

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390034

研究課題名(和文) 脳・腎薬物輸送におけるトランスポーターの分子実体の解明と機能の統合研究

研究課題名(英文) Elucidation of the transporters, and integration research of their molecular entities and activities for the drug transport in the brain and kidneys

研究代表者

楠原 洋之 (Kusuhara, Hiroyuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00302612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：H⁺/有機カチオン交換輸送体であるMATEについて、薬物の他、内因性代謝物・蛍光物質の尿中排泄に関わることを明らかにした。さらに、cimetidinenなどによる腎排泄における薬物間相互作用の一部はMATE阻害で説明できることを明らかにした。NPT4が促進拡散により利尿薬などアニオン性薬物を輸送する。OCT2が尿中排泄を受ける有機カチオンのうち極性の高い化合物を主に基質とするのに対して、新たにMCT9がOCT2とは異なる基質選択性を示す有機カチオントランスポーターであることを明らかにした。MCT9は腎臓に加えて血液脳関門にも発現が認められることから、薬物の脳内動態にも関与しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study elucidated that MATEs which act as H⁺/organic cation exchanges mediate the urinary excretion of various drugs, endogenous metabolite (N-methylnicotinamide) and fluorescents in mouse, and that inhibition of MATEs is part of the mechanism underlying the drug-drug interactions in the urinary excretion with cimetidine and trimethoprim. NPT4 mediates facilitated diffusion of various anionic drugs such as diuretics in HEK293 cells. MCT9 is found to be expressed on the basolateral membrane of the proximal tubules. Among the drugs which undergo urinary excretion, OCT2 can recognize only hydrophilic compounds as substrate. MCT9 also acts as organic cation transporter showing substrate specificity distinct from OCT2. Since MCT9 is also expressed in the blood-brain barrier, it is speculated that MCT9 is involved in the disposition of drugs in the central nervous system in addition to the kidney.

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：薬物動態・代謝学

キーワード：薬物動態 SLCトランスポーター 腎排泄 薬物間相互作用 血液脳関門 中枢移行性

1. 研究開始当初の背景

個体レベルの薬剤応答性には、薬効関連因子に加えて、薬効関連因子への曝露を決定する体内動態関連因子も深く関わる。体内動態関連因子には、医薬品の代謝に関わる薬物代謝酵素のほか、その膜透過に関わるトランスポーターが知られている。体内動態関連因子としてのトランスポーター(薬物トランスポーター)の最大の特徴は、1つの分子が複数の構造の異なる化合物を基質とする多選択性にある。そのため、限られた数のトランスポーターで、多様な化合物の体内動態の決定要因となることができる。トランスポーターは医薬品の消化管吸収、肝臓や腎臓からの異物排泄、組織移行に関わる複数の分子種が知られており、遺伝的変異や併用薬による機能阻害などその機能変動は必然的に体内動態の個人間変動を生じる。

腎臓は肝臓と並んで重要な異物排泄臓器であり、糸球体ろ過のほか、尿細管分泌により、薬物は尿中へと排泄される。特に、腎近位尿細管には種々のトランスポーターが発現し、外因性化合物や内因性代謝物の尿中排泄に関わる他、尿中からの再吸収を担っている。アニオン性薬物の尿細管分泌において、取り込み過程には OAT1、OAT3 の 2 つの分子種が、カチオン性薬物はヒトでは OCT2 が基底膜側の取り込みに関与することが知られている。一方、アニオン性薬物の細胞内からの排出過程に関しては MRP4 の関与が一部の薬物に留まる。カチオン性薬物に関して派、近年単離された H⁺/有機カチオン交換輸送体 (MATE) が単離され、カチオン性薬物の排出に関与するものと考えられている。

脳には血液脳関門が存在し、薬物を含め生体外異物の中枢移行性を妨げている。この関門機構として、P-glycoprotein をはじめとする ABC トランスポーターによる能動的排出輸送の重要性が明らかにされてきた。一方で、血液中から脳実質内方向への薬物輸送に関しても、飽和性や阻害実験等から、トランスポーターの関与が示唆されているもののその分子実体の同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、医薬品の体内動態の決定因子として、また薬物間相互作用や遺伝子多型の個人間変動要因として、腎臓・脳(特に血液脳関門)における薬物輸送機構を明らかにすることを目的として、以下の研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) マウス in vivo 試験

麻酔下のマウスに採尿のために膀胱カニューレを施した。頸静脈より薬物を持続的に投与し、定常状態における血漿中濃度、尿中排泄量、実験終了時の組織中濃度を測定した。阻害剤として用いた pyrimethamine は、テスト薬物の持続投与開始 30 分前に、cimetidine

は薬物と同時に投与した。薬物量は、LC-MS/MS(QTRAP5500)を用いて定量した。また、腎臓内動態の解析のため、マウス腎臓を露出させ、Nikon AIR 高速共焦点顕微鏡システムを用いて、in vivo イメージングを実施した。

(2) 強制発現細胞・ノックダウン細胞を用いた in vitro 輸送実験

HEK293 細胞を宿主細胞とした過剰発現細胞、siRNA によるノックダウン細胞を構築し、常法に従い in vitro 輸送実験を行った。非放射性化合物の細胞内の薬物量は、LC-MS/MS を用いて定量した。放射性同位体で標識した化合物の定量は、液体シンチレーションカウンターを用いて実施した。

(3) 抗体の作製ならびに WB

ウサギに MCT9C 未ペプチドを免疫し、ポリクローナル抗体を調製した。また、常法に従い、BBB 画分を調製し、WB を行った。

(4) サル腎組織切片を用いた in vitro 試験

摘出サル腎組織から組織切片(300 μm 厚)を調製し、O₂ バブリングしているバッファー中で薬物の組織切片中への取り込みを測定した。放射性同位体での標識化合物の取り込みは液体シンチレーターを用いて、非放射性化合物は LC-MS/MS を用いて定量した。

(5) 臨床検体中の N-methylnicotinamide 濃度の測定

metformin と pyrimethamine との薬物間相互作用試験実施時に採取した血漿、尿検体を用いて、N-methylnicotinamide 濃度を決定した。

(6) マイクロアレイ解析

jvs マウス腎から調製した cDNA を用いて、DNA マイクロアレイ解析を実施した。正常マウスとの比較で、発現変動が生じている遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) 腎有機カチオントランスポーター(MATE)の基質探索と尿中排泄への関与

ヒトにおける MATE1 および MATE2-K の重要性を示唆するため、腎有機カチオントランスポーターの内因性基質として知られる N-methylnicotinamide について、血漿中濃度ならびに尿中排泄量を測定した。その結果、pyrimethamine 投与により、血漿中濃度の時間推移は影響を受けないものの、その尿中排泄量は大きく低下した。腎クリアランスも糸球体ろ過速度程度にまで顕著に低下した。この結果は、臨床等用量の pyrimethamine が MATE1 ならびに MATE2-K による排出輸送を強く阻害することを示している。典型的基質として知られる metformin よりも高感度に MATE 阻害を検出することができる。

H₂ 受容体拮抗薬である cimetidine は、metformin をはじめとする種々カチオン性薬物の尿中排泄を阻害することが知られている。そこで、本薬物間相互作用における MATE の関与について、in vitro ならびに in vivo 試験により検討した。MATE1 および MATE2-K

強制発現系で、cimetidine が MATE1 および MATE2-K に対して競合阻害であることを確認した。また、臨床投与量で得られる遊離形濃度をマウスで再現した場合、metformin など Mate1 で尿中に排泄される薬物について、腎臓中濃度基準の排出輸送が低下することを確認した。すなわち、cimetidine との薬物間相互作用は MATE 阻害によるものであると考えられる。

Pyrimethamine および cimetidine は MATE1 および MATE2-K に対する阻害定数は同程度である。文献情報に基づいて guanfacine が MATE に対する選択性が高いことを *in vitro* 試験で再現した。さらに、trimethoprim による薬物間相互作用メカニズムの解析を行う過程で、trimethoprim が MATE1 よりも MATE2-K をより強く阻害することを明らかにした。これら阻害剤を利用することで、ヒト腎刷子縁膜ベシクルを用いた H⁺/有機カチオン交換輸送に占める MATE1 と MATE2-K の寄与率を評価することが可能である。

Pyrimethamine 投与時に生じる腎臓中薬物濃度の増加が、Mate1 発現部位である近位尿細管で生じることを実証するため、Mate1 基質となる蛍光基質を探索した。カチオン性蛍光基質である ASP、rhodamine123 が、MATE 基質であることを確認した。これら化合物の腎臓中濃度基準の腎クリアランスは pyrimethamine 投与により低下した。腎臓を露出させ、*in vivo* イメージングを行った結果、アニオン性蛍光物質である fluorescein の蓄積部位である近位尿細管中への rhodamine123 の蓄積が認められた。Pyrimethamine による阻害効果が近位尿細管で生じていることを確認した。

以前に報告した pyrimethamine 投与量では、腎臓中の Mate1 機能はせいぜい半分程度にしか、阻害できていなかった (Ito S et al *J Pharmacol Exp Ther*, 2010)。そこで投与液の組成を検討した結果、その 10 倍量の投与が可能となった。その結果、マウス Mate1 に対する Ki 値よりも 10 倍以上高い腎臓中遊離形濃度を達成できた。本条件を用いて、*in vivo* 試験をおこなった。

Cimetidine との薬物間相互作用が生じることが知られている薬物について、マウスにおいて薬物間相互作用試験を実施した。Amiloride や ranitidine の尿中排泄の腎臓中濃度基準の腎クリアランスは、pyrimethamine 投与により低下した。Pindolol、pilsicainide、triamterene に対しては、影響が認められなかった。Cimetidine 投与でも同様の効果が認められたが、pyrimethamine、cimetidine との併用効果は認められなかった。Pyrimethamine と cimetidine の薬効標的が同一であることが示唆された。また、マウスとヒトの間には、相互作用に種差があるものと考えられる。

トリプタンならびに ブロッカーをテスト薬物について、OCT2 ならびに MATE 発現細胞で輸送実験を行った。その結果、OCT2

は極性が高い薬物のみ輸送活性が認められたのに対して、MATE 発現系では輸送活性が認められた。これまで OCT2 と MATE 基質は重複していると考えられてきたが、排出輸送過程に対して、取り込み過程は複数の輸送過程が関与することが示唆された。

(2) NPT4 の機能解析

NPT4 を恒常的に発現する細胞は構築することが出来なかったため、薬剤処理により発現誘導するシステムを利用し、NPT4 過剰発現細胞を構築した。本細胞では、細胞外 Na⁺を K⁺に置換することで、利尿剤をはじめとする種々アニオン性薬物の取り込みが顕著に増加したことから、促進拡散型の輸送を行うトランスポーターであり、生体内では尿中への排泄に関与するものと考えられる。阻害剤探索の結果、C 型肝炎治療薬である telaprevir が阻害剤として見つかった。NPT4 SNP は尿酸値との関連が示唆されている。Telaprevir も尿酸蓄積の作用を有することから、NPT4 阻害の関与が疑われる。

(4) jvs マウスのマイクロアレイ解析

jvs マウスではpyrilamineの腎取り込みが低下していることから、カチオン性薬物トランスポーターの発現低下を疑い、DNA マイクロアレイ解析を実施した。脂肪酸の N-アシル化酵素など脂肪酸代謝に関わる遺伝子の発現変動は認められたが、トランスポーターの発現変動は軽微であり、mRNA の変動以外の要因で輸送活性の低下が認められたものと考えられる。

(5) MCT9 の機能解析

MCT9 は脳・肝臓、肺の内皮細胞画分の発現プロファイル解析で、脳毛細血管内皮細胞に発現が認められるトランスポーターである。また、生体内では腎臓での発現量が高い。予備試験の結果、HEK293 細胞をはじめ、種々の細胞に内因性に発現していることを確認した。サル脳由来から単離した脳毛細血管画分を利用し、Western blot を行い、脳毛細血管のマーカー蛋白である P-gp と同様、内皮細胞画分への濃縮を確認したほか、マウス腎臓から密度勾配を実施して膜画分を調製し、Western blot を行った結果、基底膜側への発現が示唆された。ヒト脳・腎組織切片を用いた免疫染色によっても、脳毛細血管内皮細胞、腎近位尿細管基底膜への局在が確認されている。

HEK293 細胞における KD 細胞において、varenicline の細胞内取り込みが低下した。HEK293 細胞において、varenicline の取り込みは飽和性を示し、かつ H⁺との交換輸送であることが示唆された。HEK293 細胞での過剰発現細胞、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた過剰発現細胞において、varenicline の輸送が認められた。OCT2 基質である TEA による阻害がかからないことを確認した。

サル腎臓から調製した組織切片を用いた *in vitro* 試験により、varenicline の腎組織内への取り込みは、OCT2 輸送が飽和する濃度で TEA による阻害が認められなかったことから、OCT2 とは異なる輸送機構により、腎臓内への取りこまれることが期待される。Varenicline は腎排泄型の医薬品であり、中枢作用薬でもある。その動態に、従来の OCT2 や MATE ではなく、MCT9 が関与していることが示唆された。

以上、本研究により、腎有機カチオントランスポーター、特に MATE を中心に解析し、薬物や内因性代謝物の *in vivo* 腎排泄における重要性をマウスならびにヒトにおいて実証するとともに、新たに NPT4 と MCT9 が薬物トランスポーターとして、医薬品体内動態に関連していることを示唆する結果を得た。

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 10 件)

全て査読あり

Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, Toyoshima J, Inoue K, Yuasa H, Sugiyama Y. Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 340:393-403, 2012.

Jin L, Kikuchi R, Saji T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Regulation of tissue-specific expression of renal organic anion transporters by hepatocyte nuclear factor 1 α/β and DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther.* 340:648-55, 2012.

Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the impact of active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a surrogate. *J Pharmacol Exp Ther.* 339:935-44, 2011.

Takahara N, Saga T, Inubushi M, Kusuhara H, Seki C, Ito S, Oyama N, Yokoyama O, Sugiyama Y, Fujibayashi Y. Drugs interacting with organic anion transporter-1 affect uptake of Tc-99m-mercaptoacetyltriglycine (MAG3) in the human kidney: Therapeutic drug interaction in Tc-99m-MAG3 diagnosis of renal function and possible application of Tc-99m-MAG3 for drug development. *Nucl Med Biol.* 40:643-50, 2013

Kusuhara H, Miura M, Yasui-Furukori N,

Yoshida K, Akamine Y, Yokochi M, Fukizawa S, Ikejiri K, Kanamitsu K, Uno T, Sugiyama Y. Effect of coadministration of single and multiple doses of rifampicin on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 41, 206-13, 2013

Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Tanabe K, Yuasa H, Sugiyama Y. N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther.* 92:635-41, 2012

Imai S, Kikuchi R, Tsuruya Y, Naoi S, Nishida S, Kusuhara H, Sugiyama Y. DNA methylation and histone modification profiles of mouse organic anion transporting polypeptides. *Drug Metab Dispos.* 41:72-8, 2013.

Ito S, Ando H, Ose A, Kitamura Y, Ando T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Relationship between the urinary excretion mechanisms of drugs and their physicochemical properties. *J Pharm Sci.* 102:3294-301, 2013

Miyajima M, Kusuhara H, Takahashi K, Takashima T, Hosoya T, Watanabe Y, Sugiyama Y. Investigation of the effect of active efflux at the blood-brain barrier on the distribution of nonsteroidal aromatase inhibitors in the central nervous system. *J Pharm Sci* 102:3309-19, 2013

Kodaira H, Kusuhara H, Fuse E, Ushiki J, Sugiyama Y. Quantitative Investigation of the Brain-to-Cerebrospinal Fluid Unbound Drug Concentration Ratio under Steady-State Conditions in Rats Using a Pharmacokinetic Model and Scaling Factors for Active Efflux Transporters. *Drug Metab Dispos.* 42:983-9, 2014.

