

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 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790152

研究課題名（和文） アダプター・MDR1欠損マウスを用いた消化管薬物吸収機構のインビボ解明

研究課題名（英文） In vivo analysis of intestinal drug absorption using adaptor/efflux transporter gene deficient mice

研究代表者

杉浦 智子 (SUGIURA TOMOKO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：70542190

研究成果の概要（和文）：

アダプタータンパク質 PDZK1 が、小腸に発現する複数の吸収トランスポーター(PEPT1, OCTN2, OATP1A)の apical 膜上での発現を制御し、その基質化合物の消化管吸収を制御することを *in vivo* で示した。*pdzk1* 遺伝子欠損マウス(*pdzk1*^{-/-})では、小腸の吸収トランスポーターだけでなく、排出トランスポーターBCRPの発現が著しく低下し、その基質である cimetidine の消化管吸収が増加した。このように PDZK1 は小腸に発現する取り込みおよび排出トランスポーターを制御することで、栄養物の効率的な吸収と異物からの防御を同時に行なっていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Transporter adaptor protein PDZK1 regulates several influx transporters (PEPT1 and OCTN2) in small intestine, and their expression on the apical membrane is diminished in *pdzk1* gene knockout mice (*pdzk1*^{-/-}). In addition, we have identified that PDZK1 regulates the expression of organic anion transporting polypeptide OATP1A and intestinal absorption of its substrate, estrone-3-sulfate. In the present study, we attempted to use *pdzk1*^{-/-} mice to functionally identify influx transporters responsible for intestinal absorption of cimetidine. Contrary to our expectation, the expression level of intestinal efflux transporter for cimetidine, BCRP, was significantly decreased in *pdzk1*^{-/-} mice, and plasma concentration of cimetidine after oral administration to *pdzk1*^{-/-} mice was higher than that in wild-type mice. Taken together, these findings demonstrate that PDZK1 plays a pivotal role in the apical localization of both influx transporters and efflux transporter in small intestine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：トランスポーター、アダプター、消化管吸収、タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

薬物の消化管吸収は小腸吸収上皮細胞で

の膜透過過程に依存する。近年、薬物の吸収にトランスポーターを介した取り込み輸送の関与が報告されているが、*in vivo*で薬物の消化管吸収に働くことが示されたトランスポーターは限られており、臨床で 사용되는経口薬の大部分は、未だに消化管吸収機構が解明されていない。

研究代表者らは、4つのPDZ domainを持つ膜裏打ちタンパク質PDZK1が、*in vivo*において複数の小腸取り込みトランスポーターと相互作用し、それらの膜での発現を制御することを見出した(Sugiura T et al., 2008)。さらに、*pdzk1*遺伝子欠損マウス(*pdzk1*^{-/-})では、同時に複数のトランスポーターが刷子縁膜から消失し、それに伴いトランスポーターの基質薬物の消化管吸収が低下した(Sugiura T et al., 2008)。これまでの*in vitro*の結果に基づくと、PDZK1は他にも消化管に発現する数多くの取り込みトランスポーターと相互作用する可能性が高い(Kato Y et al., 2004)。従って、*pdzk1*^{-/-}はPDZK1と相互作用する取り込みトランスポーターの機能低下マウスとして、*in vivo*で薬物吸収機構を解明する有効なツールになり得ると考えた。

一方、小腸吸収上皮細胞刷子縁膜上には、取り込みトランスポーターだけでなく排出方向に働くトランスポーターが共存していることから、1つの薬物が複数のトランスポーターによって認識されることも少なくない。このような場合、取り込み方向および排出方向の輸送が相殺され、薬物の消化管吸収におけるトランスポーターの関与が見かけ上検出されにくくなると考えられる。研究代表者らは、これまでに薬物排出トランスポーターであるP糖タンパク質(MDR1: multi drug resistance protein 1)をコードする*mdr1a/1b*遺伝子欠損マウスを用いることで、排出方向の輸送に邪魔されることなく、消化管吸収に関わる取り込みトランスポーターの存在を*in vivo*で見出すことに成功しており(Kato Y et al., 2008)、消化管の吸収トランスポーターを見出す上で、排出トランスポーター機能の排除が重要である。

2. 研究の目的

以上の背景から、*pdzk1*^{-/-}がPDZK1と相互作用する取り込みトランスポーターの機能低下マウスとして、*in vivo*で薬物吸収機構を解明する有効なツールになり得ると考え、*pdzk1*^{-/-}を用いて未解明な薬物の消化管吸収機構の解明を試みた。

また、小腸に発現する排出トランスポーターMDR1とBCRP (breast cancer resistant protein: ABCG2)の遺伝子欠損マウス(*mdr1a/1b/bcrp*^{-/-})と*pdzk1*^{-/-}を掛けあわせたマウスを作製し、薬物の消化管吸収機構を解

明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*試験

*pdzk1*遺伝子欠損マウスはDr. David L Silver (Albert Einstein 医科大学)より供与を受け、金沢大学学際科学実験センター動物施設にて飼育繁殖した。*In vivo*薬物動態試験は、マウスを一晩絶食後、生理食塩水に溶解した薬物を頸静脈内もしくは胃ゾンデで経口投与し、経時的に尾静脈より採血し、遠心後に血漿を得た。一部薬物においては、ソムノペンチル麻酔下で十二指腸投与後、経時的に頸静脈および門脈から採血し、消化管吸収率を評価した。薬物濃度は放射活性もしくはHPLCで定量した。

(2) *in vitro*薬物透過試験

反転腸管法においては、マウス胃の2 cm下から小腸を摘出し、氷冷した生理食塩水で洗浄の後、腸管の一端を結紮し反転後、もう一方を結紮した。Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM MES (pH 6.0)または25 mM HEPES (pH 7.4))中で薬液とともにインキュベーション後、小腸組織を氷冷したtransport bufferで洗い、その重量を測定するとともに、組織に取り込まれた薬物量を放射活性もしくはHPLCにより測定した。

Ussing-type chamber法では、マウス小腸より筋層を剥がした後、有効表面積0.25 cm²のchamberに装着し、薬液を含むpH 6.0 (apical side)およびpH 7.4 (basal side)のtransport bufferをchamber内に添加することで実験を開始した。一定時間毎に薬液添加とは反対側のchamberよりサンプリングし、同量のbufferを補充した。

(3) トランスポーター発現・局在解析

小腸刷子縁膜小胞は、マウス小腸粘膜を用い、Ca²⁺沈殿法によって調製した。可溶化後、該当トランスポーターの抗体を用いたWestern blottingによってトランスポーターの発現量を各マウスで比較した。さらに、小腸組織切片を用いた免疫染色法により、トランスポーターの局在解析を行った。下記培養細胞を用いて、同様に発現・局在(免疫細胞染色、細胞表面タンパク質のビオチン化)、およびタンパク質間相互作用(pull-down法、免疫沈降法、yeast two-hybrid法)解析を行った。

(4) トランスポーター・アダプター遺伝子発現細胞を用いた薬物経細胞輸送試験および細胞毒性試験

MDCKII細胞にトランスポーターないし

はアダプターPDZK1 を安定発現させ、10% FCS 含有 DMEM 培地で培養した。経細胞輸送試験においては、細胞を transwell に播種し、3 日後に実験に用いた。培地を除き、薬液を含む pH 6.0 (apical side) および pH 7.4 (basal side) の transport buffer を添加することで実験を開始した。一定時間毎に薬液添加とは反対側よりサンプリングし、同量の buffer を補充した。

また、各種濃度の基質薬物を長期間暴露し、MTT assay によって細胞毒性を評価した。

4. 研究成果

(1) PDZK1 が小腸吸収トランスポーター OATP1A の発現・機能を制御することを明らかにした。

小腸刷子縁膜小胞を用いた Western blotting および免疫染色により、*pdzk1*^{-/-}では刷子縁膜上での有機アニオントランスポーター OATP1A が顕著に減少していた。OATP1A の良好な基質であるエストロン硫酸を経口投与後、循環血濃度では野生型マウスと *pdzk1*^{-/-}で有意な差は見られなかった。一方で、門脈中濃度のみ *pdzk1*^{-/-}で顕著に低い推移を示し、消化管吸収率の顕著な減少が観察された。*pdzk1*^{-/-}では、小腸刷子縁膜上での OATP1A の発現低下に加え、肝血管側膜に発現する OATP1A1 が内在化するため、肝臓への取り込みも同時に減少したために循環血では差が見られなかったと考えられる。

PDZK1 と相互作用する OATP1A は小腸吸収上皮細胞刷子縁膜上 (apical) に発現するのに対し、PDZK1 と相互作用しない OATP2B1 は subapical 領域に局在していた。PDZK1 はトランスポーターの刷子縁膜上での安定的な発現に関与する可能性がある。また、マウス小腸での基質輸送特性は OATP1A 発現細胞で得られた結果と類似しており、マウス小腸刷子縁膜側で OATP1A が機能的に発現することが示唆された。これまでに、PDZK1 の欠損により小腸刷子縁膜上のペプチドトランスポーター PEPT1 やカルニチントランスポーターの発現低下およびその基質の消化管吸収の低下が見られており、PDZK1 と相互作用する複数のトランスポーターの発現および機能が PDZK1 によって制御されることが *in vivo* で示された。

(2) PDZK1 が小腸排出トランスポーター BCRP の発現・機能制御をすることを明らかにした。

pdzk1^{-/-}を用いることで消化管吸収メカニズムが未解明な薬物の輸送機構を解明できると考え、従来、単純拡散で消化管吸収されと考えられてきた cimetidine に着目した。予想とは異なり *pdzk1*^{-/-}では cimetidine 経口投与後の血漿中濃度が高値を示し、PDZK1

が小腸刷子縁膜上に発現する排出トランスポーターを制御することを *in vivo* で明らかとした。さらに、小腸組織において、PDZK1 は cimetidine の輸送に関わる排出トランスポーター BCRP と相互作用することを明らかとした。また、*pdzk1*^{-/-}の小腸において、BCRP の mRNA レベルは変化しないにも関わらず、小腸刷子縁膜でのタンパク質レベルでの発現量は減少し、PDZK1 によって転写後調節されることが示唆され、PDZK1 が BCRP の小腸刷子縁膜での発現に重要な分子であることが *in vivo* で証明された。

遺伝子発現細胞を用いた検討においても、PDZK1 存在下において BCRP の発現が増加し、*in vivo* と対応する結果が得られた。さらに、PDZK1 存在下で、BCRP を介した cimetidine の側底膜側から頂側膜側方向への経細胞輸送能が増加し、BCRP 基質である抗癌剤 SN-38 による細胞毒性が減弱したことから、PDZK1 が BCRP の機能制御因子であることが示唆された。

さらに、MDCKII/BCRP/PDZK1 細胞を用いた免疫沈降法や pull-down によって、PDZK1 が BCRP と直接相互作用することを示した。Pull-down においては、既に PDZK1 と結合することを研究(1)で明らかとした OATP1A2 を bait とし、GST-OATP1A2 と His-PDZK1 の二つの組み換えタンパク質複合体に対して BCRP が結合することを見出した。このことにより、取り込みトランスポーター (OATP1A2) と排出トランスポーター (BCRP) が同じ PDZK1 を介して複合体を形成する可能性も示唆できた。

本研究により、取り込みと排出の両トランスポーターが同一のアダプターで制御されることが証明された。このことは、生体が自身に必要な物質を取り込み、不要な物質を排除するため、両者を近接させることで厳密な膜透過制御を行っていることを示唆する興味深い知見である。

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 7 件)

- 1). Shimizu T, Sugiura T, Wakayama T, Kijima A, Nakamichi N, Iseki S, Silver DL, Kato Y. PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. Drug Metab Dispos 39(11): 2148-2154, 2011. 査読有 doi: 10.1124/dmd.111.040295
- 2). Sugiura T, Shimizu T, Kijima A, Minakata S, Kato Y. PDZ adaptors: their regulation of epithelial transporters and involvement in

- human disease. *J Pharm Sci* 100(9): 3620-3635, 2011. 査読有 doi: 10.1002/jps.22575
- 3). Takeuchi K, Sugiura T, Umeda S, Matsubara K, Masato H, Nakamichi N, Silver DL, Ishiwata N, Kato Y. Pharmacokinetics and hepatic uptake of eltrombopag, a novel platelet-increasing agent. *Drug Metab Dispos* 39(6): 1088-1096, 2011. 査読有 doi: 10.1124/dmd.110.037960
 - 4). Sugiura T, Otake T, Shimizu T, Wakayama T, Silver DL, Utsumi R, Nishimura T, Iseki S, Nakamichi N, Kubo Y, Tsuji A, Kato Y. PDZK1 regulates organic anion transporting polypeptide Oatp1a in mouse small intestine. *Drug Metab Pharmacokin* 25(5): 588-598, 2010. 査読有 doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-074
 - 5). Sugiura T, Kato S, Shimizu T, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, Iwata D, Suzuki K, Soga T, Asano M, Iseki S, Tamai I, Tsuji A, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver. *Drug Metab Dispos* 38(10): 1665-1672, 2010. 査読有 doi: 10.1124/dmd.110.032763
 - 6). Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A. Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res* 27(5): 832-840, 2010. 査読有 doi: 10.1007/s11095-010-0076-z
 - 7). Furuichi Y, Sugiura T, Kato Y, Shimada Y, Masuda K. OCTN2 is associated with carnitine transport capacity of rat skeletal muscles. *Acta Physiol* 200(1): 57-64, 2010. 査読有 doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02101.x

[学会発表] (計 6 件)

- 1). Sugiura T, Harada R, Sakai Y, Wakayama T, Kawabata S, Nakamichi N, Iseki S, Kaneko S, Kato Y. Potential protective role of OCTN1/SLC22A4 in progression of dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis. Hitotsubashi Hall (Tokyo, Japan), January 16-18, 2012.
- 2). 杉浦智子、清水卓也、若山友彦、木嶋愛、

中道範隆、井関尚一、加藤将夫 PDZK1 による消化管排泄トランスポーター BCRP の制御と薬物動態への影響 第 6 回トランスポーター研究会年会 東北大学片平さくらホール (宮城) 2011 年 6 月 11-12 日

- 3). 杉浦智子、原田龍一、酒井佳夫、若山友彦、中道範隆、井関尚一、金子周一、加藤将夫 トランスポーター octn1 遺伝子欠損マウスを用いた DMN 誘発性肝線維化の解析 日本薬剤学会第 26 年会 タワーホール船堀 (東京) 2011 年 5 月 29-31 日
- 4). Sugiura T, Kijima A, Shimizu T, Nakamichi N, Tsuji A, Kato Y. Adaptor protein PDZK1 affects drug absorption by regulating multiple small intestinal transporters. 2010 FIP PSWC/AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (USA), November 14-18, 2010.
- 5). 杉浦智子 (招待講演)、中道範隆、加藤将夫 アダプターによる消化管トランスポーターの機能・発現制御と薬物動態への影響 第 5 回トランスポーター研究会 東京医科大学病院臨床講堂 (東京) 2010 年 7 月 10-1 日
- 6). 杉浦智子、竹内和也、松原和貴、梅田沙希、中道範隆、加藤将夫 血小板増多剤 eltrombopag の肝取り込み機構 あわぎんホール徳島県郷土文化会館 (徳島) 2010 年 5 月 12-14 日

[図書] (計 3 件)

- 1). 杉浦智子、加藤将夫 低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab8 による SLC トランスポーターを介した消化管吸収制御 遺伝子医学 MOOK(19) トランスポートソーム生体膜輸送機構の全体像に迫る、金井好克編、株式会社メディカルドゥ、pp.265-270 (2011 年 3 月)
- 2). 清水卓也、杉浦智子、加藤将夫 遺伝子欠損マウスのメタボローム解析による OCTN1 (SLC22A4) の生体内機能の解明 遺伝子医学 MOOK(19) トランスポートソーム生体膜輸送機構の全体像に迫る、金井好克編、株式会社メディカルドゥ、pp.77-82 (2011 年 3 月)
- 3). 杉浦智子、加藤将夫 有機カチオントランスポーター OCTN1/SLC22A4 によるエルゴチオネイン輸送 ビタミン・バイオフィクターのトランスポーター □ *84(10): pp. 465-471 (2010 年 10 月)*

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 智子 (SUGIURA TOMOKO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：70542190

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし