

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06519

研究課題名（和文）アルブミン介在肝取り込み促進機構の解明とその促進機構モデルの新展開

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism by the albumin-mediated hepatic uptake and new development of the mechanistic model to describe the albumin-mediated phenomenon

研究代表者

宮内 正二（Miyuchi, Seiji）

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：30202352

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）：本研究では、物理化学的測定系を用いてアルブミン促進取り込み機構を明らかにする事を目的として、以下の事柄を明らかにした。(1)アルブミンと細胞表面の相互作用により細胞表面近傍の非結合形薬物濃度の増大とそれに引き続き起こる効率良い取り込みを速度論的に詳細に解析する事の出来る系を確立した。(2)バクテリアにおけるジペプチド輸送担体とジペプチドとの結合解離には、水和水の解離が関与し、構造変化をもたらす要因であることを明らかにし、アルブミンの構造変化を引き起こす因子を考察した。(3)蛍光相関分光分析法を用いた非結合形薬物濃度の増大の可視化などが可能となる実験系の最適化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、この現象を説明するモデルとして提唱している、アルブミン-組織細胞の組み合わせに限定しないアルブミン解離促進機構は、アルブミンの持つ生理機能の一つ、即ち、種々の物質と結合してそれらをそれぞれの目的の場所へ効率良く運搬する“カーゴ”としての機能に重要であると考えられる。本研究において明らかにされる分子メカニズムは、結合解離促進をコントロールし、効率良い薬物送達へと新展開させる創薬研究という新たな切り口をもたらしとされており、本研究は発展性のある研究の一つである。一方、この分子メカニズムのヒト動態予測への応用は、臨床開発において必須なコンセプトの一つになるであろうと予想される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to elucidate the albumin-mediated uptake mechanism. (1) We established the robust uptake system using heterologous oocyte expression system of various transporters, with which the albumin-mediated uptake can be examined kinetically. By considering the albumin-mediated hepatic uptake with the facilitated-dissociation model, we demonstrated the improvement in the prediction accuracy for the hepatic clearance of highly protein-bound anionic drugs via hepatic uptake transporters. (2) We reported using an isothermal titration calorimetry that bound water molecules might play an important role in substrate binding by a transporter and in the conformational change in the transporter evoked by the release of bound water molecules, in the same manner that the interaction between albumin and the cell surface might be evoked. (3) We are optimizing with fluorescence correlation spectroscopy that a fluorescent probe dissociated on the surface can be monitored.

研究分野：薬物動態学

キーワード：アルブミン促進取り込み機構 トランスポーター アルブミン結合解離促進 組織移行性 蛍光相関分光測定

1. 研究開始当初の背景

1990年代頃から開発候補化合物に関するヒトにおける速度論パラメータの定量的予測において、ヒト臓器由来の材料を用いる *in vitro* 試験が可能となり、肝クリアランスや腎クリアランスなど消失臓器に関する動態学的パラメータの予測が飛躍的に向上した。このヒト臓器クリアランスの予測は、非結合形薬物のみ代謝、排泄、臓器移行に関わると仮定した“free drug theory (FDT)”に基づいている。この考え方は、基礎学問(物理化学から生化学分野)から応用学問まで広く受け入れられている。ところが、近年、血清アルブミンに強く結合する薬物に関して、この FDT が成立しないケースが数多く報告され始めている。申請者らは、図1に示すように、アルブミンに強く結合する医薬品が“アルブミン-薬物解離促進機構”を介して肝細胞に取り込まれていることを明らかにした [1, 2]。この解離促進機構とは、アルブミン-薬物複合体が肝細胞表面と相互作用することより、アルブミンに結合した薬物が局所的に解離し、アルブミンと強く結合する薬物が効率良く肝細胞へ取り込まれるという機構のことである。この現象は、アルブミン-肝細胞の組み合わせに限定しない、様々な動物種、様々な細胞、様々な血漿タンパク質において、このタンパク質介在輸送促進現象が観察されており、普遍的な機構により促進輸送機構が引き起こされていると考えられている。本研究においては、アルブミンなど血漿タンパク質が有する、この普遍的なメカニズムを、物理化学的観点から明らかにするための実験系の構築が必須となっている。

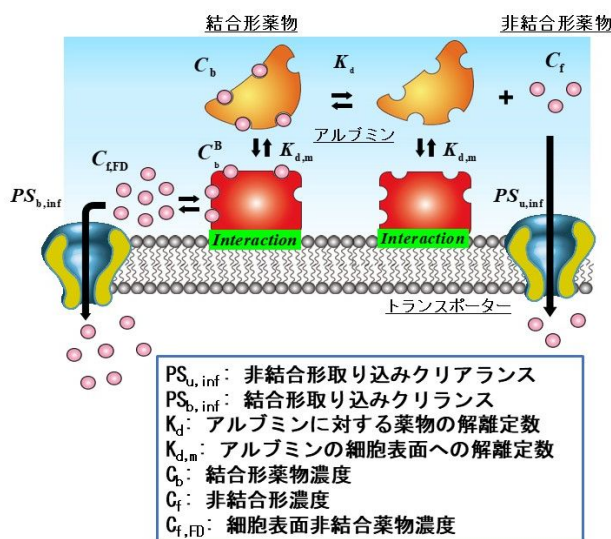


図1 アルブミン-薬物解離促進モデルによる肝取り込み促進

2. 研究の目的

アルブミン介在の肝取り込み促進過程において、最も重要な素過程は、細胞表面において非結合形薬物濃度が増大し、効率良く細胞内に取り込まれることである(図1)。この素過程は、輸送促進において最も重要であるが、未だ解明されていない。本研究では、促進機構の実体を解析できる物理化学的測定系を用いて、アルブミンと細胞表面の相互作用により細胞表面近傍の非結合形薬物濃度の増大とそれに引き続き起こる効率良い取り込みを速度論的に詳細に解析すること、また、熱力学的手法を用いたアルブミンの構造変化の測定、蛍光相関分析法を用いた非結合形薬物濃度の増大の可視化などが可能となる実験系の構築および促進分子機構の解明を目指す。本研究において明らかにされる分子メカニズムは、結合解離をコントロールし、効率良い薬物送達へと新展開させる創薬研究という新たな切り口をもたらすと考えており、本研究は発展性のある研究の一つである。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞の輸送担体発現系の構築とそれを用いたアルブミン介輸送機構の解析

アルブミンは、イオンから医薬品まで幅広く輸送機質を結合する能力を有している。様々な輸送担体(有機アニオントランスポーター(OATP, OAT)や脂質輸送担体(MFSD2A)など)の卵母細胞発現系の構築、その発現系を用いた輸送基質初速度解析を行った。アルブミン-薬物解離促進の介在する輸送機構を測定に用いる輸送担体は、(またはホモロジーモデリングによる構造)が明らかになっている輸送担体であり、アルブミン介在が細胞表面そのものあるいは輸送担体との相互作用によるものかを速度論的解析により検討した。更に、ラット初代培養肝細胞を用いて、アルブミン介在取り込み促進機構の基質およびその関与するトランスポーターの検討を取り込みに関する初速度解析を行った。

(2) 熱力学的手法(等温滴定型熱量計)を用いたアルブミンと薬物との相互作用、およびアルブミンと輸送担体との相互作用の解析

多量にサンプルが得られるという利点を生かして、直接的に薬物結合あるいはアルブミンの構造変化に伴うエンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)を求めることができる等温滴定型熱量計(ITC)を用いて、アルブミン-輸送担体の相互作用が引き起こすアルブミンの構造変化に伴う熱の出入りを解析する。

(3) アルブミンと細胞表面との相互作用による解離促進の可視化

蛍光量子収率の高いフルオレッセイン誘導体(dichlorofluorescein(DCF))は有機アニオン輸送担体

を介して取り込まれるモデル基質である。この DCF をアルブミンから解離促進を介した肝取り込みのモデル基質として用い、アルブミンからの解離促進の可視化および速度論的解析を行った。レーザー共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いた、蛍光相関分光分析法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy : FCS) による実験系の構築とアルブミン解離促進の解析の解析を行った。この手法は非結合形蛍光基質と結合形蛍光基質を区別することが可能であり、アルブミンと薬物の結合解離を可視化、直接測定することが出来る系である。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞および初代肝細胞を用いたアルブミン促進効果 [3]

アルブミン結合率の高い薬物を輸送する有機アニオン輸送担体 (OATP,OAT) の cRNA を用いて、輸送担体活性の最適化を行った。肝臓における代表的な有機アニオン輸送担体(OATP1B1 および OATP1B3)介した estrone-sulfate の取り込みは、H₂O 注入卵母細胞の取り込みに対して 10 倍以上の活性を示した。また、アルブミン存在下での取り込みも十分検討する事が出来ている。更に OAT1 および OAT3 の典型的な基質である p-aminohippuric acid (PAH)を用いて輸送活性を検討し、OAT1 および OAT3 輸送担体発現系卵母細胞は H₂O 注入卵母細胞の取り込みに対して 30 倍以上の高い活性を示した。PAH はアルブミンへの結合親和性が弱く、ほとんどが非結合形として存在する。一方、尿毒素やフロセミドなどはアルブミンへの結合が非常に強い OAT の阻害剤である。この阻害作用においてもアルブミン解離促進がみられるかについても検討を進め、アルブミンと細胞表面との相互作用を阻害作用という観点から解析中である。更に、これまでアルブミン促進機構が報告されているヒト臓器由来の抽出 RNA を用いて、脳毛細血管に発現している有機アニオン輸送担体 (OATP1A2)、脂質輸送担体(MFSD2A)や胎盤栄養膜細胞に発現している有機アニオン輸送担体 (OAT4) の単離、輸送実験系を確立した。これにより脳毛細血管や胎盤において報告されているアルブミン解離促進機構の詳細なメカニズムとその生理的意義を検討中である。一方、ラット肝初代培養細胞を用いて有機アニオン輸送担体の蛍光基質、DCF の輸送活性を検討した。予想に反して、DCF の肝取り込みは、pH7.5 において観察されなかった。一方、pH の低下に伴い、取り込み活性は増大し、pH 依存性有機アニオン輸送担体の機能発現を明らかにした。また、ラット肝細胞に機能発現している輸送担体は、低 pH において、顕著なアルブミン取り込み促進性を示した。この得られた知見は、がん細胞においても、アルブミン解離促進機構が存在する可能性が推察された。がん細胞の微小環境における pH は酸性であり、がん細胞はアルブミン促進機構を利用して、様々な物質を取り込んでいと考えられる。現在、幾つかのガン細胞を用いて、この点を検討中である。更に、ヒト腎尿細管上皮細胞(HK-2)において DCF 類似体、fluorescein (FLS)を pH-依存的に輸送する輸送担体が機能発現していること、有機アニオンが pH 依存的に再吸収されていること見いだした [4]。この発見により、尿細管に少量であるがアルブミンが糸球体ろ過されており、これら有機アニオンの再吸収にこれらアルブミンが関与することが推察され、アルブミンの持つ生理的意義を解明する手がかりの一つとなった。

(2) アルブミンからの解離促進機構の熱力学的解析

細胞表面においてアルブミンから化合物の解離促進は、アルブミンと細胞表面との相互作用により起こると考えられている。一般、この相互作用には静電相互作用を中心とする ΔH 駆動型と水和水の動きの見られる ΔS 駆動型に大別される。疎水性作用や大きな構造変化を伴う相互作用には主に水和水が移動し、 ΔS 駆動型を示す事、また、ITC 法により、輸送基質と輸送担体との相互作用を解析し、輸送基質の認識に、水和水の移動が重要であることを明らかにした [5]。薬物とアルブミンとの相互作用は、主にワルファリン、ロスバスタチンなど ΔH 駆動型と求められた。構造変化を伴う ΔS 駆動型相互作用を中心として引き続き検討中である。近年、様々なグループからクライオ電子顕微鏡を用いた有機アニオン輸送担体、OATP (Electron Microscopy Data Bank, EMD-34909) や OAT1 (EMD-40352)などの構造が報告されている。これらは、アルブミンからの解離促進現象が見られる薬物輸送担体であり、構造的特徴として、巨大な細胞外領域 (ECD) が存在している。 β -シート構造により構成され、アルブミンとの相互作用が予想される中央に溝を有していることが明らかにされている。これら輸送担体に共通する ECD とアルブミンとの相互作用の熱力学的相互作用は、解離促進の実証の観点から重要な相互作用一つであると考えられる。今後、精緻なアルブミンの解離促進モデルを構築するために必須な相互作用の一つであることが明らかになった。

(3) 様々な臓器におけるアルブミン促進細胞内取り込みとアルブミンの生理的意義 [6]

アルブミン介在の肝取り込み促進機構に関する研究を発端に、この促進機構がヒトの薬物動態学的パラメータの定量的予測において重要な因子の一つであることが明らかになってきた。様々な細胞において、このアルブミン介在輸送促進現象が観察されており、アルブミン - 肝細胞の組み合わせに限定されている現象ではない。これまでのアルブミン介在の肝取り込み促進機構及び最新の知見を研究調査し、最も重要な素過程は、細胞表面との相互作用によりアルブミン - 薬物複合体から薬物が解離し、局所的に非結合形薬物濃度が増大する過程であることを明らかにした (図 1)。古くから知られているアルブミンの生理的機能として種々の化合物を結合し、それぞれの作用部位へ効率良く運搬する“カーゴ”としての機能が知られている。アルブミンが化合物の効率良い運搬体として機能するために、局所における解離促進機能が重要であり、アルブミンの生理的意義の一つと推察された。これまで、肝臓において、アルブミンなど血漿タンパク質が有する解離促進機構は多くの医薬品で報告されている。様々な医薬品の肝臓への移行のデータ網羅的に解析し、半経験則ではあるが、アル

ブミン解離促進の度合いを示す基本式を提唱することができた。

(4) アルブミンと細胞表面との相互作用による解離促進の可視化

蛍光量子収率の高いフルオレセイン誘導体, DCF がラット肝初代培養細胞によりアルブミン促進機構により取り込まれることが明らかになった。その輸送機構は pH 依存性有機アニオン輸送担体を介して取り込まれていた。蛍光物質利用した FCS 法によりアルブミン介在肝取り込み促進を詳細に解析出来る実験系の構築行ってきた。その結果、蛍光強度の自己相関関数の測定には、蛍光物質の励起状態安定性が必須であり、このアルブミン促進を示す蛍光物質、フルオレセイン誘導体は適切で無いことが明らかになった。そこで、FCS 解析に適切な蛍光物質の検討を行い、一つの候補として、Alexa480-チオシアン酸などのタンパク質ラベル化蛍光物質が適切であることが分かった。更に、FCS 法は、細胞表面におけるアルブミンと蛍光化合物の結合解離を可視化、直接測定することが出来る系であるが、有機アニオン輸送担体に共通する ECD とアルブミンとの相互作用は、解離促進の実証の観点から考慮すべき重要な相互作用一つであることが明らかになった。今後は、様々な物理化学的手法を用いて、多様な視点から、アルブミンと細胞表面との相互作用を解明し、精緻なアルブミンの解離促進モデルを構築する必要があることが明らかになった。

5 . 参考文献

- [1] Miyauchi S, Masuda M, Kim SJ, Tanaka Y, Lee KR, Iwakado S, Nemoto M, Sasaki S, Shimono K, Tanaka Y, Sugiyama Y. The Phenomenon of Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Organic Anion Transport Polypeptide Substrates: Prediction of the In Vivo Uptake Clearance from the In Vitro Uptake by Isolated Hepatocytes Using a Facilitated-Dissociation Model. *Drug Metab Dispos.* **46**, 259-267 (2018).
- [2] Kim SJ, Lee KR, Miyauchi S, Sugiyama Y. Extrapolation of In Vivo Hepatic Clearance from In Vitro Uptake Clearance by Suspended Human Hepatocytes for Anionic Drugs with High Binding to Human Albumin: Improvement of In Vitro-to-In Vivo Extrapolation by Considering the "Albumin-Mediated" Hepatic Uptake Mechanism on the Basis of the "Facilitated-Dissociation Model". *Drug Metab Dispos.* **47**, 94-103 (2019).
- [3] 投稿準備中
- [4] Takiguchi T, Sugio K, Masuda M, Sasaki S, Miyauchi S. Uptake of Fluorescein via a pH-Dependent Monocarboxylate Transporter by Human Kidney 2 (HK-2) Cells. *Biol Pharm Bull.* **47**, 79-87 (2024).
- [5] Omori A, Sasaki S, Kikukawa T, Shimono K, Miyauchi S. Elucidation of a Thermodynamical Feature Attributed to Substrate Binding to the Prokaryotic H(+)/Oligopeptide Cotransporter YdgR with Calorimetric Analysis: The Substrate Binding Driven by the Change in Entropy Implies the Release of Bound Water Molecules from the Binding Pocket. *Biochemistry.* **62**, 1608-1618 (2023).
- [6] Miyauchi S, Kim SJ, Lee W, Sugiyama Y. Consideration of albumin-mediated hepatic uptake for highly protein-bound anionic drugs: Bridging the gap of hepatic uptake clearance between in vitro and in vivo. *Pharmacol. Ther.*, **229**, 107938 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Omori Akiko, Sasaki Shotaro, Kikukawa Takashi, Shimono Kazumi, Miyauchi Seiji	4. 巻 62
2. 論文標題 Elucidation of a Thermodynamical Feature Attributed to Substrate Binding to the Prokaryotic H(+)/Oligopeptide Cotransporter YdgR with Calorimetric Analysis: The Substrate Binding Driven by the Change in Entropy Implies the Release of Bound Water Molecules from the Binding Pocket	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1608 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.2c00673	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 Takiguchi Takaharu, Sugio Kazuaki, Masuda Masayuki, Sasaki Shotaro, Miyauchi Seiji	4. 巻 47
2. 論文標題 Uptake of Fluorescein via a pH-Dependent Monocarboxylate Transporter by Human Kidney 2 (HK-2) Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 79 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00570	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 Seiji Miyauchi, Soo-Jin Kim, Woojin Lee, Yuichi Sugiyama	4. 巻 229
2. 論文標題 Consideration of albumin-mediated hepatic uptake for highly protein-bound anionic drugs: Bridging the gap of hepatic uptake clearance between in vitro and in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2021.107938	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木 将太郎、宮内 正二
2. 発表標題 フルオレセイン誘導体を用いたA549細胞における有機アニオン輸送の解析
3. 学会等名 第38回日本薬剤学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 難部仁美、野口歩美、若月萌、渡邊昂太郎、早川北斗、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 ヒト気管腔上皮細胞(BEASE-2B)に機能発現するH ⁺ /モノカルボン酸共輸送担体
3. 学会等名 第38回日本薬劑学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉尾和昭、府川和樹、増田雅行、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 様々な有機アニオンとの相互作用を有する輸送担体SMCT1 (SLC5A8)
3. 学会等名 第44回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 府川和樹、杉尾和昭、増田雅行、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 腎尿管におけるトランスポーター(URAT)と他のトランスポーターとの機能連関
3. 学会等名 第44回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木 将太郎、宮内 正二
2. 発表標題 フルオレッセイン誘導体を用いたヒト肺上皮細胞に機能発現するブロードな質認識性を示すH ⁺ /モノカルボン酸共輸送担体の機能同定
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐々木将太郎、滝口貴晴、杉尾和昭、増田雅行、宮内正二
2. 発表標題 Fluorescein を用いた腎尿細管再吸収に関与するモノカルボン酸輸送担体の機能評価
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉尾和昭、府川和樹、増田雅行、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 D体-アミノ酸の腎尿細管再吸収に関わる新たな輸送担体
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 府川和樹、杉尾和昭、増田雅行、安西尚彦、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 尿酸輸送担体の機能に関する有機アニオン・カップリング
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田かりん、竹中紗織、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 筋毒性を惹起するモノカルボン酸薬物の骨格筋細胞への濃縮機構
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木将太郎、石川龍、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 オリゴペプチド輸送担体PEPT1のH+チャネル様機能変換に関わる構造的特徴
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉尾和昭、府川和樹、増田雅行、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 Na+/モノカルボン酸共輸送担体を介したアミノ酸輸送
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
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
研究 分 担 者	菊川 峰志 (Kikukawa Takashi) (20281842)	北海道大学・先端生命科学研究院・准教授 (10101)	

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