

機関番号：23903

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790155

研究課題名 (和文) 蛍光性基質を利用した有機カチオントランスポーター類の新規機能評価系の開発

研究課題名 (英文) Development of novel assay system for the functionality of organic cation transporters using fluorescent probe substrate

研究代表者

太田 欣哉 (KINYA OHTA)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90448704

研究成果の概要 (和文)：蛍光性の物質である 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) は有機カチオントランスポーターである multidrug and toxin extrusion protein1 及び 2-K 及び organic cation transporter1 により効率的に輸送された。この特性を利用し、これらの有機カチオントランスポーターの基質または阻害剤の選別において、従来法より多検体を短時間で行うことができる効率的な方法を開発した。

研究成果の概要 (英文)：We successfully demonstrated that DAPI can be efficiently transported by both hMATEs, hMATE1 and hMATE2-K, and hOCT1. By taking advantage of its fluorescent nature, we developed a rapid assay system for the selection of inhibitors, which include potential substrates, of hMATEs and hOCT1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

薬物の腎排泄過程の中でも尿細管分泌過程は特に重要であり、有機カチオン性医薬品の尿中排泄においても、その重要性はよく知られている。その分泌は、尿細管上皮細胞の側底膜に存在するトランスポーターによる血液から細胞内への有機カチオンの取り込みに続いて、刷子縁膜に存在する排出系トランスポーターを介して尿中に排出されるというプロセスで構成されている。これに関わ

る排出系トランスポーターの分子の実体は長く不明なままであったが、最近になって、ヒト MATE1 及び 2 (hMATE1 及び 2) が候補として新たにクローニングされた (Otsuka M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17923-8, 2005)。我々も、ほぼ同時期にラット MATE1 (rMATE1) のクローニングに成功した (Ohta K. *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, 34, 1868-74, 2006)。これらが従来から示唆されている有機カチオン排出系 (H⁺との交換輸送系) トランスポーターの特徴を有していること及び、

hMATE1 及び 2 の刷子縁膜への局在性がまとめられていることから、MATE は有機カチオン排出系トランスポーターの分子実体であるとみて間違いないと考えられる。さらに、我々は、主に腎排泄によって体内から消失するフルオロキノロン系抗菌剤（両性イオン）が、MATE により輸送されることを見出した (Ohta K. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 12, 388-396, 2009)。したがって、有機カチオン性及び両性イオン型の医薬品の腎排泄挙動を把握し、効率的な医薬品開発及び効果的な薬物療法を推進するうえで、MATE の基質または阻害剤の選別（ないし判別）をすることが非常に重要となるものと考えられる。

Fig. 1



MATE 安定発現細胞を核染色剤 DAPI でインキュベートした後の蛍光画像 (白い部分が蛍光を発している)

保嶋 旭, 日本薬物動態学会第 23 年会, 2008 年 (熊本)

創薬において、吸収や代謝に関する種々の *in vitro* スクリーニング系の普及等に伴い、薬物動態特性に起因して臨床試験段階でドロップアウトする化合物は減少している。しかし、腎排泄に関しては、詳細な生理機構が十分解明されていないため、未だに医薬品の開発段階での薬物間相互作用や毒性についての予測は難しく、腎毒性の原因となり得る医薬品候補の選別等のための精度の高いスクリーニング系の開発が望まれている。機能阻害が腎機能低下や腎毒性につながり得る MATE はそのようなスクリーニング系開発の対象として重要と考えられる。MATE (hMATE1 及び 2, rMATE1) に関する一連の機能解析を進める中で、我々は、通常は細胞膜非透過性である DAPI (核染色剤) が MATE 安定発現細胞に効率よく取り込まれることを見出した (Fig. 1)。細胞内に取り込まれた DAPI は核内の DNA とインターカレーションし、長波長 UV (~340 nm) 照射下で特異的蛍光 (460 nm~) を発するので、その蛍光強度により MATE の輸送機能を定量化することが可能である。この原理は、MATE の阻害剤 (基質を含む) の効率的な選別のためのスクリーニング等に応用できるものと考えられる。汎用されるラジオアイソトープ試薬 (基質) を用いた輸送機能解析では、サンプルの可溶化等の処理を要するため、多検体の迅速測定は困難である。また、特別なラジオアイソトープ取り扱い施設が必要であることも難点である。HPLC 等の分析機器の利用も考えられるが、やはり、サンプルの前処理や比較的長い測定時間を要する。DAPI 等の

蛍光性物質を用いる方法は、これらの問題点を解決し、簡便かつ迅速なスクリーニングを実現できる有力な手段になるものと考えられる。

2. 研究の目的

MATE に特異的な基質となる蛍光性核染色剤を利用し、簡便かつ迅速な MATE 機能の評価・解析系の構築を試みる。特に、多検体の迅速な処理が必要とされる医薬品開発の初期段階において MATE 阻害剤の選別に利用可能な、創薬のためのハイスループットスクリーニング法の開発に重点を置く。また、主に肝臓に発現しているヒト organic cation transporter 1 (hOCT1) を用いた予備実験により、DAPI が同様に輸送されることが示唆されているので、MATE を用いて開発したハイスループットスクリーニング法の、MATE 以外のトランスポーター (特に有機カチオントランスポーターファミリー) への適用の可能性も検討する。

3. 研究の方法

(1) MATE (hMATE1、2 及び rMATE1) の基質となる蛍光性核染色剤の検索

蛍光検出を行う際、MATE を発現させた細胞内のみ蛍光性核染色剤が取り込まれる (特異的蛍光を発する) ことが望まれる。そこで、MATE の基質となることが判明した DAPI の化学構造や物性を手がかりにして、各種蛍光性核染色剤について、MATE の特異的な基質になる化合物を検索する。すなわち、MATE 安定発現細胞 (MDCKII 細胞) に特異的に取り込まれ、核内 DNA とのインターカレーションにより特異的蛍光を発する化合物を検索する。定性的評価は蛍光顕微鏡により直接的に行い、定量的評価はマルチウェルプレートリーダーを用いて行う。

(2) MATE の基質となる蛍光性核染色剤の MATE 安定発現細胞内への取り込みの速度論的解析

MATE の特異的な基質となる蛍光性核染色剤について、MATE を介する細胞内取り込み量 (速度) を速度論的に解析し、MATE に対する親和性を求める。また、MATE の典型的な基質である cimetidine の輸送に対する各種核染色剤の阻害特性を検討し、その阻害定数と上記から求めた親和性の比較を行う。

(3) MATE 機能評価系の構築と MATE 阻害剤のスクリーニングへの適用

以上の検討結果に基づき、最適な蛍光性核染色剤及び評価条件を整理し、MATE 機能評価系とする。開発した蛍光検出法を用いて、

蛍光性核染色剤の取り込みに対する種々の医薬品等の阻害活性を評価する。tetraethylammonium (TEA) や cimetidine などのラジオアイソトープ試薬 (基質) 取り込みに対する阻害活性と比較し、評価系としての妥当性を検証する。また、さらに広範な医薬品等について、蛍光検出法による阻害活性評価を行うことにより、MATE の阻害剤 (競合基質を含む) を検索し、薬物間相互作用、副作用 (腎毒性) の解明の手がかりとする。

(4) 各種有機カチオントランスポーターに対する蛍光性染色剤の影響

これまでに、細胞膜に発現し、有機カチオン性化合物に対する輸送能を有するトランスポーターとして、organic cation transporter 群 (OCT1、OCT2、OCT3)、カルニチントランスポーター群 (OCTN1、OCTN2)、plasma membrane monoamine transporter (PMAT) が同定されている。OCT2 など、MATE と基質認識特性が比較的近いものもあり、上記の検討により得られた蛍光性核染色剤がこれらのトランスポーターの基質にもなる可能性が考えられる。そこで、各種有機カチオントランスポーター発現系における蛍光性核染色剤の細胞内取り込みを評価し、これらのトランスポーターへの MATE を用いて開発したハイスループットスクリーニング法の適用の可能性を探る。

(5) 各種有機カチオントランスポーターへの新規ハイスループットスクリーニング法の適用

上記の検討により新規ハイスループットスクリーニング法の適用が可能と判断されたトランスポーターの安定発現系を用い、蛍光性核染色剤の取り込み評価を行うための最適条件の検討を行う。得られた最適条件を用いて、種々の医薬品による阻害活性の測定を行う。続いて、ラジオアイソトープ試薬 (基質) 取り込みに対する阻害活性と比較し、評価系としての妥当性を検証する。

4. 研究成果

まず、蛍光性基質を利用した MATE (multidrug and toxin extrusion protein) の新規機能評価系に利用可能な蛍光性を有する MATE の基質を探索した。その結果、試験薬物 (蛍光性物質) の中で DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) がヒト MATE1 及び 2-K 安定発現細胞に効率的に取り込まれ、MATE の良好な基質であり、本評価系で利用可能であると判断した。

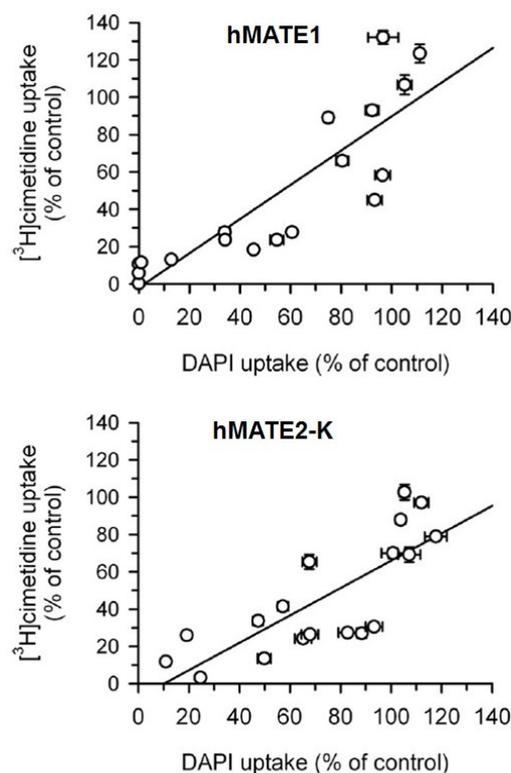
MATE を介した DAPI の細胞内取り込みを速度論的に解析した結果、ミカエリス定数 (K_m) はヒト MATE1 が $1.13 \mu\text{M}$ 、ヒト

MATE2-K が $6.78 \mu\text{M}$ と算出された。一方、MATE の典型的な基質である cimetidine のヒト MATE 安定発現細胞内取り込みに対する DAPI の IC_{50} はヒト MATE1 で $6.9 \mu\text{M}$ 、ヒト MATE2-K で $15.7 \mu\text{M}$ であり、先述の K_m 値とほぼ同等であった。このことよりヒト MATE1 及び 2-K における DAPI の基質認識部位は他のカチオン性基質と同じであることが示唆され、本評価系に DAPI を使用することが適当であると再確認された。

MATE を介した DAPI の輸送は、TEA や cimetidine 等のカチオン性基質と異なり、細胞内 pH の影響を受けなかった。したがって、DAPI の輸送を評価する際には、カチオン性基質では必要である細胞内の酸性化の処理が不要になり、実験時間を短縮することができる。

一方、各種阻害剤による影響は、カチオン性基質である cimetidine に対するものと比較すると良好な相関が得られ (Fig. 2)、DAPI を用いて MATE の基質または阻害剤の選別 (ないし判別) を行うことは可能であると考えられた。

Fig. 2



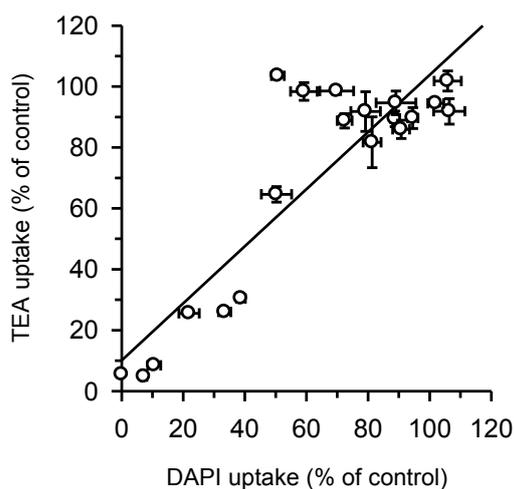
細胞内取り込み実験後から測定完了までに要する時間は、従来法の RI を用いた場合には 6~7 時間程度 (96 サンプル) 要していたが、本評価系では数分程度にまで短縮することができた。

