

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06694

研究課題名(和文) 消化管の薬物吸収を制御する新規促進拡散型オリゴペプチドトランスポーターの分子同定

研究課題名(英文) Identification of novel equilibrative oligopeptide transporters that may regulate drug absorption in the gastrointestinal tract

研究代表者

樋口 慧 (Higuchi, Kei)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10625304

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)：医薬品の消化管からの吸収は、消化管上皮の細胞膜透過性の影響を受ける。本研究の目的は、消化管上皮細胞の血液側膜に存在し、薬物の吸収に寄与できる新規促進拡散型オリゴペプチドトランスポーター(EOPTs)の同定である。そこで、事前に申請者が見出したEOPTsの候補分子群のオリゴペプチド輸送体として機能を解析した。その結果、EOPT1およびEOPT2などの分子から輸送活性を検出することに成功した。さらにそれらを消化管上皮モデル細胞に発現させると、細胞の側底膜に発現し、基質薬物の吸収を促進することを見出すことに成功した。本成果の一部は既に国際誌に投稿済みである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果である小腸上皮細胞側底膜で機能する新規オリゴペプチドトランスポーターの同定は、生理的なオリゴペプチドの吸収機構を明らかにするという点で、栄養生理学的にも重要な意義があるだけでなく、消化管からの-ラクタム系抗生物質などの薬物の吸収動態の新規制御因子の同定という価値がある。オリゴペプチドを認識するトランスポーターの同定は創薬・創剤において、経口吸収性を高める上で有益であることから、近年着目されている経口ペプチド創薬・創剤においても重要な知見となりうると考えられる。

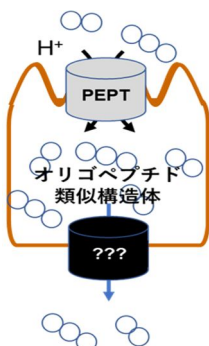
研究成果の概要(英文)：Drug absorption from the gastrointestinal tract is regulated by the cell membrane permeability of the gastrointestinal epithelium. This study aims to identify novel equilibrative oligopeptide transporters (EOPTs) that express at the basolateral membrane of gastrointestinal epithelial cells and play a role in drug absorption. Therefore, we examined the transport function of a group of candidate molecules of EOPTs previously identified as novel oligopeptide transporters. As a result, candidates like EOPT1 and EOPT2 can transport oligopeptides and peptidomimetics. These molecules are expressed at the basolateral membrane of a polarized gastrointestinal epithelial cell line. When the model cells are cultured on the cell culture inserts, the expression of EOPT2 enhances the permeation of the substrate from the apical to the basal side. Some of these results have already been published in an international journal article.

研究分野：トランスポーター

キーワード：オリゴペプチドトランスポーター 消化管 側底膜

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta$ -ラクタム系抗生物質などのオリゴペプチド類似構造を有する薬物は、そのペプチド構造から高い水溶性を有し、脂質二重膜である細胞膜を容易に透過できない。しかし実際には一部の薬物は経口製剤として臨床で使用されており、薬効発現に必要な量が消化管で吸収されている。これまでにオリゴペプチド類似構造体の小腸上皮細胞の透過機構として、頂端膜に発現するプロトン共役型オリゴペプチドトランスポーター (PEPT1) が知られている。一方で小腸上皮細胞におけるオリゴペプチド類似構造体の吸収には、頂端膜だけでなく、血液側に位置する側底膜の透過が必須である。これまでに小腸上皮細胞の側底膜にはオリゴペプチドを輸送する分子未同定の促進拡散型オリゴペプチドトランスポーターが存在することが、小腸上皮モデル細胞の透過実験より示唆されている。しかしオリゴペプチド類似構造体の頂端膜透過を PEPT1 が担うのに対して、側底膜透過を担う分子は未同定である。この小腸上皮細胞側底膜で機能するオリゴペプチドトランスポーターの同定は、オリゴペプチド類似構造を有する薬物の吸収動態を予測する上で重要であり、また生理的なオリゴペプチドの吸収機構を明らかにするという点で、栄養生理学的にも重要な研究課題である (左図参照)。



## 2. 研究の目的

生体内には未だ機能不明なオーファントランスポーターが多く存在する。しかし消化管に限らず促進拡散型のオリゴペプチドトランスポーター分子は同定されていない。その原因として、細胞内濃縮が起こらない促進拡散型の輸送形式であることや、オリゴペプチド類似構造により細胞内分布容積が低くなりやすいことが挙げられる。このような条件下では細胞内取り込みが極めて制限されることが予測され、通常の発現系解析が困難である。しかし申請者は特殊な方法で、オリゴペプチド類似構造体を輸送する促進拡散型トランスポーターを分子レベルで、その候補を絞り込み、実際にオリゴペプチド類似構造体 glycylsarcosine (Gly-Sar) を輸送するトランスポーター (Equilibrative Oligo Peptide Transporter1/EOPT1 と以後仮称) を見出すことに成功した。このことから、本研究では、EOPT1 およびそのアイソフォームは、オリゴペプチドやその類似構造体の輸送機能を解析し、消化管の上皮細胞側底膜でそれらの細胞膜透過に寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)EOPTs の一過性発現 HEK293 を用いた輸送機能解析

EOPTs の輸送特性を明らかにするために、HEK293T 細胞に PEI 法にて、EOPTs を一過性に発現させた。それらの細胞を用いて、各種条件下で取り込み実験を行った。オリゴペプチドや  $\beta$ -ラクタム系抗生物質などのオリゴペプチド類似構造体の取り込み実験は、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) もしくはそのイオン組成を改変した buffer 中で行い、LC-MS/MS にて細胞内取り込み量を定量した。排出輸送実験では、EOPTs と共にプロトン共役型オリゴペプチドトランスポーター PEPT2 を一過性に共発現させた HEK293T 細胞を用いて実施した。細胞内にオリゴペプチド類を一定時間プレロードし、その後、上記の buffer にて排出実験を行い、LC-MS/MS にて細胞内残存量を定量した。

### (2)ラット消化管およびヒト消化管上皮モデル細胞 Caco-2 における EOPTs 発現解析

EOPTs の消化管における発現量を評価するために、ラット消化管 (十二指腸、空腸、回腸、結腸) およびヒト消化管上皮モデル細胞 Caco-2 より total RNA を抽出し、逆転写し cDNA 合成し、EOPT1 および EOPT2 に対する RT-PCR および定量的 RT-PCR を行った。

### (3)Doxycycline 誘導性 EGFP-tag 付 EOPTs 発現 Caco-2 細胞を用いた局在および機能解析

EOPTs の消化管上皮細胞の局在と機能を明らかにするために、Caco-2 細胞の AAVS1 領域に、Tet-on promoter と EGFP-tag 付 EOPTs の DNA を CRISPR/Cas9 システムにより相同組み換えを行い、Doxycycline 誘導性 EGFP-tag 付 EOPTs 発現 Caco-2 細胞 (Caco-2-Tet-EOPTs) を調製した。Caco-2-Tet-EOPTs を cell culture insert® 上で培養することで、消化管上皮細胞様に極性化させた。極性化した Caco-2-Tet-EOPTs における EOPTs の極性局在を、共焦点蛍光顕微鏡を用いて解析した。また極性化した Caco-2-Tet-EOPTs におけるオリゴペプチド類の輸送は、HBSS 中で方向性輸送を評価し、解析した。

## 4. 研究成果

EOPT1 を含むアイソフォーム EOPTs がオリゴペプチドを輸送しているかを評価するために、その生理的輸送条件を考慮し、プロトン共役型オリゴペプチドトランスポーター (PEPT2) の共発現系を用いたオリゴペプチド構造類似体 glycylsarcosine (Gly-Sar) 排出能の定量的評価を実施した。その結果、EOPT1 と EOPT2 を共発現させた場合、PEPT2 を介した glycylsarcosine 取り込みが抑制され、さらに細胞内から Gly-Sar 排出の促進することが確認された。次に、EOPT1 および EOPT2 のオリゴペプチド輸送特性を明らかにするために、単独発現 EOPT1 および EOPT2 細胞を用いて、取り込み実験を行った。まず EOPT1 の Gly-Sar 以外のオリゴペプチドおよびオリゴペプチド類似構造体の輸送能を評価した。その結果、EOPT1 は Gly-Sar や  $\beta$ -ラクタム系抗生物質など

10種類以上の化合物に対する取り込み能が確認された。またその基質認識は、PEPT基質とオーバーラップしているものの、一部PEPT1が輸送しない化合物も輸送することが示された。またEOPT2においても、同様にオリゴペプチド類の取り込み能を評価したところ、弱いながらGly-Sarなどの一部のオリゴペプチドとβ-ラクタム系抗生物質cephradineの取り込み能が確認された。EOPT2の取り込み輸送に関しては、種々の実験条件検討から最適化を行って実施したが、取り込み能が弱く、化合物自体の細胞内分布性や蓄積性の影響を受けている可能性が考えられる。EOPT2のオリゴペプチド類の基質認識性に関しては、今後さらなる検討が必要である。またEOPT1に対するGly-SarおよびEOPT2に対するcephradineの親和性について検討したところ、EOPT1のGly-Sar取り込みは、50mMにおいても飽和しなかった。一方でEOPT2のcephradine取り込みの $K_m$ 値は2.8mMと算出された。またこれらの取り込みのpH依存性を検討したところ、それらの取り込みは酸性条件下でも、増加しなかった。これらの結果より、EOPT1およびEOPT2は、既存のプロトン共役型オリゴペプチドトランスポーターとは異なる、新規促進拡散型オリゴペプチドトランスポーターとして機能しうることが示唆された。

次にEOPT1およびEOPT2の消化管における発現を明らかにするために、RT-PCRおよび定量的PCRを行った。ラット消化管の各部(十二指腸、空腸、回腸、結腸)においてratEOPT1が発現していた。またその発現量に部位による有意な差は観察されなかった。またEOPT1のヒト十二指腸由来cDNAおよびヒト小腸モデル細胞Caco-2においても発現が確認されたが、しかしラットよりヒトサンプルにおけるEOPT1発現量は、内標準遺伝子に対する発現比で低いことが示された。またRNA発現データベースにおいてもEOPT1の発現量は、ヒトよりげっ歯類(マウス)の消化管で高く検出されている。これらよりEOPT1は、ラットとヒトで腸管における発現レベルに種差が存在する可能性が考えられる。一方で、EOPT2はヒト消化管十二指腸由来cDNAやCaco-2において発現が確認され、その発現レベルは、内標準遺伝子に対する発現比で、EOPT1より高発現していると算出された。さらにタンパク質発現について、Western blotによる市販抗体による検出を試みたが、特異的シグナルが検出されず検討できなかった。

また*in vivo*消化管における寄与の評価を予定していたが、EOPT1の発現プロファイルなどから種差が示唆されたことおよび投与実験で使用可能なほど高親和性の阻害剤を見出せなかったことから、それらの実験の代わりにヒト消化管モデルCaco-2細胞を用いて検討を行った。まず消化管におけるEOPTsの局在および機能を明らかにするために、EGFP-tag付タンパク質をdoxycycline誘導性発現できる消化管モデルCaco-2細胞を用いて検討を行った。その結果、極性化されたCaco-2細胞において、EOPT1およびEOPT2は側底膜側に局在することが示唆された。さらに同モデル細胞を用いて頂端膜側から側底膜側へのEOPT1に対するGly-SarおよびEOPT2に対するcephradineの透過の評価を行った。EOPT1を介したGly-Sarの輸送には変化が観察されなかった一方で、EOPT2を介したcephradine輸送は顕著に亢進することが明らかになった。またEOPT2を誘導した細胞内cephradine蓄積も減少していた。少なくとも、EOPT2は、ヒト消化管上皮細胞の側底膜で、β-ラクタム系抗生物質cephradineの透過に寄与しうることが示唆された。EOPT1のGly-Sar透過に影響がなかった原因として、EOPT1はヒト消化管上皮細胞では機能的に発現しないことや機能的発現するためには、食事などの刺激により、細胞内リン酸化などの活性化する必要であることなど考えられた。実際に、別実験より、EOPT1機能を一部の化合物の前処理により輸送機能の活性化を確認している。今後、EOPT1のヒト消化管におけるタンパク質発現の確認および細胞内制御機構の解明が進める必要が考えられる。

以上より、本研究ではオリゴペプチドやその類似構造体の輸送機能を有する新規トランスポーターとしてEOPT1およびEOPT2を同定することに成功した。またそのうち、EOPT2はヒト消化管モデル細胞の解析より、その血液側膜に発現し、オリゴペプチド類の透過の促進に寄与しうる分子であることを明らかにした。本成果の一部は、既に国際誌に投稿済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Higuchi Kei, Sugiyama Koki, Tomabechi Ryuto, Kishimoto Hisanao, Inoue Katsuhisa                     | 4. 巻<br>298                   |
| 2. 論文標題<br>Mammalian monocarboxylate transporter 7 (MCT7/Slc16a6) is a novel facilitative taurine transporter | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>101800 ~ 101800 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jbc.2022.101800   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Higuchi Kei, Kunieda Misato, Sugiyama Koki, Tomabechi Ryuto, Kishimoto Hisanao, Inoue Katsuhisa                | 4. 巻<br>15                |
| 2. 論文標題<br>Monocarboxylate Transporter 13 (MCT13/SLC16A13) Functions as a Novel Plasma Membrane Oligopeptide Transporter | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients  | 6. 最初と最後の頁<br>3527 ~ 3527 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu15163527   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>樋口 慧, V. Ganapathy  |
| 2. 発表標題<br>Na <sup>+</sup> 依存性オリゴペプチドトランスポーターを介した $\beta$ -amyloid輸送の可能性 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第37年会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>樋口 慧、國枝 美里、岸本 久直、井上 勝央        |
| 2. 発表標題<br>アクセサリタンパク質によるSlc16a6/MCT7機能制御 |
| 3. 学会等名<br>第67回日本薬学会関東支部大会               |
| 4. 発表年<br>2023年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>樋口 慧                                   |
| 2. 発表標題<br>新規薬剤開発および薬物療法を目指した 生体内代謝物トランスポーターの機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第67回日本薬学会関東支部大会（招待講演）                  |
| 4. 発表年<br>2023年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Misato Kunieda, Yuito Otsuka, Kei Higuchi, Hisanao Kishimoto, Katsuhisa Inou   |
| 2. 発表標題<br>Methotrexate resistance by Slc16a6/MCT7 in cancer cells  |
| 3. 学会等名<br>2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kei Higuchi, Misato Kunieda, Hisanao Kishimoto, Katsuhisa Inoue  |
| 2. 発表標題<br>Regulation of localization and function of MCT7 by ancillary proteins CD147 and GP70   |
| 3. 学会等名<br>2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 井上 勝央<br><br>(Inoue Katsuhisa)<br><br>(50315892) | 東京薬科大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(32659) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 岸本 久直<br><br>(Kishimoto Hisanao)<br><br>(80723600) | 東京薬科大学・薬学部・講師<br><br><br><br><br>(32659) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |