

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06688

研究課題名(和文)肝排出輸送体による活性代謝物輸送解析と機械学習メタボロミクスによる生体内基質探索

研究課題名(英文) Analysis of the transport of active metabolites by hepatic efflux transporters and identification of physiological substrates using machine learning-based metabolomics

研究代表者

増尾 友佑 (Masuo, Yusuke)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90708140

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)：輸送体BCRP/ABCG2とMRP3/ABCC3は、それぞれ肝の胆管、血管側細胞膜に発現し、肝から基質を排出する。これらは小腸や腎臓に発現し、肝での機能は不明であった。アデノ随伴ウイルス(AAV)でshRNAを肝に送達させ、肝BcrpまたはMrp3をノックダウンしたマウスを作製した。BcrpのノックダウンでBCRP基質のsulfasalazineの血漿中濃度は上昇し、Mrp3ノックダウンでMRP3の基質のacetaminophenグルクロン酸抱合体の肝から血液への排出が低下した。AAVを用いた肝選択的ノックダウンは、肝における輸送体の機能評価系として有用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

肝で生成した活性代謝物は、血液中へ排出輸送された後に全身で薬理作用を示すが、その輸送機構が解明された例は乏しい。本研究成果は、AAVを用いて肝での膜輸送体の発現を選択的に制御することで、肝に発現する膜輸送体の機能をin vivoで簡便に評価する実験系を構築でき、今後の普遍的な機能評価に活用できる点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：BCRP/ABCG2 and MRP3/ABCC3 are expressed in the canalicular and sinusoidal plasma membranes of hepatocytes, respectively, and pump out substrates from the liver. These transporters are also expressed in small intestine and kidney, but their hepatic roles were unclear. Using adeno-associated virus (AAV) to deliver shRNA, mice with liver-specific knockdown of Bcrp or Mrp3 were constructed. Knockdown of Bcrp resulted in increased plasma concentrations of the BCRP substrate sulfasalazine, while knockdown of Mrp3 reduced the hepatic efflux of the MRP3 substrate acetaminophen glucuronide into the blood. This study demonstrates that AAV-mediated liver-specific knockdown is a useful tool for evaluating the functions of hepatic transporters.

研究分野：薬物動態学

キーワード：排出輸送体 トランスポーター BCRP MRP3 肝細胞 AAV

## 1. 研究開始当初の背景

膜輸送体 Breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2)は、肝胆管のほか、小腸管腔、血液脳関門、腎近位尿細管等の細胞膜に発現し、薬物等の基質化合物を細胞外に排出する。それぞれの臓器に発現する BCRP が基質薬物の体内動態に与える影響は不明点が多いものの、薬物の活性代謝物の主生成臓器となる肝における BCRP は基質薬物の体内動態の規定因子のひとつである。一方、膜輸送体 Multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3/ABCC3)は肝、小腸、尿細管上皮細胞の血液側細胞膜に発現し、グルクロン酸抱合体や胆汁酸を基質として、血液中に排出輸送する。肝で生成した活性代謝物は、血液中へ排出輸送された後に全身で薬理作用を示す。肝に発現する MRP3 は肝で代謝活性化された薬物の体内動態に影響を与えうるが、肝 MRP3 が薬物動態に及ぼす役割はほとんど解明されていない。

治療域の狭い抗がん薬では、活性代謝物が存在する薬剤が多い。分子標的薬 regorafenib は活性代謝物 M-2, M-5 と同程度の薬理活性を有するが、患者検体で評価した非結合型血漿中濃度は M-2 が最も高く (*Clin Pharmacol Ther.* 108:586, 2020)、がん患者における薬効・副作用の本体である。極性が増した活性代謝物は、膜透過に輸送体の関与が特に必要でその輸送機構が解明された例は乏しい。肝に発現する BCRP や MRP3 等の排出輸送体の機能を適切に評価することは、有効かつ安全な薬物治療に求められる。

## 2. 研究の目的

肝に発現する排出膜輸送体 Bcrp および Mrp3 が基質化合物の体内動態へ寄与するかを評価すべく、アデノ随伴ウイルス(AAV) 8型で肝選択的に Bcrp および Mrp3 をノックダウンしたマウスで、基質化合物の体内動態を比較する。AAV は、病原性が低く、導入遺伝子を数か月以上維持でき、8型は肝指向性が高いため、*in vivo*での機能解析に適する。AAVで膜輸送体発現を遺伝子かつ組織選択的に *in vivo*で制御し、肝における排出輸送体 Bcrp または Mrp3 の機能を評価できる実験系を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス Bcrp および Mrp3 (対照として LacZ) に対する shRNA を発現する AAV8-shBcrp および AAV8-shMrp3(対照として AAV8-shLacZ)を HEK293 細胞で作製後、密度勾配超遠心法で精製した。野生型マウスに各種 AAV を静脈内投与してから 3 週間後に、肝、小腸、腎、脳における Bcrp および Mrps の発現を qPCR で評価した。Sulfasalazine または acetaminophen をそれぞれ経口投与または静脈内投与後の血漿中、臓器中の薬物または代謝物濃度を LC-MS/MS で定量した。

## 4. 研究成果

野生型マウスに各 AAV を静脈内投与後、各組織での Bcrp の mRNA、タンパク質発現量を評価したところ、AAV8-shBcrp 投与群では、対照群よりも肝 Bcrp mRNA、タンパク質発現量ともに 10%以下に低下した。一方、Bcrp が発現する他組織として小腸および腎臓では発現低下せず、肝選択的 Bcrp ノックダウンを確認できた。経口投与した BCRP 基質薬 sulfasalazine の血漿中濃度は、AAV8-shBcrp で、対照群よりも顕著に高く、AUC は 7 倍に増加した。AAV による肝選択的な Bcrp ノックダウンで肝 BCRP の機能を評価可能で、肝 BCRP は sulfasalazine の血漿中濃度の規定因子であることが明らかになった。

AAV-shMrp3 投与群における Mrp3 の mRNA 発現は AAV-shLacZ 投与群と比較して、肝で約 20%、腎で約 70%に低下した一方、小腸・脳ではほぼ変化しなかった。Acetaminophen (APAP)を定速静注後の定常状態における体内動態を比較した。AAV-

shMrp3 投与群における APAP と、MRP3 の基質であるグルクロン酸抱合体(APAP-glucuronide)の血漿中濃度は、AAV-shLacZ 投与群と同等であった。肝臓中 APAP-glucuronide 濃度は、AAV-shMrp3 投与群で AAV-shLacZ 投与群の約 4 倍に増加した一方、肝臓中 APAP 濃度は同程度であった。AAV を用いた肝 Mrp3 ノックダウンで、APAP-glucuronide の肝から血液への排出低下が確認でき、本実験系は肝 Mrp3 評価系としての有用性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Park G, Fukasawa K, Horie T, Masuo Y, Inaba Y, Tatsuno T, Yamada T, Tokumura K, Iwahashi S, Iezaki T, Kaneda K, Kato Y, Ishigaki Y, Mieda M, Tanaka T, Ogawa K, Ochi H, Sato S, Shi YB, Inoue H, Lee H, Hinoi E.	4. 巻 8
2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 in hypothalamic neurons in mice maintains energy and bone homeostasis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e154925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.154925	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 Al-Shammari AH, Masuo Y, Yoshino S, Yamashita R, Ishimoto T, Fujita K, Kato Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 Adeno-associated virus-mediated knockdown demonstrates the major role of hepatic Bcrp in the overall disposition of the active metabolite of the tyrosine kinase inhibitor regorafenib in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 100483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2022.100483	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 Matsumoto T, Masuo Y, Tanaka A, Kimura T, Ioroi T, Yamakawa T, Kitahara H, Kato Y.	4. 巻 627
2. 論文標題 A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for disposition of FF-10832.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Pharm	6. 最初と最後の頁 122250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2022.122250	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 Hasan Alshammari A, Masuo Y, Fujita KI, Shimada K, Iida N, Wakayama T, Kato Y	4. 巻 197
2. 論文標題 Discrimination of hand-foot skin reaction caused by tyrosine kinase inhibitors based on direct keratinocyte toxicity and vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol	6. 最初と最後の頁 114914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.114914	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 Iida N, Mizukoshi E, Yamashita T, Yutani M, Seishima J, Wang Z, Arai K, Okada H, Yamashita T, Sakai Y, Masuo Y, Agustina R, Kato Y, Fujinaga Y, Oshima M, Honda M, Lebreton F, Gilmore MS, Kaneko S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Chronic liver disease enables gut Enterococcus faecalis colonization to promote liver carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Cancer	6. 最初と最後の頁 1039-1054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43018-021-00251-3	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 Agustina R, Masuo Y, Kido Y, Shinoda K, Ishimoto T, Kato Y	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of food-derived isoflavone sulfates as inhibition markers for intestinal breast cancer resistance proteins.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metab Dispos	6. 最初と最後の頁 972-984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.121.000534	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 増尾友佑、吉野将太郎、Alshammari Aya、山下怜矢、石本尚大、加藤将夫
2. 発表標題 アデノ随伴ウイルスによる肝選択的ノックダウンによる肝BCRPの機能評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増尾友佑、Rina Agustina、加藤将夫
2. 発表標題 アンターゲットメタボロミクスによる膜輸送体BCRPバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第16回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須崎智子、増尾友佑、及川夏月、加藤将夫
2. 発表標題 生体内化合物の臓器ハンドリング解明を目指した動静脈アンターゲットメタボロミクス
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増尾友佑
2. 発表標題 構造選択的メタボロミクスによる膜輸送体の生体内基質同定
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第134回例会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水戸守智香、増尾友佑、荒井潤、松本奈都美、鈴木康介、吉田仁、藤田健一、加藤将夫
2. 発表標題 レンパチニブ投与患者血漿検体のメタボロミクス解析による薬効バイオマーカー探索
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増尾友佑、Rina Agustina、笹田京佑、美馬伸治、伊藤匡彦、加藤将夫
2. 発表標題 アンターゲットメタボロミクスによるBCRPバイオマーカーとしてのイソフラボン硫酸抱合体の同定
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野将太郎、増尾友佑、加藤将夫
2. 発表標題 マルチキナーゼ阻害薬pazopanibの消化管吸収と胆汁排泄に及ぼすBCRP/ABCG2の関与
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Agustina, Yusuke Masuo, Kyosuke Shinoda, Shinji Mima, Masahiko Ito, Yukio Kato
2. 発表標題 Isoflavone Sulfates Conjugates as Potential Physiological Substrates of BCRP for Estimation of in vivo Inhibition.
3. 学会等名 EB (Experimental Biology) (国際学会)
4. 発表年 2021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 <a href="https://bunyaku.w3.kanazawa-u.ac.jp/">https://bunyaku.w3.kanazawa-u.ac.jp/</a>
--

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