based on in vivo inhibition studies to estimate drug interaction potential
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marie Morinaga, Yusuke Masuo, Takahiro Ishimoto, Noritaka Nakamichi, Haruhiko Kamada, Yukio Kato
2. 発表標題 Construction of neutralizing antibodies against P-glycoprotein by using antibody phage displays
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Azusa Futatsugi, Yusuke Masuo, Yukio Kato
2. 発表標題 Characterization of effect of rifampicin on disposition of endogenous OATPs substrates in rats
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro Shimada, Yusuke Masuo, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato
2. 発表標題 Cytotoxic effects of tyrosine kinase inhibitors in keratinocytes and their possible relevance to ABC transporters
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aya Hasan, Yusuke Masuo, Ken-ichi Fujita, Yutaro Kubota, Yasutsuna Sasaki, and Yukio Kato
2. 発表標題 Accumulation of active metabolite of anticancer agent regorafenib involves nonlinear hepatic distribution after repeated dose
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Taguchi, Yusuke Masuo, Yoshiyuki Sakai, Yukio Kato
2. 発表標題 Optimization of the preincubation period for assessment of OATP1B1 inhibition by preincubation-dependent inhibitors
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会・MDO国際合同学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹田京佑、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫
2. 発表標題 遺伝子欠損マウス臓器を基質源としたメタボローム解析による膜輸送体BCRPの生体内基質探索
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増尾友佑、加藤将夫
2. 発表標題 SLC22A4の生体内基質探索：基質認識特性に基づいた構造選択的メタボロミクスによるアプローチ
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域薬学系 分子薬物治療学研究室ホームページ
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関