

機関番号：21601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791460

研究課題名 (和文) 非脱分極性筋弛緩薬の細胞取り込み機構に関する研究

研究課題名 (英文) Transcellular mechanisms of non-depolarizing muscle relaxant uptake

研究代表者

高橋 晋一郎 (TAKAHASHI SHINICHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50457769

研究成果の概要 (和文)：非脱分極性筋弛緩薬であるベクロニウム、ロクロニウムの細胞取り込み機構に関する研究を行った。肝細胞のモデルとして使用される培養細胞の HepG2 を使用し、Organic Cation Transporter1 の代表的な基質である MPP を放射性同位元素でラベルしたものを使用し、MPP に対する阻害作用として評価した。ベクロニウム、ロクロニウムとも MPP に対する取り込み阻害作用があり、共通の経路を介していることが示唆された。遺伝子多型による取り込み変化の有無の確認が今後の課題である。

研究成果の概要 (英文)：Research about the hepatocellular uptake mechanism of non-depolarizing muscle relaxants including vecuronium and rocuronium was performed. HepG2 cells which express Organic Cation Transporter 1 were used to examine if MPP uptake was inhibited by vecuronium and rocuronium. The results suggested that OCT1 was involved in hepatocellular uptake mechanisms of vecuronium and rocuronium. Further research is needed to test if polymorphism affect the uptake system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：ゲノム、薬剤反応性、非脱分極性筋弛緩薬

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を通して生体が何らかの物質を細胞内に取り入れる際、受動的な拡散による取り込みのほかに、トランスポーターを介した物質の取り込み機構がある。トランスポーターはABCトランスポーター、SLCトランスポーターに大別され、合わせて300程度がこれ

までに同定されており、輸送する物質は様々である。

麻酔領域では、P-糖タンパクと呼ばれるトランスポーターがモルヒネの輸送に関わっていることがよく知られている (Br J Pharmacol. 1999 Oct;128(3):563-8)。神経伝達物質の輸送体も存在し、麻酔に関わる生体

現象に大きく関わっている。

また、トランスポーターや CYP-450 ファミリーなど薬物輸送、代謝に関連するタンパクの個体差が薬物の効果の違いを引き起こしていることが明らかになるにつれて、近年では遺伝子多型情報を利用して薬の投与量を調整するオーダーメイド医療の発展が期待されている。

全身麻酔の際に使用される非脱分極性筋弛緩薬であり、世界中で汎用されているベクロニウムは、投与後 3-5 分で体動を消失させ、人工呼吸、手術が安全に実施できるようになる。しかし、その反応には個人差があり、短時間で効果が消失することもあれば、作用が予想以上に遷延することもある。予想外の効果消失により手術や人工呼吸の安全性に問題が生じ、効果遷延すると手術室への滞在時間、人工呼吸に依存する時間が長くなり、さらには入院期間や医療費の問題へも波及する。

ベクロニウムは投与直後から肝臓への再分布が起こり、急速に血中濃度が減少する。投与後 30 分で 50%以上のベクロニウムが肝臓に取り込まれる (Bri J Anaesth, 1986 Sep;58(9):988-95)。肝臓に特異的に取り込まれることから、単純な拡散による取り込みではなく、担体を介した機構が存在することが考えられ、個体差はその遺伝子多型が関係している可能性がある。本研究ではベクロニウムを輸送すると考えられるトランスポーターの遺伝子多型による作用の違いを検討する。

SLC22 ファミリーに属する Organic Cation Transporter1(OCT1)はラットから 1994 年に、ヒトからは 1997 年にクローニングされたトランスポーターであり、ヒトではほぼ肝臓のみに発現している (Mol Pharmacology 1997 51:913-921)。その基質

特異性は低く、デシプラミン、ジソピラミド、プラゾシン、ベラパミル等様々な薬物の取り込みに関与していると考えられている。

OCT1 には遺伝子多型が存在し、機能に影響することも分かっている。代表的な基質である 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP)の取り込みは、アミノ酸変異 Arg61Cys、Cys88Arg、Gly401Ser、を持つ cRNA をアフリカツメガエルの Oocyte に発現させることでそれぞれ 30、1.4、0.9%まで活性が落ちることが判明している。Phe160Leu、Met420del は取り込み活性に変化は起こらない。またセロトニンの取り込みは Cys88Arg、Gly401Ser ではそれぞれ 13、12%までしか低下していないことから、遺伝子多型による取り込み能の変化は基質によって異なることが示されている

(Pharmacogenetics 2002 Nov;12(8):591-5)。また、OCT1 のノックアウトマウスによる実験では、基質の一つであるテトラエチルアンモニウム(TEA)の排泄が遅れることが分かっている。

ベクロニウムが OCT1 によって輸送されていることは *in vitro* の実験で明らかにされているが (JPET286:354-361,1998) *in vivo* において他の因子を含めた状況でどの程度関与しているのか、また遺伝子多型の影響の有無はどうか全くわかっていない。

ベクロニウムの輸送機構が明らかになれば、OCT1 のさらなる機能解析に役立つだけでなく、近年推進されている個体差を反映させた医療、オーダーメイド医療への応用が可能になるであろう。

2. 研究の目的

薬物による効果の個体差が注目を浴びようになり、代謝の中心を担う CYP450 ファミリー遺伝子に多型性が多いことから研究

されてきた。薬物の細胞への取り込みという観点から、OCT1の多型性の影響も知られているが、未だ *in vitro* での研究がほとんどである（ほかの *in vitro* の例としては Proc Natl Acad Sci USA. 2003 May 13; 100(10):5902-7がある）。ヒトを対象としたものとしては、唯一 OCT1 の遺伝子多型が糖尿病治療薬であるメトホルミンの効果の違いを生じるという論文があるだけである（J Clin Invest 2007 May; 117(5):1422-31）。本研究の仮説が証明されれば、この論文に次ぐ結果であり、筋弛緩薬の作用の個体差を遺伝子レベルで証明するのは初めてとなる。筋弛緩薬の代謝排泄機構の解明につながるだけでなく、オーダーメイド医療の発展に貢献できるであろう。

3. 研究の方法

本研究では肝細胞のモデルとして使用されている HepG2 を使用し、基質の取り込みと筋弛緩薬による影響を検討した。肝臓には OATP、OCT ファミリーなど、様々なトランスポーターが発現している。理想的な実験系としてはベクロニウム (VCB)、ロクロニウム (RCB) の取り込みを見ることであったが VCB、RCB そのものをラベルしたものは入手が困難であり、代表的な基質として MPP を使用した。

HepG2 を 1 ウェルあたり 10×10^5 個培養した 24 ウェルプレートを使用した。

培地を捨て、バッファーを加えて 1 時間その状態で平衡化したあと、バッファーを捨て、500ul の Hot 溶液を加えた。1 時間のインキュベーション後、溶液を捨てて PBS で 2 回洗い、150ul の 0.01N の NaOH を加えて細胞を溶解し、シンチレーションカウンターで計測した。

4. 研究成果

MPP に対する阻害作用を観察したところ、トリチウムでラベルした MPP 10uM に対して 1mM の VCB、RCB はそれぞれ 35.6%、42.9% の阻害作用を示した。MPP を基質とするトランスポーターとして OCT1 が考えられるが、その取り込み機構を共有していることが示唆されている。その遺伝子多型による影響を受ける可能性が考えられる。現在、OCT1 の遺伝子多型による影響が臨床的に証明されているのはメトホルミンのみであるが非脱分極性筋弛緩薬も同様の影響が考えられる。

当初 *Xenopus* の Oocytes を使用する計画を立てていた。Oocytes を採取し、コラゲナーゼ処理など適切な処置を施したのち、OCT1 の cRNA を作成して注入し、発現させた。この実験系を利用して進めていたが、コントロールと比較して明らかな取り込み活性を示さず、試行錯誤を繰り返したため、予想よりも時間が経過し、HepG2 を使用した方法へ移行することとした。

現在検討中の VCB、RCB に加え、パンクロニウムについても検討する。また、異なる系列の非脱分極性筋弛緩薬であるミバクロニウムなども検討する。

また、OCT1 遺伝子をノックダウンし、上記取り込み活性の変化を観察することも視野に入れている。

もともとは Oocytes を使用して遺伝子多型を導入したものの違いも検討する予定であったが、それが HepG2 を使用して可能かどうか検討する。もしくは OCT1 の発現や MPP の取り込み活性が少ない細胞を利用して強制発現させ結果を考察していきたい。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 晋一郎 (TAKAHASHI SHINICHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50457769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし