

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16458

研究課題名（和文）細胞内薬物動態における脂肪酸結合タンパク質の役割解明に向けた分子機構解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism analysis of fatty acid-binding protein in intracellular pharmacokinetics

研究代表者

山本 篤司 (Yamamoto, Atsushi)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：90633991

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルブミンのような血液中における薬物結合タンパク質の研究は盛んに行われ、薬剤学のどの教科書にも記載されている。一方、細胞内における薬物結合タンパク質に関する研究はほとんど未開の領域である。脂肪酸結合タンパク質（fatty acid-binding protein, FABP）は細胞内において様々な薬物と結合し、その薬物動態に影響を与えていると考えられる。本研究では、FABPの薬物結合メカニズムを解き明かすためFABPの部位置換変異体を作製し、薬物結合解析を行った。また、FABPが薬物代謝に及ぼす影響を明らかにするため、FABP発現抑制実験系および代謝薬物の測定系の構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの薬物は生体内では基本的にタンパク質と結合して運搬されており、この結合は薬効発現や副作用惹起と深く関わる。本研究では、脂肪酸結合タンパク質（FABP）が細胞内における薬物動態に与える影響を解明し、細胞内薬物動態学という新たな学術分野を切り開くとともに、薬物の作用発現や副作用惹起のメカニズムをより深く理解することを目的としている。FABPの変異体解析や薬物代謝に与える実験系の構築を行い、FABPの薬物結合研究における基盤を築いた。

研究成果の概要（英文）：While the drug-binding proteins in blood plasma such as albumin have been investigated in detail, the proteins in the cells have been hardly studied. It is thought that fatty acid-binding protein (FABP) binds various drugs and affects the pharmacokinetics in the cells. In this study, we synthesized the recombinant proteins of FABP mutant and performed drug-binding analysis. To elucidate the influence of FABP on drug metabolism, we performed knockdown experiments using siRNAs against FABP1, and constructed the separation analysis of the drug metabolism.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：脂肪酸結合タンパク質 FABP 変異体解析 薬物結合 薬物代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 治療に用いられる薬物のうち、多くは水に溶けにくいという性質を有する。そのため、血液中ではアルブミンや α 酸性糖タンパク質などの血漿タンパク質が薬物と結合し、全身に運搬している。薬物のタンパク結合は薬効発現や副作用惹起に大きく関わるため、創薬研究において血漿タンパク質との結合は優先的に調査される。しかしながら、血液中における薬物結合解析は盛んに研究されているのに対し、同じ親水性環境である細胞内における薬物結合解析はほとんど行われていない。

(2) 脂肪酸結合タンパク質 fatty acid-binding protein (FABP) は約 15 kDa の小型可溶性タンパク質であり、10 種類のアイソフォーム (FABP1~9, 12) が存在する。FABP は、脂肪酸以外にも胆汁酸、ヘム、エイコサノイドなど様々な脂質と結合することができ、基質特異性が低いという特徴を有する。近年では、降圧薬フィブラートや非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) などが FABP に結合することが報告され、FABP は細胞内における薬物結合タンパク質の役割も担っていると考えられている。

(3) FABP は“脂肪酸結合タンパク質”という名前のため、多くの研究者は脂肪酸との結合解析に注目している。しかしながら、FABP は多くの組織で豊富に存在する、基質特異性が低い、様々な疎水性薬物と結合する、という特徴を有し、これらは血中に存在する血清アルブミンと類似する。血清アルブミンと結合する薬物やその結合部位、結合薬物の併用による副作用例などは薬剤学のどの教科書にも記載されている。一方、細胞内における薬物結合タンパク質は未知なことが多く、これでは体内の薬物動態を正確には理解できない。細胞内の薬物動態研究は先駆者が少なく、細胞内という閉鎖空間のため解析も困難であるが、薬理効果の向上、副作用の防止、より正確な動態パラメーターの算出を行うために取り組むべき課題であると考え、本研究に取り組むに至った。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内薬物動態における FABP の役割の解明を目指し、アミノ酸変異体解析を用いた FABP と薬物結合メカニズムの推定、FABP 発現抑制に伴う薬物代謝や薬物取込能への影響について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) FABP のリコンビナントタンパク質は、histidine タグを付加した FABP を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS で発現させ、Ni カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過により精製した。精製した FABP の濃度は、ウシ血清アルブミンを標準試料としたピシニコニン酸法により決定した。FABP と薬物との結合解析には、FABP と結合することで蛍光を発する 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) の置換反応を利用した。

(2) FABP 変異体のリコンビナントタンパク質を得るため、overlap extension PCR 法により FABP 変異体をコードする cDNA を作製した。得られた cDNA を pET3a ベクターに組み込み上述した方法によりリコンビナントタンパク質を精製した。

(3) ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は 10% FBS を含む DMEM 培地で培養し、 4×10^5 cells/well になるように 6 well plate に播種した。24 時間培養後、AGPC 法により細胞から total RNA を抽出した。抽出した RNA を cDNA へと逆転写した後、SYBR green を用いたりアルタイム PCR を行い、FABP1 などの mRNA 量を解析した。

(4) 還元型フェノフィブリン酸の合成するため、フェノフィブリン酸を MeOH に溶解した後、 NaBH_4 を 7 時間反応させた。次いで、MeOH を除去した後、残留物に HCl を徐々に加えることで白色結晶を得た。得られた粗結晶をエーテルおよびヘキサンの混合溶媒により再結晶化することで還元型フェノフィブリン酸を得た。

4. 研究成果

(1) アミノ酸変異体を用いた FABP の薬物結合メカニズム解析

10 種存在する FABP アイソフォームの内、FABP3~5 の 3 種のアイソフォームは心臓や腎臓など多くの組織で共存しているが、アイソフォーム間における役割の違いについては不明な点が多い。そこで、FABP3~5 と種々の薬物とのスクリーニング解析を行った結果、FABP4 はイブプロフェンやメフェナム酸と、FABP5 はフェノフィブリン酸やバルサルタンと選択的に結合することを見出した。FABP は 10 本の β ストランドから成る β バレル構造を形成し、N 末端側に 2 つの α ヘリックスを有する。そこで、FABP4 および 5 の α ヘリックス領域 (17Phe~36Met および

19Phe ~ 38Met) を置換した変異体 FABP α 4 β 5 および FABP α 5 β 4 を作製し、薬物結合能を評価した。その結果、 α ヘリックス領域の置換により薬物選択性の低下がみられたが、この変化は薬物種により大きく異なっていた。このことは、FABP の α ヘリックス領域が薬物認識に関与しているが、そのメカニズムは薬物種により異なることを示している。

(2) FABP の発現抑制に伴う薬物代謝および薬物取込能への影響

FABP が薬物代謝や薬物取込能に与える影響を解析するため、評価系の構築に取り組んだ。まず、FABP1 を発現しているヒト肝癌由来 HepG2 細胞における FABP1 の発現抑制を試みた。FABP1 siRNA および Lipofectamine を用いて Lipofection を行い、24 時間後の細胞から total RNA を抽出した。続いて、リアルタイム PCR 法により FABP1 の発現レベルを確認したところ、25.5% の mRNA レベルの低下が認められた。一般的な培養細胞は平面的 (単層) に増殖するのに対し、HepG2 細胞は立体的 (多層) に増殖するため、Lipofectamine が全ての細胞に行きわたらず抑制効果が不十分であったと考えた。そこで、HepG2 細胞をいったんトリプシンでバラバラにした状態で Lipofection を行った。その結果、FABP1 の mRNA レベルは 81.3% 低下し、効果的な発現抑制を行うことが可能となった。

FABP1 による薬物代謝への影響を解析するため、FABP1 の基質であるフェノフィブラート (FF) について、その代謝物を調製した。FF が脱エステル化されたフェノフィブリン酸 (FA) およびグルクロン酸抱合されたグルクロン酸抱合型 FA (GFA) は市販されているものの、FA のカルボニル基が還元された還元型 FA (RFA) は市販されていない。そこで、本学に所属する藤田快男助教の助言のもと、RFA の合成を行った。FA 48 g から再結晶化した RFA 28 g を調製し、IR および ESI-TOF-MS 解析により、純度の高い RFA であることを確認した。

続いて、FF および 3 種の代謝物 (FA、RFA、GFA) の量を正確に評価するため、HPLC による分離解析系の構築を試みた。条件検討の結果、上記の FF 関連物質を分離して検出することが可能となった。そこで、HepG2 細胞に 10 μ M FF を 24 時間作用させ、その培地中に含まれる代謝物を HPLC 解析に供した。その結果、FF が代謝され FA および GFA と考えられるピークの検出に成功した。現在、FABP1 の発現抑制が FF の代謝に与える影響について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本篤司, 篠原康雄, 大倉一人
2. 発表標題 FABPアイソフォームの部位置換が薬物選択性に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2021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
---------	---------