さらに、MATE の機能評価系に利用可能な DAPI を用いて、MATE 以外の有機カチオン

トランスポーター類への適用の可能性を探った。その結果、hOCT1 が DAPI を効率的に輸送し、本評価系の応用の可能性が考えられたため、DAPI を利用した OCT1 機能の迅速評価系の確立及びその妥当性の検討を行った。

まず、hOCT1 の cDNA を MDCKII 細胞に導入し、安定発現細胞株を作製した。これを用いて、hOCT1 を介した DAPI の細胞内取り込みを速度論的に解析した結果、その K_m 値は $8.9 \mu\text{M}$ と算出された。比較のために、hOCT1 の典型的な基質である TEA についても同様の検討を行ったところ、その K_m 値は 1.8 mM であったため、DAPI の方が TEA よりもはるかに高親和性であると考えられる。また、hOCT1 を介した DAPI 輸送の駆動力についての検討を行ったところ、有機カチオン性基質の輸送が細胞の膜電位に依存しているのに対し、DAPI の輸送は膜電位に非依存的であることが示された。さらに、有機カチオン性の基質の輸送が細胞外 pH に非感受性であるのに対して、DAPI の輸送は細胞外 pH に感受性であり、pH の上昇に伴い DAPI の輸送も上昇した。一方、hOCT1 による DAPI 輸送に対する各種阻害剤の影響は、TEA の輸送に対するものとほぼ同程度であり、これらの間では良好な相関がみられた (Fig. 3)。これらのことより、hOCT1 を介した DAPI の輸送は、有機カチオン性の基質とは輸送特性で異なる点が多いものの、基質認識部位については共通しており、hOCT1 の基質または阻害剤の判別において、有効かつ迅速な評価系として利用可能であると考えられる。

Fig. 3



以上のように、本研究では蛍光性物質である DAPI を用いることにより、MATE1 及び 2-K 及び OCT1 の基質または阻害剤の選別(ないし判別)を従来法よりはるかに効率的に行うことが可能であることを見出した。

今後この新規評価系を利用することにより、薬物間相互作用の予測等の効率化が図れるものと期待される。

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 2 件)

- ① Tomoya Yasujima, Kinya Ohta, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Characterization of human OCT1-mediated transport of DAPI as a fluorescent probe substrate. *J. Pharm. Sci.*, in press.
- ② Tomoya Yasujima, Kinya Ohta, Katsuhisa Inoue, Munenori Ishimaru, Hiroaki Yuasa: Evaluation of 4',6-diamidino-2-phenylindole as a fluorescent probe substrate for rapid assays of the functionality of human multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metab. Dispos.*, 38, 715 - 721, 2010.

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tomoya Yasujima, Kinya Ohta, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Rapid screening of inhibitors for human organic cation transporter 1 using DAPI. 第 4 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2010 年 11 月 27 日 - 28 日 (東京); 要旨集, p. 77 (P32).
- ② Tomoya Yasujima, Kinya Ohta, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa: Characterization of the transport of DAPI by hOCT1 for its utilization for rapid uptake assays. Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (4th), Nov. 14 - 18, 2010 (New Orleans, Louisiana, U.S.A.); AAPS J, 12(S2), Abstract T3402.
- ③ 保嶋智也, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭: ヒト OCT1 の蛍光性プローブ基質としての DAPI の輸送特性の評価. 第 25 回日本薬物動態学会年会, 2010 年 10 月 7 日 - 9 日 (さいたま); 要旨集, p. 267 (1-P-17).
- ④ 保嶋智也, 太田欣哉, 井上勝央, 石丸宗徳, 湯浅博昭: hOCT1 による蛍光性核染色剤 DAPI の輸送: 迅速機能評価への応用の可能性. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28 日 - 30 日 (岡山); 要旨集, No. 4, p. 209 (28P-am026).

- ⑤ 保嶋智也, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭: 蛍光性色素 DAPI を用いた MATE 輸送機能の迅速評価法. 第 23 回日本薬物動態学会年会, 2008 年 10 月 30 日 - 11 月 1 日 (熊本); 要旨集, p. 257 (31B11-5).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 欣哉 (OHTA KINYA)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 90448704

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし