

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07173

研究課題名（和文）抗がん剤による薬物トランスポーターの発現変動～メカニズムと薬物体内動態への影響～

研究課題名（英文）The influence of anticancer drug on the expression of transporters

研究代表者

秋好 健志（Akiyoshi, Takeshi）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・講師

研究者番号：50399143

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）：本研究では、抗がん剤イリノテカンを暴露し、重篤な消化管障害を発症させたモデルラットを用いて、当該ラットにおける薬物動態関連トランスポーターおよび内因性物質輸送トランスポーターの発現変動を、臓器横断的に解析することを目的とした。イリノテカン曝露ラットから、小腸、肝臓、腎臓を摘出した。各臓器の細胞膜画分を調製後、トリプシン消化後、サンプル中の各トランスポーター特異的ペプチド量をLC-MSMSによる絶対定量プロテオミクス解析により評価した。結果として、P糖タンパク質ほか、内因性物質輸送トランスポーターにおいても有意な発現変動が確認された。本結果は、基質薬及び内因性物質の体内動態変動を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

临床上ではイリノテカンなどの抗がん剤投与時に様々なトランスポーター基質薬が併用投与される。本研究により、イリノテカン時にはP糖タンパク質の発現、特に、小腸における発現量が有意に変動したことから、ジゴキシンやダビガトランなど临床上重要なトランスポーター基質薬の吸収量の変動が示唆される。さらに、本研究においては、内因性物質である胆汁酸の輸送に寄与するトランスポーター発現量の有意な変動も明らかになった。これらの変動は、最終的には様々な疾患発症のリスクを示唆しており、今後これらの临床上の影響の程度を評価する必要がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to evaluate the expression level of pharmacokinetics-related transporters and endogenous substance transport transporters in rats exposed to the irinotecan which caused severe intestinal damage. The plasma membrane fraction of the tissues, such as small intestine, liver, and kidney were prepared from irinotecan-exposed rats. After trypsin digestion, the expression level of each transporter-specific peptide in the samples was measured by absolute quantitative proteomic analysis using LC-MSMS. As a result, significant expression changes were observed in P-glycoprotein as well as in endogenous substance transport transporters. These results suggest that the exposure of irinotecan may affect the pharmacokinetics of substrate of transporter.

研究分野：臨床薬物動態学

キーワード：トランスポーター 抗がん剤曝露 絶対定量プロテオミクス解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発においては、ラットなど小動物を用いた候補化合物の体内動態解析は安全性評価において必須である。ヒトにおけるトランスポーター基質薬の体内動態の予測精度の向上には、ヒトと小動物間におけるトランスポーター発現量の種差を考慮する必要があるが、ラットにおけるトランスポーター分布およびその発現量に関する情報は限られている。

抗がん剤イリノテカン[®]は、重篤な副作用として消化管障害を頻発する。これは、胆汁中に排泄されたイリノテカンおよびその活性代謝物 SN-38 が、小腸上皮細胞を障害することに起因する。これまでに、イリノテカンの反復静脈内投与により消化管障害を誘発させたモデルラットにおいて、小腸における P-gp 発現量が約 5 倍に増加したことが報告されており、この P-gp 発現量の増加は P-gp 基質ダビガトランエテキシラート (DABE) の消化管吸収低下と薬効の大幅な低下を引き起こした。一方、小腸における他のトランスポーター発現量、肝や腎における各種トランスポーター発現量に対するイリノテカン曝露の影響に関する報告は限られている。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの肝臓、腎臓、小腸上皮組織におけるトランスポーター分布と発現量を網羅的に明らかにすることを目的に、mRNA の相対発現量、およびタンパク質のモル質量単位としての発現量をそれぞれ評価した。次に、それら発現量に対するイリノテカン曝露の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

既報に従い、SD 系雄性ラットにイリノテカン (60 mg/kg/day) を 3 日間反復静脈内投与することで、イリノテカン処置ラット (イリノテカン群) を作出した。Control 群には生理食塩水を投与した。各最終投与日の翌日に肝臓、腎臓、小腸 (上、中、下部) を摘出し、以下のラット肝臓、腎臓、小腸におけるトランスポーター発現量の評価に用いた。

肝臓、腎臓および小腸上皮粘膜組織の β -actin, Mdr1a, Mdr1b, Bcrp, Mrp2, Oatp1b2, Bsep, Asbt, Glut1, Pept1, Oct1, Oatp1a4, Urat1 mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法により定量した。また、肝臓、腎臓および小腸上皮粘膜組織の細胞膜画分を調製し、P-gp, Bcrp, Mrp2, Oatp1b2, Bsep, Asbt, Glut1, Pept1, Oct1, Oatp1a4, Urat1 および細胞膜マーカー Na⁺/K⁺ ATPase タンパク質発現量を、それぞれの特異的ペプチドを用いた LC-MS/MS 定量により測定した。なお、タンパク質発現量はモル質量として示す。

mRNA 発現量とタンパク質発現量の関係はスピアマンの順位相関係数 (rs) にて評価した。

4. 研究成果

本研究の結果、ラット肝臓、腎臓、小腸各部位の細胞膜上における P-gp, Bcrp, Mrp2, Oatp1b2, Bsep, Asbt, Glut1 タンパク質の臓器横断的な分布、および発現量を初めて明らかにした。さらに、トランスポーター発現量の差異をモル質量に基づいて定量したことは、特定の臓器における異なる種類のトランスポーター発現量を直接比較可能とした。これは、医薬品開発時においてヒトにおけるトランスポーター基質薬の安全性や体内動態を予測する上で重要な知見を提供する結果である。現在、Pept1, Oct1, Urat1, Oatp1a4 タンパク質の定量について検討中である。

本研究において、イリノテカン処置ラットにおける様々な遺伝子およびタンパク質発現量の

変動を明らかにした。すなわち、タンパク質発現量については、肝臓においては P-gp のみ 2 倍に有意に増加し、Mrp2 は 0.7 倍に有意に低下した。一方、腎臓ではいずれのトランスポーターも有意な変動は認められなかった。小腸上、中、下部では、P-gp, Mrp2, Glut1 はいずれも 2~3 倍に増加した一方、小腸下部の Bcrp, Asbt はそれぞれ 0.4、0.5 倍に有意に減少した。Na⁺/K⁺ ATPase は肝臓で有意に増加し小腸下部では低下した。前述の通り、これまでに、イリノテカン処置ラットにおいて P-gp 基質 DABE の消化管吸収と薬効の低下が示されており、本研究で明らかとなったトランスポーター発現量の変動は、肝臓および小腸における各種基質薬の体内動態変動を引き起こす可能性があると考えられる。

本研究において、イリノテカン曝露による mRNA 発現の変動と各タンパク質発現の変動には有意な正の相関が認められた。他方、これまでに *in vitro* においてイリノテカン曝露下、TNF α 産生に続く転写調節因子 NF- κ B の活性化を介した P-gp, Mrp2, Glut1 タンパク質の増加、または、TNF α および IL-1 β による転写調節因子 AP-1 の活性化抑制を介した Asbt タンパク質の発現抑制が報告されている。このことから、イリノテカンは主にトランスポーターの転写に影響を与えることで、タンパク質の発現量に影響を与えたことが示唆された。以上本研究は、イリノテカン投与時について、各トランスポーター基質薬の体内動態のみならず、胆汁酸など内因性物質の生体内サイクルの変動を理解するうえでも重要な知見を提供すると考える。

なお、本研究成果は、2023 年日本薬学会第 143 年会（札幌, 2023.3.25-28）にて報告した。また、本研究は、当研究室 邊田桃子修士の多大なる尽力により完遂された。ここに心より御礼申し上げる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Araki N, Morita T, Akiyoshi T, Kataoka H, Yajima K, Katayama K, Imaoka A and Ohtani H	4. 巻 0
2. 論文標題 Comparison of the inhibitory properties of the fruit component naringenin and its glycosides against OATP1A2 genetic variants.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabol Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 100464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Morita Tokio, Akiyoshi Takeshi, Tsuchitani Toshiaki, Kataoka Hiroki, Araki Naoya, Yajima Kodai, Katayama Kazuhiro, Imaoka Ayuko, Ohtani Hisakazu	4. 巻 70
2. 論文標題 Inhibitory Effects of Cranberry Juice and Its Components on Intestinal OATP1A2 and OATP2B1: Identification of Avicularin as a Novel Inhibitor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 3310 ~ 3320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.2c00065	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 Sato Ryo, Akiyoshi Takeshi, Morita Tokio, Katayama Kazuhiro, Yajima Kodai, Kataoka Hiroki, Imaoka Ayuko, Ohtani Hisakazu	4. 巻 41
2. 論文標題 Dual kinetics of OATP2B1: Inhibitory potency and pH-dependence of OATP2B1 inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100416 ~ 100416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2021.100416	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 Morita Tokio, Akiyoshi Takeshi, Sato Ryo, Uekusa Yoshinori, Katayama Kazuhiro, Yajima Kodai, Imaoka Ayuko, Sugimoto Yoshikazu, Kiuchi Fumiyuki, Ohtani Hisakazu	4. 巻 68
2. 論文標題 Citrus Fruit-Derived Flavanone Glycoside Narirutin is a Novel Potent Inhibitor of Organic Anion-Transporting Polypeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 14182 ~ 14191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.0c06132	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 Morita Tokio, Akiyoshi Takeshi, Sato Ryo, Katayama Kazuhiro, Yajima Kodai, Kataoka Hiroki, Imaoka Ayuko, Sugimoto Yoshikazu, Ohtani Hisakazu	4. 巻 35
2. 論文標題 pH-dependent transport kinetics of the human organic anion-transporting polypeptide 1A2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 220 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2019.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Tomoki, Imaoka Ayuko, Akiyoshi Takeshi, Ohtani Hisakazu	4. 巻 40
2. 論文標題 Irinotecan induced gastrointestinal damage impairs the absorption of dabigatran etexilate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6. 最初と最後の頁 315 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdd.2205	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 Han Hongye, Akiyoshi Takeshi, Morita Tokio, Kataoka Hiroki, Katayama Kazuhiro, Yajima Kodai, Imaoka Ayuko, Ohtani Hisakazu	4. 巻 47
2. 論文標題 Comparison of the transport kinetics of fexofenadine and its pH dependency among OATP1A2 genetic variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100470 ~ 100470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2022.100470	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 片岡寛樹、秋好健志、森田時生、矢島広大、今岡鮎子、片山和浩、内田康雄、寺崎哲也、大谷壽一。
2. 発表標題 定量的標的プロテオミクスを用いた変異型 OATP1A2/OATP2B1 の輸送特性の評価。
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2021/第29回クリニカルファーマシーシンポジウム。
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 稜、秋好健志、今岡鮎子、植草義徳、木内文之、片山和浩、杉本芳一、大谷壽一。
2. 発表標題 High and low affinity kinetics of OATP2B1 - Inhibitory potency and pH-dependency of inhibitors
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第 34 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田時生、秋好健志、矢島広大、今岡鮎子、片山和浩、杉本芳一、大谷壽一
2. 発表標題 Identification and characterization of a novel OATP2B1 inhibitor from citrus fruits juice
3. 学会等名 第 13 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠田桃子、秋好健志、矢島広大、土谷聡耀、今岡鮎子、大谷壽一。
2. 発表標題 ラット肝・腎・小腸組織におけるトランスポーター発現量解析とイリノテカン曝露の影響。
3. 学会等名 日本薬学会第143年会，2023.3，札幌
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------