[学会発表](計 24 件)

楠原洋之他、Role of organic ion transporters in the renal elimination of drugs: clinical investigation using *in vivo* inhibitors. 2nd Annual Clinical Relevant Drug Transporters. 2012 年 4 月 12 日、Berlin, Germany

伊藤澄人他、Investigation of the importance of MATE1 in the renal elimination of cationic drugs using a potent MATE1 inhibitor, pyrimethamine. 4th Asian Pacific ISSX meeting, 2011 年 4 月 21 日、台南、台湾
伊藤澄人他、cimetidine の腎薬物排泄における薬物間相互作用機構の解析、日本薬剤学会第 26 年会、2011 年 5 月 29 日 ~ 2011 年 5 月 31 日、東京

楠原洋之、Importance of drug transport in clinical PK or target effects. Gordon Research Conference、2011 年 7 月 11 日、New

Hampshire, USA
楠原洋之、Quantitative evaluation of the impact of active efflux by P-gp and Bcrp at the BBB on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as surrogate. Biomedical Transporters. 2011年8月11日、Grindelwald、Switzerland.
伊藤澄人他、Investigation of the roles of mates in the urinary excretion of N-methylnicotinamide in healthy subjects. 26th JSSX meeting、2011年11月16-18日、広島
横地美優他、Investigation of substrate specificity of the organic anion transporter, sodium phosphate transporter 4 (NPT4)/SLC17A3、26th JSSX meeting、2011年11月16-18日、広島
楠原洋之他、Investigation of the drug-drug interaction mechanism of cimetidine in the renal elimination process. 26th JSSX meeting、2011年11月16-18日、広島
宮島真理他、Characterizing determining factors for brain exposure of aromatase inhibitors. 26th JSSX meeting、2011年11月16日~2011年11月18日、広島
楠原洋之他、Investigation of in vivo drug-drug interactions involving renal organic cation transporters using endogenous substrate. 第5回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2011年11月27日、名古屋
楠原洋之他、メタボローム解析に基づいた薬物間相互作用研究、日本薬学会132年会、2012年3月29日~2012年3月31日
楠原洋之、Quantitative Investigation of Drug Transport across the BBB. CPSA Shanghai 2012、2012年4月26日、Shanghai,China
楠原洋之、Use of microdosing PET studies in new drug discovery and development: Development of PET probes for drug transporters. Symposium on Functional and Molecular Imaging in Drug Discovery and Development. 2012年11月2日、Soul, Korea
楠原洋之、腎臓での薬物間相互作用の予測、第332回CBI学科い研究講演会、2012年12月14日、東京
楠原洋之、Role of ABC transporters in the drug disposition: interplay between uptake and efflux transporters. 18th North American Regional Meeting、2012年10月14日~2012年10月18日、Dallas、USA
楠原洋之、マイクロドーズ試験に基づいた体内動態特性の評価と薬剤応答性の予測、日本動物実験代替法学会 第26回大会開催、2012年12月7日~2012年12月9日、東京
金光佳世子他、Prediction of histamine H1 antagonist occupancy in the brain based on the systemic exposure, in vitro binding

activity and active transport systems. 27th JSSX Annual Meeting、2012年11月20日~2012年11月22日、東京
伊藤澄人他、Involvement of Mate1 in the drug interaction caused by cimetidine in urinary excretion of cationic drugs. 27th JSSX Annual Meeting、2012年11月20日~2012年11月22日、東京
楠原洋之、Drug-transport interactions: kinetic concepts and clinical studies to demonstrate relevance of in vitro mode predictions. GPEN2012、2012年11月28日~2012年12月2日、Melbourne、Australia
楠原洋之、Drug Transporters: clinical relevance and prediction from preclinical animal model and in vitro model. APA2012、2012年9月17日~2012年9月19日
21 鬼頭朋子他、Investigation of the role of organic cation transporters in the urinary excretion of triptans and beta-blockers. 27th JSSX Annual Meeting. 2012年11月20日~2012年11月22日、東京
22 伊藤澄人他、カチオン性医薬品腎排泄過程における薬物間相互作用における MATE の関与、日本薬剤学会第27年会、2012年5月24日~2012年5月26日、神戸
23 横地美優他、有機アニオントランスポーター Sodium Phosphate Transporter 1(NPT1/SLC17A 1)の基質選択性の比較
24 小林和正他、Functional Characterization of organic cation transport in HEK293 cells. 、2012年11月28日~2012年12月2日、Melbourne、Australia

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molpk/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠原 洋之 (KUSUHARA HIROYUKI)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：00302612

(2) 研究分担者

林 久允 (Hayashi Hisamitsu)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：10451858

(3) 連携研究者

()

研究者番号：