

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390161

研究課題名（和文）薬物輸送タンパク質の多型情報に基づく分子標的化学療法薬の個別化治療戦略

研究課題名（英文）Strategy for the personalized medicine of molecular target drug based on the polymorphism information of plasma protein

研究代表者

丸山 徹（MARUYAMA TORU）

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸菌を宿主として糖鎖を持たない $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質（AGP）を作製し、AGP アポ体及び AGP/薬物複合体の X 線結晶構造解析を行い、AGP の薬物結合サイトのトポロジー及び variant 間における結合選択機構を解明した。加えて、AGP の肝取り込み経路について検討した結果、AGP が hemoglobin beta-subunit を介した caveolae/lipid rafts 介在性エンドサイトーシスによって取り込まれること、それに伴い結合薬物の体内動態にも影響を及ぼす可能性を初めて見出した。

研究成果の概要（英文）：We determined the crystal structures of complexes of the A variant AGP with some drugs. Comparison of our results with the structure of F1*S variant provides important new insights into the mechanism of the drug-binding selectivity of AGP variants. In addition, we explored the mechanism involved in hepatic cellular uptake of AGP. The findings indicate that hemoglobin beta-subunit contributes to the hepatocellular uptake of AGP, and AGP is incorporated *via* caveolae/lipid rafts pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：血清タンパク質、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質、多型情報、体内動態、タンパク結合

1. 研究開始当初の背景

薬物の体内動態における個体差の全貌を明らかにするためには、吸収・分布・代謝・排泄（ADME）に関与する機能タンパク質の多型情報を把握する必要がある。そのうち、血中薬物輸送タンパク質は薬物の組織への分布や薬物血中濃度すなわち薬理効果を左右する重要な機能タンパク質であるが、最近では、アルブミンや $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質（AGP）など

の代表的な輸送タンパク質にも遺伝的あるいは翻訳後修飾化多型が多種存在すること、またそれが原因で薬物のタンパク結合特性に個体差を生じることが見出されている。そのため、タンパク結合性の極めて高い薬物の個別化投薬を実現するには、結合過程における個体差の全貌を明らかにし、その情報を適切に把握しておくことが重要である。

2. 研究の目的

本研究は薬物の個別化投薬を実践する上で必要な体内動態での個体差のうち、基盤情報が不足している α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の多型情報と薬物結合特性の関係から、結合過程における個体差を明らかにし、個別化投薬における基盤情報を構築する。

3. 研究の方法

(1) AGP アポ体及び AGP 結合性リガンドとの複合体の X 線結晶構造解析を行い、AGP 分子上のリガンド結合サイトのトポロジー解析、並びに、それを基盤としたバリエーション間の薬物結合選択機構の解明を行う。

(2) AGP の主要移行臓器である肝臓における細胞内取り込み機構の解明を目的として、生化学的及び細胞生物学的手法により検討を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト α 1-酸性糖タンパク質バリエーションに関する構造生物学的研究

1) バリエーション間の薬物結合選択機構において重要と考えられる A 体の構造決定を行うため、糖鎖を持たない組換え型 A 体 (rA) の作製を試みた。しかしながら、作製した rA は、遊離の Cys149 が高い反応性を示し、分子が不均一となっていたため、A 体の Cys149 を F1*S 体の 149 位のアミノ酸残基である Arg に置換した変異体 C149R を作製したところ、均一なサンプルの調製に成功した。また、作製した C149R が血清由来の A 体と同等の構造及びリガンド結合特性を保持していることを確認した。

2) PEG4000 を沈殿剤とする結晶化条件で C149R の結晶が得られ、多波長異常分散法 (MAD 法) を行うために、セレノメチオニル化 C149R (SeMet C149R) を作製し、その結晶化も行った。さらに、A 体に選択的に結合するジソピラミド (DSP) を用いて、C149R/DSP 複合体の結晶を調製し、これらの結晶を用いて X 線回折実験を行った。MAD 法による C149R の構造解析中に F1*S 体の構造が報告された

ため、その構造を用いた分子置換法により構造を決定した。また、C149R/DSP 複合体の構造から A 体による DSP の結合様式を明らかにした。

3) 今回明らかにした A 体 (C149R) と、F1*S 体の構造を比較したところ、バリエーション間における 112-117 位と 156 位のアミノ酸残基の置換が引き金となり、A 体は F1*S 体と比べて結合ポケットの入り口が狭くなっていることが判明した。また、このことがバリエーション間における薬物結合選択機構に関与しているものと推察された (Fig. 1)。

4) C149R/DSP 複合体の結晶構造から、DSP の結合に関与するアミノ酸残基を同定した。中でも、A 体が DSP に対する強い親和性を持つには、Phe112 と Ser114 が重要であることが示唆された (Fig. 2)。

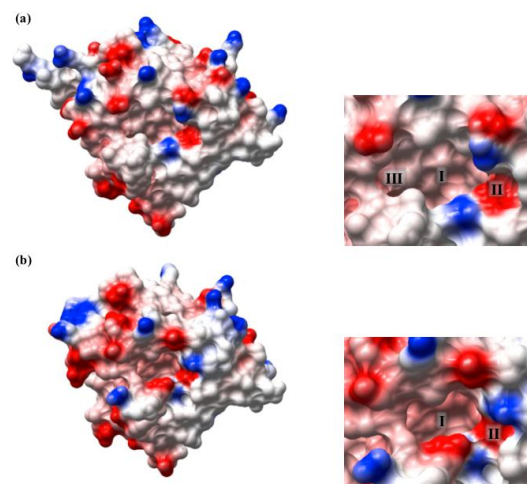


Fig.1 Comparison of ligand-binding pockets between AGP variants. Electrostatic surface representation of F1*S variant (a) and A variant (b).

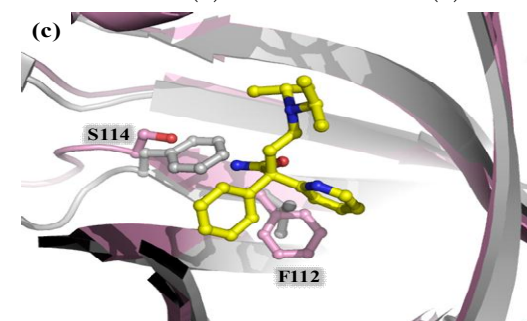


Fig. 2 Binding mode of DSP to A variant

5) A 体については、既に構造解析された薬物 (アミトリプチン、クロルプロマジン) と類似した骨格を持つイミプラミン及びチオリダジンの複合体結晶構造を決定し、それらの結合様式を明らかにした。イミプラミンの芳香環部分は、既存の結合部位で認識されていたのに対し、チオリダジンの芳香環部分は、この結合部位の他に、Phe32、Ser114 といった新たな部位で認識されていることが分かった。このことから、A 体は、今回明らかになったチオリダジン結合部位を含めた領域で、Phe49、Arg90、Phe112 残基を中心とした相互作用を形成し、類似骨格を持つ薬物を認識することが明らかとなった (Fig. 3)。

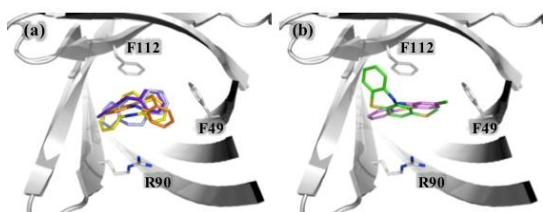


Fig. 3 Binding modes of the aromatic rings to the A variant. (a) Binding modes of the A-specific drugs to the A variant. AMT, DSP, IMP1 and IMP3 are depicted as blue, purple, yellow and orange sticks, respectively. The protein residues involved in the interactions are shown as sticks. (b) Binding modes of the non-specific drugs to the A variant. CPZ and TRZ are depicted as green and pink sticks, respectively.

以上、本研究では新たな A 体/薬物複合体の X 線結晶構造解析により、A 体における類似骨格を持つ薬物の認識部位を詳細にマッピングすることに成功した。これらの知見は、AGP 結合型薬物の体内動態や臨床効果の予測、*in silico* での AGP 結合特性を考慮した医薬品開発、及び AGP の生理学的機能を解明する上で有益な基礎資料になるものと考えられる。

(2) α_1 -酸性糖タンパク質の肝細胞取り込み機構の解明

1) HepG2 細胞における FITC-AGP の取り込みをフローサイトメーター及び蛍光顕微鏡を

用いて評価した結果、濃度及び時間依存的な細胞内取り込みが観察された。また、4°C 条件下及び 100 倍量の非標識 AGP 共存下で、FITC-AGP の取り込みが著しく阻害されたことから、本蛍光ラベル体はエンドサイトーシスによって特異的に細胞内へ取り込まれる可能性が強く示唆された。

2) FITC-AGP のエンドサイトーシス経路の解明を目的として、種々の阻害剤に対する影響を検討したところ、methyl- β -cyclodextrin 及び filipin 存在下では FITC-AGP の有意な取り込み阻害が観察された。一方、chlorpromazine 添加時には、阻害効果が見いだされなかったことから、FITC-AGP は clathrin 経路ではなく、caveolae/lipid rafts を介した経路でエンドサイトーシスされるものと推察された。

3) ヘモグロビン・鎖 (HBB) の HepG2 細胞における局在を、抗 HBB 抗体を用いた免疫蛍光染色法により検討した結果、HBB が細胞膜表面に発現していることが判明した。さらに、二重免疫染色法により HBB の一部は caveolin-1 と共局在している可能性が強く示唆された。

4) AGP とヘモグロビン (Hb) のプルダウンアッセイに加え、外因的に Hb を培地中に共存させたところ、Hb の濃度に依存して FITC-AGP の有意な取り込み阻害が観察された。このことから、AGP の細胞内取り込み過程において、細胞膜表面に発現する HBB との相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

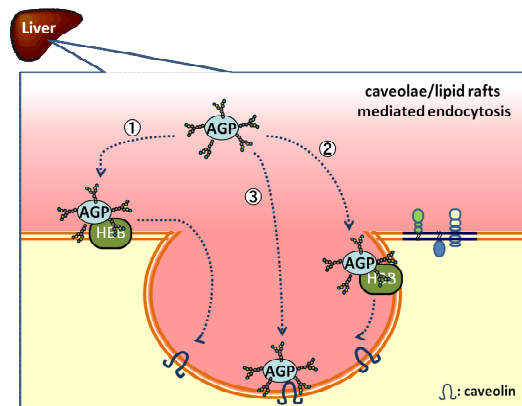


Fig.4 Proposed three endocytic models of AGP into liver parenchymal cells

AGP の肝細胞への取り込み機構には、細胞

膜に発現する HBB との相互作用を介した caveolae/lipid rafts 介在性エンドサイトーシスが関与する可能性を見出した。今回得られた知見は、AGP 結合薬物、中でも結合性の堅固な分子標的治療薬の体内動態における個人間差の解明、引いては個別化治療戦略を構築する上での有用な基礎資料になるものと思われる (Fig. 4)。

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 17 件)

1. Anraku M, Takeuchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Kitamura K, Tomita K, Kuniyasu A, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidant properties of human serum albumin in hemodialysis patients. *J Pharm Sci*. 査読有 2011 (in press)
2. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S, Otagiri M. Structural insights into differences in drug binding selectivity between two forms of human alpha₁-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. *J Biol Chem*. 査読有 2011 (in press)
3. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicles prevents *Escherichia coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J Pharmacol Exp Ther*. 査読有 337, 201-208 (2011)
4. Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, Kotani S, Nakajima M, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有 2011 (in press)
5. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin encapsulated liposomes (hemoglobin-vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos*. 査読有 39, 484-489 (2011)
6. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kawai K, Komatsu T, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Superior plasma retention of a cross-linked human serum albumin dimer in nephrotic rats as a new type of plasma expander. *Drug Metab Dispos*. 査読有 38, 2124-2129 (2010)
7. Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Fukagawa M. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial*. 査読有 15, 129-131 (2011)
8. Taguchi K, Miyasato M, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J Pharm Sci*. 査読有 100, 775-783 (2011)
9. Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin-vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 査読有 248, 234241 (2010)
10. Ikuta S, Chuang VTG, Ishima Y, Nakajou K, Furukawa M, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Albumin fusion of thioredoxin-the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications. *J Control Release*. 査読有 147, 17-23 (2010)
11. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, Otagiri M. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective

- therapeutics. J Control Release. 査読有 145, 9-16 (2010)
12. Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. FEBS Lett. 査読有 584, 2816-2820 (2010)
 13. Nishi K, Fukunaga N, Ono T, Akuta T, Yumita N, Watanabe H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Construction of an expression system for human α_1 -acid glycoprotein in *E. coli*: the role of oligosaccharide moieties on structural and functional properties. Drug Metab Pharmacokinet. 査読有 25, 200-207 (2010)
 14. Matsumoto K, Nishi K, Kikuchi M, Watanabe H, Nakajou K, Komori H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Receptor-mediated uptake of human α_1 -acid glycoprotein into liver parenchymal cells in mice. Drug Metab Pharmacokinet. 査読有 25, 101-107 (2010).
 15. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. Drug Metab Dispos. 査読有 37, 2197-2203 (2009)
 16. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. Drug Metab Dispos. 査読有 37, 1456-1463 (2009)
 17. Nishi K, Ueno M, Murakami Y, Fukunaga N, Akuta T, Kadowaki D, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. A site-directed mutagenesis study of drug-binding selectivity in genetic variants of human α_1 -acid glycoprotein. J Pharm Sci. 査読有 98, 4316-4326 (2009)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 宮本洋平、岩尾康範、米良克美、渡邊博志、門脇大介、異島優、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発メカニズム 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)
 2. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、門脇大介、小田切優樹、丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝 CYP 保護効果. 日本薬学会第 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)
 3. 本田大輔、宮本洋平、渡邊博志、門脇大介、丸山徹、小田切優樹 尿毒症物質 p-cresyl sulfate の酸化ストレスに及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)
 4. 和泉実代子、中村照也、小野知実、渡邊博志、山縣ゆり子、小田切優樹、丸山徹 α_1 -酸性糖タンパク質の薬物結合部位に関する構造生物学的研究 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)
 5. 田中遼大、古川真斗、異島優、田中健一郎、水島徹、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹. BLM 誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)
 6. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹. 一酸化炭素を付加した赤血球は大量出血時における肝チトクローム P450 を保護する. 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)
 7. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 CMPF の生体内レドックス特性 第 27 回臨床フリーラジカル会議 (京都, 烟川, 2010, 12/3-4)
 8. Komori H, Watanabe H, Syuto T, Maruyama T, Otagiri M α_1 -acid glycoprotein enhances the expression of hemoglobin scavenge receptor CD163 through the activation of TLR4 signaling 第 4 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (東京大学武田先端知ビル, 2010, 11/27-28)
 9. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M Involvement of hemoglobin beta-chain on

- plasma membrane in uptake of human alfa1-acid glycoprotein into liver The Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, 2010 11/14-18, New Orleans
10. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球のチトクロームP450の保護効果. 第17回日本血液代替物学会 (熊本国際交流会館, 2010, 10/18-19)
 11. Miyoko Izumi, Tomomi Ono, Teruya Nakamura, Koji Nishi, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, Yuriko Yamagata, Masaki Otagiri X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC STUDY OF HUMAN ALPHA1-ACID GLYCOPROTEIN AND DRUG COMPLEX 日本薬物動態学会 第25回年会 (大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)
 12. Kohei Nagumo, Tsuyoshi Sugimori, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Kazuyuki Kubota, Naoyuki Yamada, Masaki Otagiri and Toru Maruyama. CHARACTERIZATION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN PATIENTS WITH LIVER DISEASE 日本薬物動態学会 第25回年会 (大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)
 13. 田中遼大, 古川真斗, 異島優, 田中健一郎, 水島徹, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹. IMPROVED THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS 日本薬物動態学会 第25回年会 (大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)
 14. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M Hepatic uptake of alfa1-acid glycoprotein through hemoglobin beta-chain-mediated endocytic pathway 9th International ISSX meeting, 2010 9/4-8, Istanbul
 15. Komori H, Watanabe H, Syuto T, Maruyama T, Otagiri M alfa1-酸性糖タンパク質による CD163 の発現誘導 第35回西日本薬剤学研究会 (大分, 九重共同研修所, 2010, 9/17-18)
 16. 和泉実代子, 小野知実, 中村照也, 西弘二, 渡邊博志, 丸山徹, 山縣ゆり子, 小田切優樹 ヒト alfa₁-酸性糖タンパク質/薬物複合体の X 線結晶構造解析 第25回日本薬剤学会(あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5 /11-14)
 17. 宮本洋平, 岩尾康範, 渡邊博志, 門

- 脇大介, 佐藤圭創, 小田切優樹, 丸山徹 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発機序解明 第25回日本薬剤学会 (あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5/11-14)
18. 大柿滋, 田口和明, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝チトクローム P450 の保護効果. 第25回日本薬剤学会(あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5 /11-14)

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 徹 (MARUYAMA TORU)
 熊本大学・薬学部・教授
 研究者番号：90423657

(3) 連携研究者

小田切 優樹 (OTAGIRI MASAKI)
 崇城大学・薬学部・教授
 研究者番号：80120145
 渡邊 博志 (WATANABE HIROSHI)
 熊本大学・薬学部・講師
 研究者番号：70398220