

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293032

研究課題名(和文) カチオン性薬物の体内動態における新規トランスポーター群の重要性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the importance of novel transporters in the disposition of cationic drugs

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳内で血液脳関門に特異的に発現するトランスポーターについて、その生理機能を解明するため、*in vitro*試験ならびに遺伝子改変動物を作出し、個体レベルでの薬物動態試験およびメタボローム解析を行った。強制発現系を用いた*in vitro*スクリーニングによりSLC35F2の基質および阻害剤の特異性を明らかにした。遺伝子改変動物では脳および尿(尿中排泄量)における薬物や内在性化合物濃度が変動しており、SLC35F2がその膜輸送に関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the physiological functions of transporters expressing specifically in the blood brain barrier in the brain, *in vitro* transporter study, and *in vivo* pharmacokinetic and metabolome analysis in gene knockout mice were conducted. In addition to clarifying the substrate and inhibitor specificities of SLC35F2 *in vitro* screening using over expression system, changes in the concentrations of drugs and/or endogenous compounds in the brain and urine (urinary excretion) were observed in the knockout mice, suggesting that SLC35F2 is involved in the membrane transport of these compounds.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：有機カチオン トランスポーター 薬物動態 血液脳関門 薬物輸送 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは薬物を初めとした種々低分子化合物の膜輸送に働き、その基質選択性・輸送能力が薬物の尿・糞中への排泄や、血液脳関門(脳毛細血管内皮細胞)など関門機構を介した透過など組織分布の決定要因となる。薬物トランスポーターの分子実体の解明も進み、医薬品開発における体内動態特性の最適化、および薬物相互作用に関連する分子として、その重要性は広く受け入れられている(International Transporter Consortium et al, *Nat Rev drug Discov*, 2010)。未だトランスポーター分子が同定されていない薬物輸送機構も生体内に存在している。脳毛細血管内皮細胞由来の不死化細胞では、H⁺輸送と共役した既知薬物輸送システムとは異なるトランスポーターの発現が報告されている(André P et al, *J Cereb Blood Flow Metab* 2009 を端緒として複数)、前立腺がん由来の細胞群ではYM-155の細胞内取り込みが飽和性を示すことが報告されている(Minematsu T et al *Drug Metab Dispos*, 2009)。これらの分子機序の解明は、薬物の中樞神経系への送達効率を改善するための素子としての役割が期待される。Solute carrier (SLC)トランスポーターは51の family に分類されており、その中には基質が同定されていない、いわゆるオーファントランスポーターが存在している。マイクロアレイ等を用いた発現プロファイル解析により、脳内で脳毛細血管内皮細胞特異的に発現しているトランスポーター群もデータベース上に見出すことができる(Daneman R et al *PLOS one*, 2010 他)。

申請者は、内皮細胞特異的に発現するオーファントランスポーターの中に、新規薬物トランスポーターが存在していると考えた。本研究の開始時には、HEK293細胞に内在性に発現している SLC16A9 が多様な薬物を基質とすることを、ほ乳類細胞の SLC16A9 ノックダウン細胞を用いて見出した。生体内では脳毛細血管内皮細胞のほか、腎臓にも高発現しており、本トランスポーターが脳内動態のほか、腎臓内薬物動態にも関与していることが考えられる。ゲノムワイド関連解析の結果、SLC16A9 SNP と carnitine のレベルとの関連が示唆されているものの (Kolz M et al *PLoS Genet*. 2009 他 4 報) in vivo における役割は明らかにされていない。本研究では、SLC16A9 を初めとした血液脳関門特異的に発現しているオーファントランスポーターについて、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子改変動物を作出し、個体レベルにおける重要性を解明することに取り組む。

2. 研究の目的

脳毛細血管内皮細胞に特異的に発現するオーファントランスポーターに注目し、その基質の同定ならびに個体レベルにおける薬物動態における重要性を解明することを目的とする。ほ乳類細胞を宿主細胞として用い

た強制発現系を用いた、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子欠損マウスを作出し、薬物の組織分布やクリアランス能力を比較する。研究開始時には、申請者が in vitro での知見を有している SLC16A9 に注目したが、研究の進展に伴い SLC35F2 ならびに SLC16A4 にも拡張した。また、基質を同定する手法として、網羅的に内在性化合物を探索する手法であるメタボローム解析も導入し、薬物および代謝物、植物由来の代謝物も含めて、基質情報を拡張することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルの薬物動態解析

CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子欠損マウスを交配し、野生型と遺伝子欠損マウス(ホモ)を得た。両マウス(成獣)に薬物を静脈内投与し、採血し、血漿中濃度の時間推移を測定した。実験終了時に、組織を摘出し、薬物濃度を測定した。薬物動態パラメータとして、全身クリアランスならびに腎クリアランスを測定した。薬物濃度は、LC-MS/MS を用いて定量した。

(2) メタボロミクス解析

野生型マウスおよび遺伝子欠損マウスの体液(血漿・尿)および組織を摘出し、LC-MS/MS などを用いた分析法を用いて、既知化合物群の一斉分析、あるいは網羅的なピーク情報を取得した。カチオン性化合物の検出を高感度化することを目的として、3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate による誘導体化(Shimbo K et al, *RCM*, 2009)を行った。

変動が認められた化合物については、別系統の個体で再現性を確認するとともに、定量系を構築した再現試験、ならびに同位体標識した化合物を投与することで、検証した。

(3) トランスポーターの安定発現系を用いた基質探索

ほ乳類発現ベクターにトランスポーター遺伝子を導入し、HEK293細胞を宿主細胞として安定発現系を構築した。安定発現系を播種し、化合物を添加し、バッファー中化合物濃度と細胞内濃度を測定した。対照細胞との比較により、トランスポーターの特異性を検証した。

4. 研究成果

本研究では、担体依存的な輸送の存在が示唆されているものの分子機構が不明となっている薬物や内因性物質の輸送担体の同定、および予測されている全トランスポーターのうち2-3割を占める機能が未知となっているオーファントランスポーターの機能同定を目的としている。特に、SLC16A9 および SLC35F2、SLC16A4 など、脳内において血液脳関門に特異的に発現しているトランスポーターに注目した。

(1) KO マウスの作出

いずれのトランスポーターも CRISPR-Cas9 システムを用いて作出した。交配により変異をホモで有する個体(以下、KO)を作出した。SLC16A9KO では腎臓の mRNA の低下を確認した。SLC35F2KO マウスでは、発現組織での SLC35F2 mRNA の顕著な低下、ならびに Western blot により発現の消失を確認した。SLC16A4 は F1 マウスを野生型マウスと交配したが、産仔を得ることが出来なかった。その理由は不明であるが、体外受精を実施したところ、KO 個体を得るに至ったことから、受精能には影響を与えないものと考えられる。

(2) SLC16A9KO マウスにおける薬物動態解析

SLC16A9KO マウスでは、腎機能の指標である GFR は野生型マウスと同程度であることを確認した。In vitro 試験の結果、基質として認められた amantadine や varenicline など中枢作用薬について、血液脳関門の輸送能力を反映した脳 - 血漿濃度比ならびに腎クリアランスを測定した。当初、腎排泄の増大を示唆する結果が認められたこともあったが、個体間変動が大きく、結果の再現性は低かった。複数回、試験を実施した結果、検討したいずれの薬物についても速度論パラメータは野生型マウスと SLC16A9KO マウスでは同一であるとの結論に至った。いずれの薬物も脳毛細血管容積に対して十分大きい脳-血漿濃度比を示したが、SLC16A9 の欠損に伴う変動は認められなかった。

SLC16A9KO マウスの血漿および尿検体について、メタボローム解析を実施した。血漿では、carnitine は野生型マウスと同程度であったが、脂肪酸が付加した acylcarnitine の血漿中濃度の増加が認められた。そのほか、cystine および ergothioneine、thymidine の血漿中濃度の低下、betaine の尿中排泄量の増加が認められた。しかし、メタボローム解析で変動が認められた化合物について、LC-MS/MS による定量系を構築し、再測定した結果、betaine については腎クリアランスの変動は認められず、cystine については解析に供した系統のマウスでは LC-MS/MS を用いた解析で再現できたものの、別系統のマウスでは再現することができなかった。Thymidine は野生型マウスと同程度であった。

以上の結果から、in vitro データに基づいた当初の期待と異なり、SLC16A9 が個体レベルでの薬物動態に関連していることを明確にするデータを得ることはできなかった。

(3) SLC35F2

本研究開始後、PC-3 細胞から YM-155 の細胞内取り込みに関わるトランスポーターとして、SLC35F2 が単離された(Winter GE et al Nat Chem Biol, 2014)。そこで、SLC35F2 の基質選択性および in vivo 体内動態解析を本研究課題にて実施した。マウス脳毛細血管濃縮画分、腎臓において、SLC35F2 の mRNA お

よびタンパクでの発現を確認することができた。特異性は、SLC35F2KO マウス由来の検体では、シグナルの減弱あるいは消失で確認した。

HEK293 細胞にヒトおよびマウス SLC35F2 の安定発現系を構築した。SLC35F2 は細胞膜に局在し、ヒトおよびマウス SLC35F2 の過剰発現に伴い、YM-155 の細胞内取り込みの増大が認められた。YM-155 のミカエリス定数は同程度であり、ヒトとマウス間で機能の保存が示唆された。その一方で、SLC35F2 のホモログである SLC35F1 の強制発現細胞では、YM-155 の取り込みは認められなかったことから、YM-155 の輸送輸送は SLC35F2 の特徴であると考えられる。

SLC35F2 による YM-155 輸送は、 Na^+ や H^+ 濃度には依存しないものの、エネルギー依存性は認められた。輸送駆動力の観点から、血液脳関門ほかで発現が示唆されている H^+ 有機カチオン交換輸送系ではないと考えられる。SLC35F2 に対する阻害剤を探索した結果、famotidine, clonidine, diphenhydramine, pyrilamine, imipramine および quinidine による阻害が認められたが、carnitine や TEA では阻害が認められなかった。YM-155 以外の基質を探索するため、阻害効果が認められた famotidine など 13 化合物について、対象細胞と KO 細胞で細胞内取り込み量を測定した。その結果、famotidine や pyrilamine で有意な減少が認められたが、 H^+ coupled organic cation transport が報告されている nicotine, clonidine では対象細胞では十分な細胞内取り込みがあるものの、KO 細胞での細胞内取り込みは同程度であった。

脳毛細血管内皮細胞における SLC35F2 機能を検証するため、ヒト血液脳関門由来の不活化細胞 hCMEC/D3 細胞(以下 D3 細胞)における発現と YM-155 の輸送活性を評価した。前述の PC-3 細胞に比べて、絶対値は低いものの SLC35F2 mRNA およびタンパクレベルでの発現が認められた。D3 細胞においても、YM-155 の飽和性輸送が認められ、かつ SLC35F2 阻害剤による阻害が認められた。さらに siRNA を用いた SLC35F2 のノックダウンによりタンパク発現の低下およびそれに伴い YM-155 の輸送活性の低下が認められた。血液脳関門においても、SLC35F2 が薬物輸送に関連していることを示唆する結果である。

SLC35F2KO マウスを用いて薬物動態試験を実施した。YM-155 の血漿中濃度は野生型マウスと同程度であった。脳 - 血漿濃度比は野生型マウスでは個体間変動が大きいものの、SLC35F2KO マウスでは低い値で一定であった。血漿中に SLC35F2 機能を妨害する化合物が含まれている可能性もあるため、脳還流法など in situ の実験系を導入し、血液脳関門透過性を直接測定することで、明確な結果が得られる物と期待する。また、diphenhydramine では尿中排泄量が 4 倍程度増加しており、再吸収や腎臓内代謝の低下が

示唆される。SLC35F2 機能との関連については、更なる解析を必要とする。

SLC35F2 が輸送する基質情報を拡張するため、脳、血漿および尿検体に対してメタボローム解析を実施した。CE-TOFMS を用いた解析の結果、コリン前駆体である alpha glycerophosphocholine の脳内濃度の低下が認められた。また、LC-MS/MS を用いた解析の結果、ポリアミンの1つである putrescine の尿/血漿濃度比の増大が認められた。これらの化合物は、SLC35F2 の内在性基質であることが示唆される。alpha glycerophosphocholine では、KO 細胞培養時のメディウム中濃度の増大が認められており、細胞での利用能が減少、または産生が増大していることが示唆されている。

結論

本研究により、SLC16A9 および SLC35F2 の機能解析を実施した。SLC16A9 に関しては、少なくとも KO マウスを用いた個体レベルでの解析では、薬物動態の変動が認められなかった。SLC35F2KO マウスでは、薬物および内在性代謝物の動態変動が認められた。体内動態が変動する機序については、引き続き解析を必要とする。

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11件)

原著論文 全て査読有り

1. Kato K, Moriyama C, Ito N, Zhang X, Hachiuma K, Hagima N, Iwata K, Yamaguchi JI, Maeda K, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y, Kusuhara H. Involvement of organic cation transporters in the clearance and milk secretion of thiamine in mice. *Pharm Res*, 32(7):2192-204, 2015
2. Izumi S, Nozaki Y, Komori T, Takenaka O, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Investigation of fluorescein derivatives as substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 to develop sensitive fluorescence-based OATP1B1 inhibition assays. *Mol Pharm*.
3. Liu H, Yu N, Lu S, Ito S, zhang X, Prasad B, He E, Lu X, Li Y, Wang P, Xu H, An G, Unadkat JD, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sahi J. *Drug Metab Dispos* 43:1008-18, 2015
4. Nagaya Y, Nozaki Y, Takenaka O, Watari R, Kusano K, Yoshimura T, Kusuhara H. Investigation of utility of cerebrospinal fluid drug concentration as a surrogate for interstitial fluid concentration using microdialysis coupled with cisternal cerebrospinal fluid sampling in wild-type and Mdr1a(-/-) rats. *Drug Metab Pharmacokinet* 31:57-66, 2016.
5. Kanamitsu K, Arakawa R, Sugiyama Y,

Suhara T, Kusuhara H. Prediction of CNS occupancy of dopamine D2 receptor based on systemic exposure and in vitro experiments. *Drug Metab Pharmacokinet*. 31:395-404, 2016

6. Kanamitsu K, Nozaki Y, Nagaya Y, Sugiyama Y, Kusuhara H. Quantitative prediction of histamine H1 receptor occupancy by the sedative and non-sedative antagonists in the human central nervous system based on systemic exposure and preclinical data. *Drug Metab Pharmacokinet*. 32:135-144, 2017

7. Ito M, Kusuhara H, Ose A, Kondo T, Tanabe K, Nokayama H, Horita S, Fujita T, Sugiyama Y. Pharmacokinetic modeling and monte-carlo simulation to predict interindividual variability in human exposure to oseltamivir and its active metabolite, Ro 64-0802. *AAPS J* 19:286-297, 2017.

8. Takano H, Ito S, Zhang X, Ito H, Zhang MR, Suzuki H, Maeda K, Kusuhara H, Suhara T, Sugiyama Y. Possible role of organic cation transporters in the distribution of [¹¹C]sulpiride, a dopamine D₂ receptor antagonist. *J Pharm Sci*, in press

9. Kanamitsu K, Kusuhara H, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y. Investigation of the importance of multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4) in the active efflux of anionic drugs across the blood brain barrier. *J Pharm Sci*, in press

10. Tsuruya Y, Nakanishi T, Komori H, Wang X, Ishiguro N, Kito T, Ikukawa K, Kishimoto W, Ito S, Schaefer O, Ebner T, Yamamura N, Kusuhara H, Tamai I. Different involvement of OAT in the renal disposition of oral anticoagulants rivaroxaban, dabigatran and apixaban. *J Pharm Sci*, in press

11. Kurosawa T, Higuchi K, Okura T, Kobayashi K, Kusuhara H, Deguchi Y. Involvement of proton coupled organic cation antiporter in varenicline transport at blood-brain barrier of rats and in human brain capillary endothelial cells. *J Pharm Sci*, in press

[学会発表](計24件)

招待講演

1. 楠原洋之 2014 ICCA-LRI&JRC Workshop, 2014年6月18日~19日、Lugano、Switzerland
2. 楠原洋之 第54回日本先天異常学会学術集会、2014年7月26日~27日、神奈川県相模原市
3. 楠原洋之 第4回 杉山特別研究室(理研)公開シンポジウム、2014年9月25日、東京
4. 楠原洋之 第5回 杉山特別研究室(理研)公開シンポジウム、2015年2月9日~10日、神奈川県鶴見市
5. 楠原洋之 Experimental Biology 2015、2015年3月28日~4月1日、Boston, USA

6. 楠原洋之 第6回 杉山特別研究室(理研)公開シンポジウム、2016年8月27日、神奈川県鶴見市
7. 楠原洋之 Barcelona BioMed Conference: Blood Brain Barrier, 2015年11月2日~4日、Barcelona, Spain
8. 楠原洋之 日本薬物動態学会第30回年会、2015年11月12日~14日、東京
9. 楠原洋之 第36回日本臨床薬理学会学術総会、2015年12月9日~11日、東京
10. 楠原洋之 第373回CBI学会講演会、2016年6月2日、東京
11. 楠原洋之 30th Anniversary Symposium of The Nagai Foundation Tokyo, 2016年7月7日、東京
12. 楠原洋之 第8回 杉山特別研究室(理研)公開シンポジウム、2016年10月16日、神奈川県鶴見市
13. 楠原洋之 第10回メタボロームシンポジウム、2016年10月19日~21日、山形県鶴岡市
14. 楠原洋之 第29回日本動物実験代替法学会、2016年11月16日~18日、福岡県福岡市
15. 楠原洋之 第378回CBI学会講演会、2016年12月8日、東京
16. 楠原洋之 International Transporter Consortium Workshop3, 2017年3月14日~15日、Washington DC, USA

一般発表

1. 加藤幸司、森山知洋、伊藤直樹、八馬賢次、萩間奈緒子、岩田勝也、山口順一、鈴木洋史、杉山雄一、楠原洋之、日本薬剤学会第29年会、2014年5月20日~22日、埼玉県大宮市
2. 楠原洋之、鬼頭朋子、伊藤澄人、日本薬剤学会第29年会、2014年5月20日~22日、埼玉県大宮市
3. 楠原洋之、加藤幸司、山口順一、伊藤直樹、鈴木洋史、杉山雄一 肝病態生理研究会、2014年5月31日、東京
4. 鶴谷有里、楠原洋之 日本薬剤学会第30年会、2015年5月21日~23日、長崎県長崎市
5. 佐野大和、鶴谷有里、前田和哉、楠原洋之 日本薬物動態学会第30回年会、2015年11月12日~14日、東京
6. 三宅健之、楠原洋之 日本薬物動態学会第30回年会、2015年11月12日~14日、東京
7. 三宅健之、楠原洋之 第21回創剤フォーラム若手研究界、2015年11月28日、東京
8. 望月達貴、水野忠快、楠原洋之 日本薬物動態学会第31回年会、2016年10月13日~15日、長野県松本市

〔図書〕(計1件)

1. 楠原洋之、生物薬剤学 6章1 薬物動態に基づく薬物相互作用、南江堂、2015

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし