

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590054

研究課題名（和文） 膜インターフェイスでの血清タンパク介在性薬物輸送機構の解明

研究課題名（英文） Study on the serum protein-mediated drug transport in biological membrane interface

研究代表者

山崎 啓之 (YAMASAKI KEISHI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：30435143

研究成果の概要（和文）：本研究は、血清タンパク介在性薬物輸送の存在および輸送機構の解明を目的として行われた。薬物の血清における主要結合タンパクであるヒト血清アルブミン（HSA）と組織細胞との相互作用の詳細を検討した結果、組織細胞にはHSAを効率的に取り込む機構が存在し、取り込みの際には薬物を遊離する方向にHSAが構造変化を起こしている可能性が高いことを明らかにした。さらに、肝細胞においてはクラスリン介在性エンドサイトーシスによりHSAが取り込まれていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was undertaken to evaluate serum protein-mediated drug transport. Through the investigation of the interaction between human serum albumin (HSA) and tissue cells, we explored the specific mechanism that HSA is incorporated and change its conformation so that the bound drug is released. In addition, our data suggests that HSA is incorporated into liver parenchymal cell via clathrin-mediated endocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：膜インターフェイス・血清アルブミン・薬物輸送

## 1. 研究開始当初の背景

薬物は血中のタンパク質と結合していない遊離型のみが組織へ移行し、その結果、薬効が発現するという考え方が幅広く受け入れられてきたが、近年、いくつかの血清タンパク結合性薬物において、遊離型薬物濃度以上の組織への取り込みが報告されている。こ

の原因の一つとして、血中において薬物が結合する主要タンパク質であるヒト血清アルブミン（HSA）及び $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質（AGP）が、生体膜を介した薬物の組織への輸送をエスコートしている可能性が示唆されている。一方、この輸送機構の詳細を解明した研究は現在のところ数少ない。

## 2. 研究の目的

本研究は、膜インターフェイスにおける血清タンパク質介在性の薬物輸送機構の解明を通して、的確な薬物投与設計へとつながる薬物動態予測システムを構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 生体膜モデルと血清タンパク質との相互作用をタンパク質の構造変化ならびに薬物結合性の観点から解明する。

(2) 生化学的・細胞生物学的手法を用いて組織細胞への血清タンパク質の取り込み機構と薬物放出機構を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 生体膜モデルと血清タンパク質との相互作用の解明

①円二色性分散計を用い、生体膜モデルであるリポソーム (SUV : small unilamellar vesicle で検討)、逆相ミセルとの共存下での血清タンパク質の二次構造変化を確認した。その結果、HSA は $\alpha$ ヘリックスの減少を伴い、二次構造が崩壊する方向に構造変化を起こすこと、一方 AGP は $\beta$ シートから $\alpha$ ヘリックス構造に転移することを確認した。

②蛍光分光光度法を用いた検討の結果、生体膜モデルと相互作用する結果、各血清タンパク質のトリプトファン残基の置かれている環境は疎水的環境から親水的環境に変化していることが示唆された。

③HSA および AGP へのリガンド結合性を蛍光強度の変化を指標に検討した結果、HSA への warfarin の結合性および AGP への quinardine red の結合性はいずれもリポソーム (SUV で検討) との相互作用によって有意に低下することを確認した (図 1)。一方、

HSA への結合親和性が warfarin と同程度である dansylsarcosine の結合性は、リポソームとの相互作用により warfarin ほど低下しなかった (図 1)。warfarin と dansylsarcosine が、それぞれ HSA 分子上のサイト I (domain II) およびサイト II (domain III) という異なる部位に結合することを考えると、HSA と生体膜との相互作用による結合性の変化には、結合サイト特異性 (部位特異性) がある可能性が示唆された。

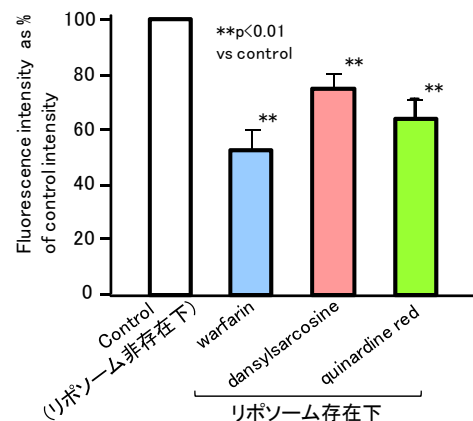


図1. HSA および AGP へのリガンド結合性

(2) 組織細胞への血清タンパク質の取り込み機構の解明

①まず肝由来細胞を用いて検討をおこなった。肝由来細胞としてラット初代肝培養細胞および HepG2 における FITC-HSA の取り込みを 4°C、37°C で検討した。いずれの細胞内への取り込みも 37°C で高く、60 分まで直線的に取り込みが増大した。さらに、FITC-HSA 高濃度の条件では取り込みに飽和が認められた。このように、温度、時間および濃度依存性が示されたことに加えて、FITC 非修飾 HSA 高濃度の存在下では FITC-HSA の取り込みが阻害されたことから FITC-HSA がレセプター介在性エンドサイトーシス等の特殊な輸送系によって肝由来細胞内に取り込まれている可能性が示唆された。次に、輸送機構の詳細を明らかにす

る目的で、各種レセプター介在性エンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。その結果、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である chlorpromazine および phenylarsine oxide 存在下で FITC-HSA の取り込みが有意に阻害される一方、カベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤である methyl- $\beta$ -cyclodextrin および filipin 存在下では阻害されなかったことから、FITC-HSA の輸送にはクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与している可能性が示唆された。

②血管内皮細胞として、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、FITC-HSA の細胞内への取り込みを評価した。FITC-HSA は肝由来細胞同様、HUVEC 内に温度、時間、濃度依存的に取り込まれたが、その程度は肝由来細胞と比較して小さかった。FITC 非修飾 HSA 高濃度存在下で取り込みは抑制されたことから、HUVEC にも肝細胞に類似した輸送系が存在する可能性が示唆されたが、この輸送には各種エンドサイトーシス阻害剤はほとんど影響を与えなかったことから (図 2)、レセプター介在性エンドサイトーシスとは異なる、何らかの担体が関与する輸送系が一部機能しているものと考えられた。

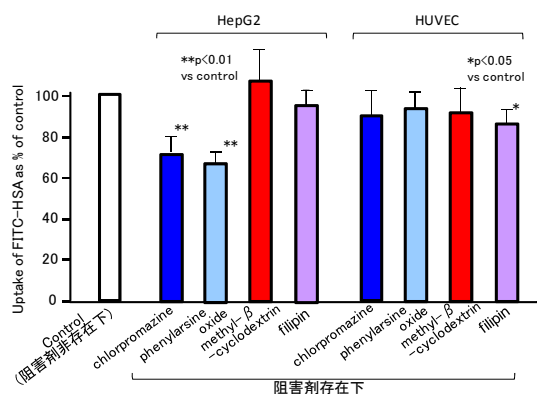


図2. FITC-HSA の細胞取り込みに対する各種阻害剤の影響

③薬物 (フェニルブタゾン、イブプロフェン) と HSA の共存系で、HepG2 および HUVEC

における薬物の取り込みを検討し、いずれの系でも細胞内に薬物の存在を確認したが、HSA 以外の生体膜中あるいは細胞内タンパク質への薬物結合の影響を排除できず、HSA が薬物輸送に関与していることを直接的に明らかにするには至らなかった。

以上の結果から、血管からの薬物の透過および組織細胞への輸送という一連の薬物動態には、血清タンパク質の効率的な細胞内取り込みおよび結合型薬物の放出という特殊な機構が機能している可能性が示唆された

(図 3)。血清タンパク質に結合していない遊離型の薬物のみが生体膜を透過するという考えが広く受け入れられている現在、血清タンパク介在性の薬物の生体膜輸送機構の存在を示唆した今回の知見は、より正確な薬物動態予測を行う上で有用な基礎資料になるものと思われる。

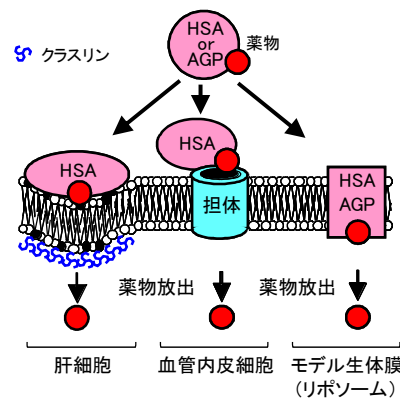


図3. 推定される血清タンパク質の細胞内取り込みおよび薬物放出機構

## 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 9 件)

1. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Characterization of the hepatic cellular uptake of  $\alpha_1$ -acid

glycoprotein (AGP), part 1: a peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells. *J. Pharm. Sci.* 査読有 101, 1599-1606 (2012)

2. Furukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Ishima Y, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. *J. Control. Release.* 査読有 154, 189-195 (2011)

3. Watanabe H, Miyamoto Y, Otagiri M, Maruyama T. Update on the pharmacokinetics and redox properties of protein-bound uremic toxins. *J Pharm Sci.* 査読有 3682-3695 (2011)

4. Kaneko K, Chuang VT, Minomo A, Yamasaki K, Bhagavan NV, Maruyama T, Otagiri M. Histidine146 of human serum albumin plays a prominent role at the interface of subdomains IA and IIA in allosteric ligand binding. *IUBMB Life.* 査読有 63, 277-285 (2011)

5. 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  $\alpha_1$ -acid glycoprotein into liver parenchymal cells in mice. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 査読有 25, 101-107 (2010)

6. 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)

7. 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  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in *E. coli*: The roles of oligosaccharide moieties in structural and functional properties. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 査読有 25, 200-207 (2010)

8. Kuga N, Shikano N, Takamura N, Nishii R, Yamasaki K, Kobayashi M, Nagamachi

S, Tamura S, Kawai K. Competitive Displacement of Serum Protein Binding of Radiopharmaceuticals with Amino Acid Infusion Investigated with *N*-Isopropyl-p-123I-Iodoamphetamine. *J. Nucl. Med.* 査読有 50, 1378-1383 (2009)

9. 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  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *J. Pharm. Sci.* 査読有 98, 4316-4326 (2009)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 末永 綾香.  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質のヘモグロビン  $\beta$  鎖介在性肝取り込み機構. 日本薬学会 137 年会, 2012 年 3 月 31 日, 北海道大学

2. 丸山 徹. 急性肝障害に対するマンノース付加アルブミンを担体としたクッパー細胞選択的チオール送達の有用性評価. 日本薬学会 137 年会, 2012 年 3 月 30 日, 北海道大学

3. 小森 久和.  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質のヘモグロビン  $\beta$  鎖を介した肝実質細胞取り込み機構の解明, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 27 日, 岡山コンベンションセンター

4. 南雲 恒平. 肝疾患患者におけるヒト血清アルブミンの構造及び機能特性. 日本薬物動態学会第 25 回年会, 2010 年 11 月 16 日, 大宮ソニックシティ

5. 小田切 優樹. チオレドキシシンとアルブミン融合体の作製と生物活性の評価, 第 26 回日本DDS学会, 2010 年 6 月 17 日, 大阪国際交流センター

6. 和泉 実代子. ヒト  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質/薬物複合体の X 線結晶構造解析. 日本薬剤学会第 25 回年会, 2010 年 5 月 14 日, 徳島郷土文化会館

7. Komori H. Involvement of hemoglobin  $\beta$ -chain mediated endocytic pathway in hepatic uptake of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2009 年 11 月 29 日, 大阪大学

8. 小森 久和,  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質のヘモグロビン  $\beta$  鎖を介した肝細胞取り込み機構.

第3回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2009年11月14日, 九州大学

9. Yamasaki K. *In vitro* evaluation for antioxidant activities of dietary supplements. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, 2009年10月17日, 九州大学

10. Hirata K. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver selective therapeutics. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009年10月17日, 九州大学

11. 平田 憲史郎, 組換え型糖鎖付加アルブミンの肝ターゲティング担体としての有用性評価. 第9回日本NO学会学術集会, 2009年5月8日, 静岡グランシップ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 啓之 (YAMASAKI KEISHI)  
崇城大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 3043543

### (2) 研究分担者

小田切優樹 (OTAGIRI MASAKI)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80120145