

平成21年5月11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790384

研究課題名（和文） トランスポーター輸送のリアルタイムイメージング

研究課題名（英文） Real-time imaging of carrier-mediated transport

研究代表者

山口 浩明（YAMAGUCHI HIROAKI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：80400373

研究成果の概要：本研究では、トランスポーターを介した物質輸送のリアルタイムイメージングを行った。プローブとして、トランスポーター輸送基質の化学構造を考慮した蛍光標識体を調製した。トランスポーター安定発現細胞における蛍光プローブの取り込み過程をセルフファンクションイメージャーにて観察したところ、細胞内に蛍光プローブが時間依存的に濃縮的に取り込まれることが視覚的に証明され、取り込まれた蛍光プローブの細胞内局在まで明らかにすることが可能となった。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 420,000 | 3,620,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物輸送学、リアルタイムイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内で起こっている様々な生体反応を「みる」ために、バイオイメージングに関する研究が世界中で盛んに行われている。こうした動きの中で、生体内の内因性物質や薬物の膜透過機構に関するバイオイメージングに関する研究は未発展である。その理由として、これまでトランスポーターの機能評価には、ラジオアイソトープ標識体が主に用いられていることが挙げられる。

(2) トランスポーターの生体内における重

要性をこれまでとは異なった切り口から証明することが可能となり、創薬への応用や他分野との融合も期待できる。

(3) これまでに研究代表者等はトランスポーターを介した膜透過機構イメージングの先駆けとして、肝臓に発現する有機アニオントランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 の基質となる蛍光標識胆汁酸を合成し、生細胞における蛍光基質取り込み画像の撮影に成功している。

2. 研究の目的

トランスポーターを介した物質輸送のリアルタイムなイメージングを行い、トランスポーター輸送のダイナミック解析系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 新規蛍光ラベル化合物（基質候補化合物）の調製：薬物の体内動態を制御するトランスポーターである有機アニオントランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリーについての輸送基質として報告されている化合物の蛍光標識化を行った。

(2) トランスポーター発現細胞を用いた蛍光ラベル化合物の輸送活性評価：トランスポーター (OATP1B1 および OATP1B3) を恒常的に発現させた細胞株を用いた輸送実験を行った。蛍光化合物の取り込み量は、細胞を溶解した後、蛍光強度を観察した。

(3) リアルタイムイメージング：セルフファンクションイメージャー IN Cell Analyzer 1000 を使用した。蛍光ラベル化合物の基質濃度を、イメージングコントラストが最大（シグナル/バックグラウンド比が最高）となるように設定した後、蛍光基質細胞膜輸送の取り込み速度や細胞内分布等についてイメージング解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規プローブとして、DY-675 (DYOMICS 社) で標識したケノデオキシコール酸 (CDCA-DY-675) 並びに Cy5 標識ケノデオキシコール酸 (CDCA-Cy5) 合成した。

(2) 有機アニオントランスポーターである OATP1B1 および OATP1B3 を発現させた細胞における上記二化合物の輸送実験を行ったところ、CDCA-DY-675 は OATP1B1 の基質とならず、OATP1B3 の基質になることが明らかとなった。一方で、CDCA-Cy5 は OATP1B1 および OATP1B3 両トランスポーターの基質とならないことが明らかとなった。

(3) 続いて、以前に研究代表者が報告している 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) で標識したケノデオキシコール酸 (CDCA-NBD)、ならびに今回合成した CDCA-DY-675 を蛍光プローブとして、セルフファンクションイメージャーを用いて、OATP1B3 を介した輸送イメージングを画像解析した。その結果、CDCA-NBD、CDCA-DY-675 とともに濃縮的な取り込みが認められ、取り込まれた蛍光プローブは、細胞質に存在することが明らかとなった。また、同一細胞を経時的に追跡したところ、時間依存的な取り込み量の増加（細胞内シグナル/バックグラウンド比の増加）が視覚的に確認された。

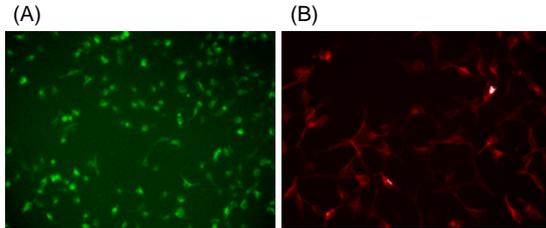


図1. OATP1B3発現細胞におけるCDCA-NBD (A) およびCDCA-DY-675 (B) 取り込みのイメージング

(4) OATP1B1 および OATP1B3 により輸送が確認されている NBD 標識胆汁酸を蛍光プローブとして、セルフファンクションイメージャーによる、輸送イメージングを画像解析した。その結果、OATP1B1 細胞においては NBD 標識リトコール酸が、OATP1B3 発現細胞においては CDCA-NBD が最も濃縮的に取り込まれ、取り込まれた蛍光プローブは、細胞質に存在することが明らかとなった。また、同一細胞における経時的な取り込み量の増加が視覚的に確認された。阻害剤添加時には、それらの感受性に依存して取り込み量の低下が観察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 山口浩明ら、ほか8名、Rapid screening of antineoplastic candidates for the human organic anion transporter OATP1B3 substrates using fluorescent probes、Cancer Lett、260巻、163-169、2008、査読有
- ② 菱沼隆則、鈴木香織、山口浩明ら、ほか6名、Simple quantification of lansoprazole and rabeprazole concentrations in human serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry、J Chromatogr B、870巻、38-45、2008、査読有
- ③ Cornelia de Wolf、Robert Jansen、山口浩明ら、ほか5名、Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides、Mol Cancer Ther、7巻、3092-3102、2008、査読有
- ④ 菱沼隆則ら、ほか8名(4番目)、Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid

chromatography/tandem mass spectrometry: the effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 76巻、321-329、2007、査読有

[学会発表] (計21件)

1. 竹内俊子、山口浩明、岡田匡弘、阿部高明、菱沼隆則、後藤順一、島田美樹、眞野成康、有機アニオントランスポーターOATP1B1 及びOATP1B3 と相互作用する抗生物質の探索、第47回日本薬学会東北支部大会、2008年10月26日、岩手
2. 杉江美佐、山口浩明、岡田匡弘、阿部高明、後藤順一、菱沼隆則、島田美樹、眞野成康、有機アニオントランスポーターOATP4C1 によるEstrone-3-sulfateの輸送特性、第47回日本薬学会東北支部大会、2008年10月26日、岩手
3. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康、NanoLC/ESI-MS/MSを用いる血清プロテオーム解析法の構築に関する検討、第48回日本臨床化学会年次学術集会、2008年8月31日、浜松
4. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康、NanoLC/ESI-MS/MSによる血清プロテオームの高感度分析のための基盤研究、第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2008年8月8日、札幌
5. 鈴木香織、菱沼隆則、山口浩明、山岸初志、大原秀一、下瀬川徹、後藤順一、島田美樹、眞野成康、LC/MS/MSを用いたランソプラゾール及びラベプラゾール簡易定量法の構築とその血清中濃度解析、第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2008年8月8日、札幌
6. 山口浩明、杉江美佐、岡田匡弘、阿部高明、後藤順一、菱沼隆則、島田美樹、眞野成康、腎臓特異的発現有機アニオントランスポーターOATP4C1 の機能解析、第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2008年8月8日、札幌
7. 山口浩明、佐藤真由美、阿部幸平、菱沼隆則、後藤順一、眞野成康、医療従事者の抗がん剤暴露調査を目的とするシクロホスファミドの高感度LC/MS/MS分析、第15回クロマトグラフィーシンポジウム、2008年5月19日、静岡
8. 竹内俊子、山口浩明、小林美奈子、岡田匡弘、種本雅之、海野倫明、阿部高明、菱沼隆則、後藤順一、島田美樹、眞野成康、蛍光プローブを用いたOATP1B3 輸送
9. 抗がん剤のスクリーニング、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、2008年5月19日、仙台
9. 杉江美佐、山口浩明、岡田匡弘、豊原敬文、種本雅之、阿部高明、後藤順一、菱沼隆則、島田美樹、眞野成康、有機アニオントランスポーターOATP4C1 を介したestrone-3-sulfate輸送、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、2008年5月19日、仙台
10. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、島田美樹、眞野成康、NanoLC/ESI-MS/MSを用いた血清プロテオームの高感度分析に関する検討、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、2008年5月19日、仙台
11. 山口浩明、岡田匡弘、三日市剛、海野倫明、阿部高明、小野栄夫、大和田祐二、近藤尚武、菱沼隆則、後藤順一、島田美樹、眞野成康、脳局在型胆汁酸トランスポーターSLC10A4 の機能解析、第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム、2008年5月19日、仙台
12. 佐藤真由美、阿部幸平、山口浩明、菱沼隆則、後藤順一、眞野成康、暴露調査を目的とするシクロホスファミドの高感度LC/MS/MS分析、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
13. 杉江美佐、山口浩明、岡田匡弘、豊原敬文、種本雅之、阿部高明、後藤順一、菱沼隆則、眞野成康、腎臓に局在する有機アニオントランスポーターOATP4C1 によるエストロン-3-サルフェート輸送、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
14. 岡田匡弘、山口浩明、三日市剛、海野倫明、阿部高明、小野栄夫、大和田祐二、近藤尚武、菱沼隆則、後藤順一、眞野成康、脳黒質に発現する胆汁酸トランスポーターの機能解析、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
15. 眞野成康、阿部幸平、柳澤勇、森大、山口浩明、後藤順一、胆汁酸刺激による細胞内プロテオーム変動解析、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
16. 森大、阿部幸平、山口浩明、後藤順一、眞野成康、NanoLC/ESI-MS/MSによる血清プロテオーム解析の高感度化に関する研究、日本薬学会第128年会、2008年3月28日、横浜
17. 山口浩明、菱沼隆則、遠藤尚美、塚本宏樹、岸川幸生、佐藤真由美、村井ユリ子、平塚真弘、伊藤潔、八重樫伸生、後藤順一、眞野成康、パクリタキセルの体内動態に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子多型、第1回次世代を担う若手医療薬科学

シンポジウム、2007年12月15日、
渋谷

18. 岡田匡弘、山口浩明、小林美奈子、竹内俊子、種本雅之、海野倫明、阿部高明、菱沼隆則、後藤順一、眞野成康、トランスポーター輸送の可視化に関する研究、第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2007年11月27日、仙台
19. 山口浩明、薬物トランスポーターを機能性器材として活用する薬物治療法の開発、日本薬学会東北支部第6回医療薬学若手研究者セミナー、2007年11月10日、仙台
20. 鈴木香織、齋藤昌良、山口浩明、村井ユリ子、山岸初志、小池智幸、大原秀一、下瀬川徹、菱沼隆則、眞野成康、後藤順一、LC/MS/MSを用いた微量ヒト血清中ランソプラゾール及びラベプラゾール簡易定量法の構築とその臨床応用、第18回クロマトグラフィー科学会議、2007年11月8日、函館
21. 松本洋太郎、上西智子、山口浩明、佐藤真由美、小川則彦、後藤昌史、里見進、菱沼隆則、後藤順一、眞野成康、シロリムスからミコフェノール酸モフェチルに投与変更した脾臓移植患者におけるTDM、第17回日本医療薬学会年会、2007年9月29日、前橋

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 浩明(YAMAGUCHI HIROAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号:80400373