

氏名	岩田 大祐
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第1021号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	OCTN トランスポーターの生理的・薬理的役割の解明を目指した遺伝子変異マウスの作成と応用
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 横井 毅(医学系研究科・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・准教授), 松下 良(自然科学研究科・准教授)

Although many drug transporters have been identified, little is known about their contribution to drug disposition in the body. To elucidate the physiological and pharmacological roles of carnitine / organic cation transporter, OCTN family, the contribution of OCTN family was examined with gene mutant mice. *Octn2* was involved in carnitine uptake to the heart, indicating that OCTN2 has a physiologically important role in the heart. The uptake was inhibited by several cationic drugs, implying that OCTN2 has relevance to the side effect of drugs in the heart. Although carrier-mediated system would be involved in the distribution of organic cations to the heart, the contribution of *Octn2* to the distribution was small. *octn1* gene knockout mice (*octn1*<sup>-/-</sup> mice) were generated to evaluate the physiological and pharmacological role of OCTN1. *octn1*<sup>-/-</sup> mice exhibited significant decrease of ergothioneine in the body, indicating that OCTN1 maintains ergothioneine concentration in the body as one of the physiological roles. OCTN1 was contributed to the absorption in the intestine, the distribution to organs and the reabsorption in the kidney of ergothioneine, suggesting that OCTN1 affect the disposition of its substrates, including drugs.

## 序論

薬物の体内動態において生体膜透過は吸収や分布、排泄などに関わる重要な過程である。従来、薬物の生体膜透過は薬物の物理化学的性質に支配され、pH分配仮説に従うと考えられてきたが、これのみでは説明できない現象が多く報告されている。その一部を説明するものとして、近年、薬物の生体膜透過過程に関与する膜タンパク質としてトランスポーター分子が多数同定され、これらが薬物の体内動態に寄与することを示唆する報告がなされるようになった。このことから、トランスポーター群の薬物の体内動態における寄与の解明は、創薬の現場において体内動態の最適化(薬物の消化管吸収の改善、薬効部位へのターゲティング、排泄の調節など)や、体内動態の個人差の解明、またトラ

ンスポーター分子の広い基質認識性から、薬物-薬物間あるいは薬物-食物間相互作用の機構解明にも繋がると期待される。

これまでのところ、薬物の体内動態におけるトランスポーターの重要性は、組織や単離細胞、膜ベシクルなどにより示されており、分子生物学的手法の進展によりその分子の実体も多数同定され、その基質となる薬物も多数報告されている。しかしながら、その実験手法の多くは *in vitro* 実験系であり、個体あるいは生理レベルにおいてトランスポーターの寄与が明確に示された例は希少である。以上から、トランスポーターが体内動態へ及ぼす寄与を個体レベルで検証・解明することが現在の最重要課題の1つとなっている。

遺伝子ノックアウト動物は、特定の遺伝子が生体において担う役割を明らかとする上で、大変有効なツールであり、歴史的にも、これらの作成・利用によって重要なトランスポーター分子の役割が検証されてきており、当該研究分野におけるその有用性は今後ますます高まると考えられる。本研究では、薬物トランスポーターとして当研究室で同定されたカルニチン/有機カチオントランスポーターOCTNファミリー(OCTN1、OCTN2)に着目し、それらの遺伝子欠損マウスを用いて、OCTNファミリーの生理的および薬理的役割の解明を試みた。

### 心臓への薬物移行における OCTN2 の寄与

トランスポーターの薬物体内動態における寄与解明は腎臓や肝臓、小腸などの吸収や排泄に関わる臓器を中心に研究されてきており、種々の臓器への薬物の移行過程におけるトランスポーターの寄与に関しては、血液臓器関門を除いて、ほとんどが明らかとされていない。当研究室で同定されたOCTNファミリーでは、特にOCTN2がカルニチンに高い親和性を示し、さらに、当研究室によってOCTN2機能欠損がヒトおよびマウスにおいて全身性カルニチン欠乏症の原因となることが報告されている。全身性カルニチン欠乏症患者やOctn2を機能的に欠損したjuvenile visceral steatosis (*jvs*)マウスでは、顕著な心肥大が観察され、心筋細胞に異常なミトコンドリアや脂肪滴の増大が認められる。さらに、*jvs*マウスでは、心臓のカルニチン濃度が低く、カルニチン移行も低下していることが報告されている。心臓には、OCTN1およびOCTN2が発現していることが示されており、OCTN2が心臓における薬物・栄養物の移行に主要な寄与を及ぼしていることが推測された。そこで、臨床上、薬物作用部位として、また、副作用発現部位として重要な心臓を取り上げ、それにおけるOCTNファミリーの役割を明らかとすることを目的として、OCTN2を中心として解析を行った。

マウス心臓におけるmOctnファミリーの発現と局在を明らかにする目的で、

免疫組織学的解析を行った。その結果、mOctn1 は心臓血管内皮細胞、mOctn 2 は心筋細胞膜に発現することが明らかとなった一方、mOCTN3 の発現は観察されなかった。この結果から、mOctn 2 が心筋細胞に発現し、物質輸送に寄与することが示唆された。

心臓における mOctn 2 の輸送活性を明らかとする目的で、OCTN2 の基質であるカルニチンおよびキニジンを用いて心臓への取り込みクリアランスを求めたところ、カルニチンでは  $50.2 \pm 11.1 \mu\text{L}/\text{min}/\text{g tissue}$ 、キニジンでは  $788 \pm 190 \mu\text{L}/\text{min}/\text{g tissue}$  と得られ、何らかの心臓への取り込み機構の存在が示唆された。さらに、大量の非標識体カルニチンを同時投与したところ、カルニチンの取り込みクリアランスは顕著に低下したが、キニジンの取り込みクリアランスに変化は観察されなかった。このことから、カルニチンの心臓移行に担体介在輸送系の関与が示唆され、心臓細胞膜に発現する mOctn 2 の寄与が考えられた。また、キニジンの心臓移行にカルニチン輸送系の関与は低いと思われた。

カルニチンとキニジンの心臓移行機構を検討するために、心臓組織切片を用いて取り込み実験を行った。カルニチン及びキニジンの取り込みは、それぞれ 2 hr 及び 15 min まで直線的に時間依存的に増加した。また、 $4^{\circ}\text{C}$  及び高濃度の非標識体添加により取り込み量は顕著に低下し、温度依存性及び飽和性を示した。このことから、カルニチン及びキニジンの心臓組織切片への取り込みには担体介在輸送系の関与が示唆され、mOctn 2 が寄与する可能性が考えられた。

mOctn 2 の寄与を明らかとするために、心臓組織切片取り込みの  $\text{Na}^+$  依存性を検討した。カルニチンの取り込みは  $\text{Na}^+$  の置換により低下したのに対し、キニジンの取り込みに変化はみられなかった。この結果は、OCTN2 発現系における結果と一致するものであった。それぞれの取り込みの基質選択性を明らかとするために、各種化合物による阻害作用を検討した。カルニチンの心臓組織切片への取り込みはカルニチン類似体、tetraethylammonium (TEA)、キニジン、ベラパミル、ピリラミンによって減少し、グアニジン、N-methylnicotinamide、p-アミノ馬尿酸、プロベネシドで阻害されず、発現系における阻害様式と同様であった。一方、キニジンの取り込みは、ベラパミル、ピリラミンによって阻害されるものの、カルニチン類似体で阻害されず、カルニチン輸送系の関与は小さいことが示唆された。また、典型的な輸送系の基質となるカチオン性化合物やアニオン性化合物でも変化は観察されなかったため、キニジンの取り込みにこれまでとは異なるメカニズムの存在が考えられた。mOctn 2 の寄与を直接検討するために、jvs マウスの心臓組織切片を用いて取り込み実験を行ったところ、カルニチンの取り込みは顕著に低く、細胞外スペースマーカーとして用いたマンニトールの取り込み量程度であった。これらのことから、心臓組織切片へのカルニチンの取り込みは主に mOctn 2 が寄与していることが考えられた。一方、

*jvs* マウスの心臓組織切片におけるキニジンの取り込みは wild-type とほぼ同じで、キニジン取り込みへの mOctn 2 の寄与は低いと考えられた。

さらに、OCTN2 発現系の検討により基質となることが示されている、1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP)、TEA、ベラパミル、ピリラミンの心臓組織切片への取り込みを検討したところ、MPP、ベラパミル、ピリラミンについては時間依存的な取り込みがみられ、温度依存性及び飽和性を示し、担体介在輸送の関与の可能性が考えられた。しかしながら、*jvs* マウスの心臓組織切片へこれら塩基性化合物の取り込みは wild-type マウスと差が見られなかったことから、これら化合物の心臓移行への mOctn 2 の寄与は小さいと考えられる。

### OCTN1 ノックアウトマウスの作成と体内動態解析

カルニチン/有機カチオントランスポーター・OCTN1 は、当研究室において新規有機カチオントランスポーターとして同定された。OCTN1 は典型的カチオン化合物である TEA や、カチオン性薬物であるピリラミン、キニジン、ベラパミルなどに対して基質輸送能を示し、また、その機能は、シメチジンやプロカイナムド、キニンなどのカチオン性薬物やセファロリジン、レボフロキサシンなどによって阻害を受ける。発現解析の結果、OCTN1 が多様な臓器に広く分布することから、OCTN1 は有機カチオン性薬物の吸収・分布・排泄に寄与する分子であると推測された。特に、OCTN1 が腎尿細管上皮細胞頂側膜側に高発現していること、H<sup>+</sup>および有機カチオンとの交換輸送能を示すことなどから、OCTN1 は、有機カチオンの腎分泌過程に重要とされる H<sup>+</sup>/有機カチオン交換輸送系の分子の実体であると予想された。

OCTN1 に関しては、薬物動態学的役割に加え、生理的役割も明らかとなっていない。遺伝学的統計解析により、OCTN1 の変異がクローン病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患に関与する可能性が報告され、赤血球や単球などの血球細胞に発現することも示されている。以上から、OCTN1 は免疫系で重要な役割を担い、生体の恒常性維持に重要な分子であるとも考えられる。

以上から、詳細は明らかではないものの、OCTN1 には生理的・薬理的重要性が予想され、その役割解明は創薬や疾患の新規治療法の開発に極めて有用であると考えられる。そこで、未だ結論付けられてない OCTN1 の生理的、薬理的役割の解明を目指し、*octn1* 遺伝子ノックアウトマウス (*octn1*<sup>-/-</sup>マウス) を作成し、その表現型解析、有機カチオン性化合物の動態解析及び内因性基質の探索を行った。

OCTN1 が生体恒常性維持への重要性が予測されることから、作成された *octn1*<sup>-/-</sup>マウスの表現型を解析した。外見上に顕著な異常は観察されず、正常に分娩され、発育し、その寿命にも顕著な変化は見出されなかった。これらのこ

とから、mOctn1 欠損は生育過程および発生過程において重大な影響を及ぼさないことが示唆された。さらに、血清成分の生化学的解析の結果、各種機能マーカーに異常な値は見出されなかったことから、通常環境下において、mOctn1 欠損が生体に重大な影響を及ぼさないと考えられた。

続いて、OCTN1 が有機カチオン性化合物を基質して輸送することから、典型的有機カチオン性化合物 TEA の体内動態への影響を検討した。血漿中濃度推移、尿中排泄量、臓器分布に差は観察されなかったことから、TEA の体内動態に関して mOctn1 の寄与は小さいことが示唆された。

トランスポーターには、内因性基質を細胞内外へ輸送し、生体恒常性維持を担い、疾患と密接に関わる分子が知られている。これまでの OCTN ファミリーの基質特異性を考慮すると、その基質は低分子イオン性化合物であると考えられる。そこで、OCTN1 の生理的基質を探索する目的で、capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometer (CE/TOF-MS) による網羅的内因性化合物解析を行った。血漿、血球、尿、腎臓、肝臓、小腸、心臓に関して解析を実施した結果、これら全ての臓器でエルゴチオネインのみが激減していることが明らかとなった。さらに、*octn1*<sup>-/-</sup>マウスのその他の全ての臓器においてもエルゴチオネインの顕著な低下がみられ、Octn1 欠損によりエルゴチオネイン欠乏が引き起こされることが明らかとなった。培養細胞発現系において、マウス Octn1 はエルゴチオネインに対して高親和性を示し、Na<sup>+</sup>依存的輸送能を示したことから、*octn1*<sup>-/-</sup>マウスでは、エルゴチオネイン輸送機能の欠如により、全身的なエルゴチオネインレベルの低下が引き起こされることが考えられた。さらに、エルゴチオネインの経口投与実験において、wild-type マウスでは血漿中濃度がほぼ一定に維持された一方で、*octn1*<sup>-/-</sup>マウスでは2週間で血漿中のエルゴチオネインが検出限界以下となった。このことから、Octn1 がエルゴチオネインの体内維持に重大な役割を担うことが直接明らかとなった。OCTN2 欠損によりマウスやヒトで全身性カルニチン欠乏症が引き起こされるように、OCTN ファミリーは種差が小さく、ヒト OCTN1 でもエルゴチオネインが良好な基質であると示されていることから、ヒトにおいても OCTN1 がエルゴチオネインの維持に関わっていると考えられた。

エルゴチオネイン体内動態解析により、mOctn1 の体内動態への寄与を検討するため、静脈内投与及び経口投与を行った。*octn1*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、尿中排泄の増加、臓器分布の低下、消化管吸収量の低下が観察され、Octn1 が腎臓の再吸収、脳を除く各臓器への移行、消化管吸収に寄与してエルゴチオネインの維持をしていると考えられた。さらに各臓器での寄与を詳細に解析した。腎臓刷子縁膜ベシクルでエルゴチオネインの取り込み低下がみられたことから、腎臓では尿細管から上皮細胞への取り込みに寄与すると考えられた。また、反転

腸管においても取り込み低下が観察され、小腸管腔からの取り込みに寄与していることが示された。エルゴチオネインの移行が大きい肝臓でインテグレーションプロット解析を行ったところ、エルゴチオネイン取り込みの顕著な低下が観察され、Octn1 が類洞膜側の取り込みに寄与していることが示された。これら多くの臓器で Octn1 が寄与していることが示されたことは、その基質となる薬物の輸送にも関わることを予測される。今後、その解明に *octn1* マウスが多大な寄与をすると考えられる。

現在のところ、エルゴチオネインの役割は明らかではなく、今回、エルゴチオネイン欠乏マウスである *octn1* マウスに明らかな表現型が観察されないことから、通常の生育には必須ではない、または少量で十分であると考えられる。エルゴチオネインは広く生物界に分布する化合物である一方、自然界においてその合成を担う生物は限られている。このため、ヒトやマウスを含む高等生物は、エルゴチオネインを食餌より摂取し、この過程をトランスポーターが積極的に担うことを考えると、エルゴチオネインが生体にとって必須の物質であると示唆され、エルゴチオネインが担う未知の生理システムのために OCTN1 が機能していると推察される。これまでのところ、エルゴチオネインが抗酸化作用を持つこと、またエネルギー産生の調節に寄与するとの報告もある。よって、何らかの外因性因子による刺激によりその機能が必要となるかもしれない。今回、エルゴチオネイン欠乏マウスが作成されたことによりその解明に大きな寄与をされると思われる。

## 結論

本研究において、心臓において、カルニチン輸送に OCTN2 が主要な寄与を及ぼすこと、この機能が有機カチオンによって阻害されることが示された。このことは、エネルギーを必要とする心臓においても OCTN2 がカルニチンを輸送することで、心臓機能において生理的に重要な役割を持つと考えられた。また、薬物による阻害を受ける可能性が示されたことから、薬物の副作用と OCTN2 の関連も予想された。一方で、有機カチオンの輸送には OCTN2 の寄与は観察されなかったものの、良好な心臓への移行が観察され、担体介在輸送系の関与も示されたことから、今後、その分子実体の究明が次なる課題となり、この点は心臓への薬物移行を考える上で、有用な情報の取得に繋がるものと期待される。

OCTN1 の内因性基質を生体レベルで明らかとすることに成功し、OCTN1 がエルゴチオネインの体内維持に関わる生理的に重要な役割を有することが明らかとなった。また、OCTN1 と疾病との関連も報告されていることから、今後、診断においてエルゴチオネインが OCTN1 の生体機能パラメーターになると期

待される。また、エルゴチオネインを用いて、OCTN1 の体内動態への寄与が明らかになったことから、今後、OCTN1 の薬物動態へ寄与を詳細に検討していくことが課題と考える。

これらの結果は、トランスポーターの体内動態への寄与を生体レベルで示すことが出来たとして、トランスポーターの生理的、薬理的役割を考える上で、重要な示唆になると考える。

## 学位論文審査結果の要旨

Carnitine/organic cation transporter (OCTN) family は金沢大学辻研究室で見出されたトランスポーターであり、ビタミン類似化合物であるカルニチンや種々の塩基性薬物を運ぶことから、それらの体内動態を司る膜タンパク質であることが示唆されてきた。しかしながらその科学的な根拠の多くは *in vitro* の遺伝子発現系を用いた結果に基づいており、とりわけ OCTN1 については遺伝子変異動物が皆無なことから、その生体内での薬理的役割を証明することができなかった。本研究では、OCTN family に属する二つのトランスポーター OCTN1 および OCTN2 の生体内での役割を *in vivo* で証明することを目的として、以下の知見を得た。(i) *octn2* 遺伝子変異マウスを用い、*Octn2* が心筋細胞に発現し、カルニチンの取り込みに働く一方、同じ *Octn2* の基質である他の塩基性薬物の取り込みへの寄与は低いことを示した。(ii) 遺伝子相同組換えにより *octn1* 遺伝子欠損マウスを作成した。(iii) 作成された欠損マウスを用い、*Octn1* が抗酸化物質であるエルゴチオネインの消化管からの吸収、生体内のほとんどすべての臓器への分布、腎臓における再吸収に主要な役割を果たすことを示した。本研究成果は OCTN トランスポーターの薬理的役割の一端を *in vivo* で解明するとともに、現在、ヒトにおける種々の疾患や一部薬物の腎排泄に重要な役割を果たすと考えられつつある OCTN1 の基礎研究における有用なツールとなる遺伝子欠損マウスを提供したものであると評価され、博士(薬学)に値すると判定した。