

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14962

研究課題名（和文）小腸・肝臓における新たなpH依存性薬物輸送担体の同定

研究課題名（英文）A novel pH-dependent drug transporter in intestine and liver

研究代表者

佐々木 将太郎（SASAKI, Shotaro）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：50780300

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）：医薬品の吸収に関与するpH依存性輸送担体の実態を明らかにするために、オリゴペプチド輸送担体および有機アニオン輸送担体に焦点を当て、種々検討を進めた。pH依存性輸送担体に関する研究の結果、一部のモノカルボン酸化合物が小腸や腎臓に発現しているオリゴペプチド輸送担体を介した内向き誘起電流を生じさせること、スタチン系薬物等の経口投与により用いられるカルボン酸型薬物がオリゴペプチド輸送担体を阻害すること、既知の有機アニオン輸送担体とは異なるpH依存性輸送担体がカルボン酸型薬物を認識し得ることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、既知の有機アニオン輸送担体とは異なるpH依存性輸送担体が医薬品を認識し得ることが示された。この研究成果は、新たな薬物の送達法の立案や副作用発現機序の解明などにつながる薬物動態を考える上で重要な知見である。最適な体内動態を示す薬物のデザイン、薬物間相互作用の予測および回避戦略などに応用可能であり、今後の研究のさらなる展開が期待される。

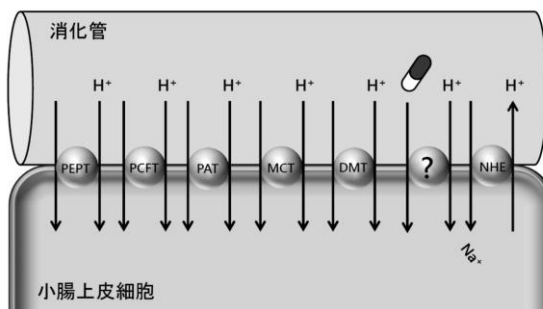
研究成果の概要（英文）：In order to clarify the characterization of a pH-dependent transporter involved in the absorption of drugs, we evaluated the substrate specificities of H⁺-coupled oligopeptide transporter PEPT1 and H⁺-coupled organic anion transporter. It was revealed that exposure of PEPT1-expressing oocytes to several monocarboxylate compounds induced inward currents. However, carboxylate drugs such as statins and NSAIDs were not substrates of PEPT1. On the other hand, when we investigated the effect of various substrates/inhibitors for well-known organic anion transporters (OATs and OATPs) on pH-dependent organic anion transport, the substrate specificity of H⁺-coupled organic anion transporter was revealed to be different from those specificities of OATs and OATPs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター オリゴペプチド 有機アニオン pH依存性 プロトン共輸送

1. 研究開始当初の背景

今日では、原始的な生物にのみ存在すると考えられていたプロトン勾配を駆動力とする多様な輸送担体がヒトの細胞にも存在することが知られている。小腸をはじめ様々な組織には種々の pH 依存性輸送担体が発現しており、 Na^+/H^+ 交換輸送担体等によって形成された微小酸性環境下において効率的に基質を輸送していると考えられている。近年、様々なアニオン性薬物の輸送に pH 依存性輸送担体の関与が示唆されているものの、これらの輸送担体の多くは、多彩な基質認識機構やその分子実体が不明なままであった (右図)。



これまでに研究代表者らは、小腸等に発現している H^+ /モノカルボン酸共輸送担体 (MCT) に注目し、乳酸やアミノ酸誘導体が MCT を介して生体膜を透過していることを報告した。¹⁻³⁾ また、MCT の基質認識性は厳密であり、NSAIDs やスタチン系薬物等の医療現場で広く用いられているカルボン酸構造を有する医薬品は単に阻害剤として MCT と相互作用しているにすぎず、MCT は医薬品の輸送に寄与しないことを明らかにした。

以上のことから、研究代表者は、未だ分子レベルでの同定に至っていない、様々な医薬品を認識し細胞内に取り込む新規 pH 依存性輸送担体が存在するという作業仮説を提唱するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、既知の輸送担体では説明できない、輸送実体が明らかになっていない多様な医薬品を認識し、生体膜の透過を担う新規 pH 依存性輸送担体の存在を明らかにすることを目的とした。また、ヒト小腸に発現している H^+ /オリゴペプチド共輸送担体 PEPT1 は、ペプチド様構造を持たない化合物をも認識・輸送する能力を有していることから⁴⁾、PEPT1 の基質特異性についても再評価を行うこととした。

3. 研究の方法

- (1) ヒト H^+ /オリゴペプチド共輸送担体 PEPT1 を大量発現させた HeLa 細胞を用いて、PEPT1 の輸送活性に対する各種化合物の影響について検討した。典型的な基質化合物として、ジペプチドである ^3H -Gly-Sar を用い、液体シンチレーションカウンターにて定量した。
- (2) pGH19/PEPT1 から cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入することで PEPT1 発現アフリカツメガエル卵母細胞を得た。電気生理学的手法 (二電極膜電位固定法) を用いて各種化合物の灌流に伴う誘起電流を測定し、輸送活性を見積もった。さらに、放射性同位体標識化合物の取り込みについても、PEPT1 発現アフリカツメガエル卵母細胞を用いて測定した。
- (3) 各種臓器由来細胞株あるいは初代培養肝細胞および腎刷子縁膜小胞を既報^{5,6)}に準じて調製し、実験に供した。pH 依存性有機アニオン輸送担体の機能同定を行うべく、基質として fluorescein およびその誘導体あるいは 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) 等の放射性同位体標識化合物を用い、細胞内外への基質の輸送量を定量した。

4. 研究成果

- (1) 小腸上皮細胞刷子縁膜側に発現する H^+ /オリゴペプチド共輸送担体 PEPT1 はアニオン性薬物を輸送するのか？

多彩な基質認識性を有する PEPT1 が、輸送実体が解明されていないアニオン性化合物の輸送にも関与するか否かを明らかにするために、PEPT1 を安定的に高発現させた HeLa 細胞を用い、典型的な基質である Gly-Sar の細胞内外への輸送に対する種々のアニオン性化合物の影響について検討した。その結果、Gly-Sar の細胞内への取り込みはカルボン酸構造を有する化合

物によって顕著に阻害された。また、Gly-Sar の細胞外排出に対しては、一部のアニオン性化合物が *trans-stimulation* 効果を示したことから、PEPT1 がペプチド様構造を持たないアニオン性化合物をも認識していることが示された。そこで、PEPT1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、二電極膜電位固定法により、アニオン性化合物を灌流させた際に生じる内向き誘起電流の測定を試みた。その結果、Gly-Sar の細胞外排出に対して *trans-stimulation* 効果を示したアニオン性化合物については、Gly-Sar 同様に内向き誘起電流が認められた。一方で、アニオン性薬物であるアトルバスタチンは、Gly-Sar 取り込みに対する強い阻害作用を示したものの、*trans-stimulation* 効果や内向き誘起電流は認められなかった。以上より、PEPT1 を介した相互作用の様式は化合物が持つカルボン酸以外の母核構造の影響を受けている可能性が示されたものの、PEPT1 は対象としている医薬品の輸送を担う分子実体ではないことが明らかとなった。

(2) 新規 pH 依存性有機アニオン輸送担体の基質認識性

研究代表者らは、肝臓のみならず様々な組織に既知の有機アニオン輸送担体とは異なる、新たな pH 依存性有機アニオン輸送担体が存在していることを見出した。そこで、アニオン性薬物モデルとして fluorescein を用い、pH 依存性有機アニオン輸送担体の基質認識性について評価した。pH 依存的な fluorescein の取り込みは、2,4-D や NSAIDs をはじめとするアニオン性薬物により阻害された。これらの薬物の共通点として、構造中にカルボン酸を有していることが明らかになった。更に、比較的嵩高い薬物を含む種々のカルボン酸化合物は、fluorescein の細胞外排出に対して *trans-stimulation* 効果を示したことから、カルボン酸化合物は fluorescein と共通の輸送担体を介して細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。実際、2,4-D やインドール酢酸等のカルボン酸化合物の取り込みについて検討したところ、顕著な pH 依存性が認められた。これらのことから、本輸送担体は既知の H⁺/モノカルボン酸共輸送担体 MCT とは異なり、比較的ブロードな基質認識性を備えていることが示された。2,4-D は肝・腎機能障害を引き起こすことが知られており、そのメカニズムの一端として Na⁺/モノカルボン酸共輸送担体 SMCT1 が 2,4-D の組織への蓄積に関わっていることを報告している。⁴⁾今回得られた知見は、pH 依存性有機アニオン輸送担体もまた、2,4-D 等の薬物の体内動態に関わっていることを示唆するものであり、薬剤性組織障害の観点からも興味深い発見であると考えられる。

以上より、本研究において、既知の有機アニオン輸送担体とは異なる新規 pH 依存性輸送担体が医薬品を認識し得ることが示された。この成果は、新たな薬物の送達法の立案や副作用発現機序の解明などにつながる薬物動態を考える上で重要な知見である。最適な体内動態を示す薬物のデザイン、薬物間相互作用の予測および回避戦略へと応用可能であり、今後の研究のさらなる展開が期待される。

<引用文献>

- 1) Futagi Y., **Sasaki S.**, Kobayashi M., Narumi K., Furugen A., Iseki K. The flexible cytoplasmic loop 3 contributes to the substrate affinity of human monocarboxylate transporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017 Oct;1859(10):1790-1795.
- 2) **Sasaki S.**, Futagi Y., Ideno M., Kobayashi M., Narumi K., Furugen A., Iseki K. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016 Jun;31(3):218-23.
- 3) **Sasaki S.**, Futagi Y., Kobayashi M., Ogura J., Iseki K. Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J Biol Chem.* 2015 Jan 23;290(4):2303-11.
- 4) Omori A., Fujisawa Y., **Sasaki S.**, Shimono K., Kikukawa T., Miyauchi S. Protonation State of a Histidine Residue in Human Oligopeptide Transporter 1 (hPEPT1) Regulates hPEPT1-Mediated Efflux Activity. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(5):678-685.
- 5) Sugio K., Inoda D., Masuda M., Azumaya I., **Sasaki S.**, Shimono K., Ganapathy V., Miyauchi S. Transport of 2,4-dichloro phenoxyacetic acid by human Na⁺-coupled monocarboxylate transporter 1 (hSMCT1, SLC5A8). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019 Feb;34(1):95-103.
- 6) Miyauchi S., Masuda M., Kim S.J., Tanaka Y., Lee K.R., 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.* 2018 Mar;46(3):259-267.

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuaki Sugio, Daisei Inoda, Masayuki Masuda, Isao Azumaya, Shotaro Sasaki, Kazumi Shimono, Vadivel Ganapathy, Seiji Miyauchi.	4. 巻 34(1)
2. 論文標題 Transport of 2,4-dichloro phenoxyacetic acid by human Na ⁺ -coupled monocarboxylate transporter 1 (hSMCT1, SLC5A8).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 95-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2018.10.004.	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 Akiko Omori, Yuki Fujisawa, Shotaro Sasaki, Kazumi Shimono, Takashi Kikukawa, Seiji Miyauchi	4. 巻 44(5)
2. 論文標題 Protonation State of a Histidine Residue in Human Oligopeptide Transporter 1 (hPEPT1) Regulates hPEPT1-Mediated Efflux Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 678-685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-01013.	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33件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 蛍光基質を用いたA549細胞における有機アニオン輸送の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮内正二、増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実
2. 発表標題 濃縮型核酸輸送担体 (CNT3, SLC28A3) による多彩な基質認識機構
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹彩奈、伊藤遥、土井真奈美、杉尾和昭、増田雅行、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 尿管上皮細胞に局在する輸送担体の機能解析：ブタ腎刷子縁膜ベシクルを用いた検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 難部仁美、若月萌、野口歩美、杉尾和昭、増田雅行、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 ヒト肺上皮細胞における蛍光物質を輸送するpH依存性有機アニオン輸送担体の機能同定
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝口貴晴、増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 腎再吸収に関与する新規pH依存性輸送担体を介した腎障害性有機アニオン化合物の輸送
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020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 (SLC5A8, SMCT1) の新たな基質認識機構および生理的意義の解明
3. 学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝口貴晴、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 腎再吸収に関与する新規pH依存性輸送担体を介した腎障害性有機アニオン化合物の輸送
3. 学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木将太郎
2. 発表標題 薬物を認識するpH依存性輸送担体
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2019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 尿酸輸送担体とNa ⁺ /モノカルボン酸共輸送担体とのアニオンカップリング機構の解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 濃縮型核酸輸送担体 (CNT3, SLC28A3) の基質認識機構の解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森明子、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 熱力学的解析手法を用いた大腸菌H ⁺ /オリゴペプチドトランスポーター(YdgR)の有する多様な基質認識機構の解明
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木将太郎、菅野美生、日改祐太、石川龍、杉尾和昭、増田雅行、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 ニコチン酸によるオリゴペプチド輸送担体PEPT1の機能調節
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019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 SMCT1の多彩な基質認識機構と腎再吸収機構における役割
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森明子、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 熱力学的解析手法を用いたH ⁺ /オリゴペプチドトランスポーター(YdgR)の有する多様な基質認識機構の解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019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 尿酸輸送担体とNa ⁺ /モノカルボン酸共輸送担体とのアニオンカップリング機構の解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田雅行、小林朱音、國貞直人、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 ヒト肝癌由来HepG2細胞におけるNa ⁺ /オリゴペプチド共輸送担体の機能解析
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野美生、日改祐太、増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実
2. 発表標題 H ⁺ /オリゴペプチド共輸送担体PEPT1の多彩な基質認識機構
3. 学会等名 日本薬学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島隼矢、田中丈希也、小野和、佐々木将太郎、増田雅行、宮内正二
2. 発表標題 Na ⁺ 依存性胆汁酸輸送担体(NTCP)を介したtaurocholate efflux過程における対向輸送促進効果
3. 学会等名 日本薬学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木将太郎、増田雅行、杉尾和昭、宮内正二
2. 発表標題 ヒト気道上皮由来細胞株におけるNa ⁺ 依存性rhodamine 123輸送の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮内正二、増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実、小西良士、塚本郁子
2. 発表標題 多彩な基質認識能力を示すヒト濃縮型核酸輸送担体(CNT3, SLC28A3)を介した核酸誘導体aciclovir and ganciclovirの輸送機構
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Masuda, Kazuaki Sugio, Shotaro Sasaki, Kazumi Shimono, Ryoji Konishi, Ikuko Tsukamoto, Seiji Miyachi
2. 発表標題 Human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3, SLC28A3) has versatile ability to transport nucleoside analogues, aciclovir and ganciclovir
3. 学会等名 2019 American Association of Pharmaceutical Scientist Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木将太郎、杉尾和昭、増田雅行、宮内正二
2. 発表標題 ヒト腎尿細管由来細胞におけるモノカルボン酸輸送担体を介したフルオレセイン取り込み
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中文希也、中島隼矢、小野和、増田雅行、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 Na ⁺ 依存性胆汁酸輸送担体(NTCP)を介したtaurocholate efflux過程に対する基質依存性-対向輸送促進効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木将太郎、増田雅行、杉尾和昭、宮内正二
2. 発表標題 アニオン性医薬品fluoresceinの輸送に対するモノカルボン酸化合物の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮内正二、増田雅行、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実、榊原紀和、小西良士、塚本郁子
2. 発表標題 VEGF/NGF mimicな核酸アナログCOA-CIを認識、輸送する輸送担体の同定
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木将太郎、石川龍、大熊宏、杉尾和昭、増田雅行、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 有機アニオン輸送担体の基質薬物とオリゴペプチド輸送担体 (PEPT1) との相互作用
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森明子、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 熱力学的解析手法を用いたH ⁺ /オリゴペプチドトランスポーター (YdgR) の多様な基質認識に起因する相互作用の検討
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉尾和昭、猪田大誠、増田雅行、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 腎尿細管Na ⁺ /モノカルボン酸共輸送担体によるアミノ酸輸送分子機構の解明
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木将太郎、杉尾和昭、増田雅行、宮内正二
2. 発表標題 腎尿細管に機能発現するpH依存性有機アニオン輸送担体はフェノキシ酢酸系除草剤の再吸収に關与する
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田雅行、田中丈希也、中島隼矢、小野和、佐々木将太郎、宮内正二
2. 発表標題 様々な有機アニオンによる胆汁酸の対向輸送促進効果
3. 学会等名 第3回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木将太郎、杉尾和昭、増田雅行、宮内正二
2. 発表標題 腎尿細管におけるpH依存性モノカルボン酸輸送担体を介した腎毒性物質の再吸収機構
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田雅行、府川和樹、杉尾和昭、佐々木将太郎、下野和実、宮内正二
2. 発表標題 濃縮型核酸輸送担体 (CNT3, SLC28A3) の基質認識機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大森 明子、浅倉 祐未、佐々木 将太郎、下野 和実、宮内 正二
2. 発表標題 熱力学的解析手法を用いた H ⁺ / オリゴペプチドトランスポーター YdgR の多様な基質認識に起因する相互作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム http://www.lab2.toho-u.ac.jp/phar/doutai/seitaimaku41/</p>

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