

氏名	藪内 光
生年月日	
本籍	香川県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第268号
学位授与の日付	平成10年9月30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	Molecular and functional characterization of membrane transporters responsible for absorption and excretion of organic ionic drugs (有機イオン性薬物の吸収・排泄型トランスポーター群の分子生物学的機能解析)
論文審査委員	(主査) 辻 彰 (副査) 大熊 勝治, 横井 毅, 玉井 郁巳, 山下 克美

## 学位論文要旨

Membrane transporters often play a crucial role in intestinal absorption, tissue distribution, elimination and reabsorption of drugs as well as physiologically important nutrients and endogenous compounds in many tissues. The purpose of this study was to identify the pharmacokinetically important drug transporters in intestine, liver and kidney by molecular cloning of the cDNAs encoding these transporters and functionally characterizing using *in vitro* gene expression system. Inorganic anion exchanger AE2, which has been already reported to be present at several tissue cell membranes, including intestinal brush-border membrane is functionally involved in the organic monocarboxylic acid transport. Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter Npt1 protein, which is present at renal epithelial brush-border and hepatic sinusoidal membranes, functions as a transporter of anionic compounds such as β-lactam antibiotics and *p*-aminohippurate. Novel organic cation transporter OCTN1, which is present in kidney and several other tissues, was successfully cloned and functions as organic cation/H<sup>+</sup> antiporter that may play a role in the renal epithelial brush-border membrane. These three transporters have broad substrate specificity. In conclusion, present results provide the idea that organic ion transporters (AE2, Npt1 and OCTN1) are responsible for the absorption and/or elimination of organic compounds in small intestine, liver and/or kidney.

薬物が投与部位から体循環系へ吸収され、各組織へ分布後、最終的に排泄されるまでには、各臓器における細胞膜透過過程が含まれ、この膜透過過程が特に水溶性のイオン性薬物の体内動態の律速となりうる。これら細胞膜透過の制御因子として、細胞膜輸送担体(ト

ランスポーター)が重要である。本来はアミノ酸、糖などの栄養物および代謝産物などの内因性物質輸送に働くトランスポーターが、生体異物である薬物を誤認識し輸送する現象については、最近徐々にその実体が明らかにされつつある。また、P 糖蛋白をコードするMDR や MRP のように生体防御・異物排泄に関わるトランスポーターの存在も明らかにされつつある。これら生体内に広く分布するトランスポーター群の分子レベルでの同定は、薬物の体内動態の理解のみならず、*in vitro* アッセイ系による薬物輸送および薬物間相互作用の予測、さらには標的臓器へ特異的な移行性を有した理想的な体内動態を示す薬物の開発に重要な知見を与える。

そこで本研究では、薬物吸収の第一段階である小腸および薬物排出の最終関門である腎・肝臓に着目し、有機アニオンあるいは有機カチオン性化合物の輸送に関わるトランスポーター群の遺伝子クローニング、組織分布および輸送機能の解析を行うことにより、トランスポーターの生体内における薬物輸送への関与について考察を試みた。

#### 1. アニオン交換輸送体 AE2 を介した小腸におけるモノカルボン酸輸送活性

当研究室では、小腸刷子縁膜小胞および Caco-2 細胞を用いたモノカルボン酸系薬物の輸送研究成果により、小腸上皮細胞において、pH 分配仮説に基づいた受動拡散以外に、少なくとも2種類のモノカルボン酸能動担体輸送系が存在する事を示唆してきた。1つはモノカルボン酸/プロトン共輸送系であり、当研究室において、本輸送の一部を担うと推定されるラット小腸 MCT1 のクローニングに成功している。しかし、モノカルボン酸/アニオン交換輸送体については、現在までのところ分子の実体は同定されていなかった。

本研究では、生体内に広く分布し、小腸においてもその発現が確認されている  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換輸送担体 AE2 タンパク質に着目し、AE2 クローンを利用した培養細胞遺伝子発現系を用いて、AE2 による輸送特性が明らかとされていないモノカルボン酸輸送の可能性について検討を行った。HEK293 細胞にリン酸カルシウム沈殿法により DNA トランスフェクションを行い、マウス腎臓由来 AE2 クローンを発現させ、輸送実験に用いた。AE2 を発現させた HEK293 細胞を用いて、 $^{36}\text{Cl}^-$  および  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  輸送の検討を行った結果、対照群と比較して、AE2 発現系における有意な輸送活性の上昇が確認された。この系を用いて、モノカルボン酸輸送を検討した結果、 $[^{14}\text{C}]$ benzoic acid,  $[^{14}\text{C}]$ propionic acid,  $[^{14}\text{C}]$ nicotinic acid,  $[^{14}\text{C}]$ valproic acid において有意な取り込み上昇が観察された。また AE2 発現系における  $[^{14}\text{C}]$ benzoic acid の取り込みは、 $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  および AE2 の阻害剤である DIDS により、著しく阻害されることが分かった。

以上の結果より、モノカルボン酸輸送における AE2 の関与が初めて明らかになった。

## 2. アニオントランスポーター Npt1 の組織内局在性と薬物の腎・肝移行および排泄

当研究室では、これまでに遊離肝細胞あるいは腎近位尿細管上皮細胞刷子縁膜小胞などを用いた  $\beta$ -ラクタム抗生物質の肝・腎移行研究成果から、肝実質細胞の血管側膜上および腎近位尿細管の管腔側における担体輸送系の関与を示唆してきた。本輸送系は、 $\beta$ -ラクタム抗生物質などのアニオン性薬物の肝・腎排泄機構を理解する上で重要であるが、未だその実体は明らかではなかった。

本研究は、最近、有機アニオン輸送活性を有することが確認された腎臓型 Type I リン酸トランスポーター、ウサギ NaPi-1 に着目し、そのホモログであるマウス Npt1 およびヒト NPT1 を腎臓よりクローニングし、肝臓および腎臓における組織分布および遺伝子発現系を用いた  $\beta$ -ラクタム抗生物質を始めとする有機アニオン性化合物の輸送特性を検討した。

抗 Npt1 抗体を作成し、マウス腎および肝切片を用いて免疫組織染色を行った結果、腎近位尿細管管腔側および肝側底膜上において、Npt1 の特異的発現が確認された。

Npt1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、 $^{36}\text{Cl}^-$  および  $\text{H}^{32}\text{PO}_4^{2-}$  輸送の検討を行った結果、対照群と比較して、Npt1 発現系における輸送活性の有意な上昇が確認された。この系を用いて、 $^{14}\text{C}$ benzylpenicillin (PCG) 輸送を検討した結果、その取り込みは飽和性を示し、 $K_m$ : 0.46 (mM) が得られ、遊離肝細胞で得られた  $K_m$  値と良く一致した。Npt1 による  $^{14}\text{C}$ PCG 輸送は、細胞外緩衝液中の  $\text{Cl}^-$  により阻害を受け、その  $\text{IC}_{50}$  値は約 25mM であった。

また Npt1 による  $^{14}\text{C}$ PCG 輸送活性は他の  $\beta$ -ラクタム抗生物質および probenecid など有機アニオン性化合物により有意に阻害を受けた。Npt1 による種々の有機アニオン性化合物の輸送を検討した結果、 $^{14}\text{C}$ faropenem,  $^{14}\text{C}$ foscarnet,  $^{14}\text{C}$ mevalonate および代表的な有機アニオンのモデル化合物である  $p$ - $^{14}\text{C}$ aminohippurate (PAH) において有意な取り込み上昇が観測された。さらに、HEK293 細胞におけるヒト NPT1 の発現系により、ヒト NPT1 の PAH 輸送活性を初めて明らかにすることに成功した。

従って、Type I リン酸トランスポーターは、肝臓および腎臓において PAH のみならず  $\beta$ -ラクタム抗生物質など広く有機アニオン性薬物の輸送に関与することが示唆された。

## 3. 新規ヒト $\text{H}^+$ 駆動型有機カチオントランスポーター OCTN1 の遺伝子クローニングと組織分布・活性解析

多くの有機カチオン性薬物は、腎近位尿細管において特異的な担体輸送系により排泄される。これまでに有機カチオン性薬物の尿細管分泌機構としては、近位尿細管上皮細胞における側基底膜側の膜電位依存的輸送系および刷子縁膜側の有機カチオン/ $\text{H}^+$  交換輸送系

が知られている。近年、膜電位依存性の有機カチオン性薬物トランスポーターとして、OCT1 および OCT2 がクローニングされ、側基底膜側の膜電位依存的輸送系の実体と推測されているが、刷子縁膜側の有機カチオン/H<sup>+</sup>交換輸送系の実体は明らかではなかった。本研究では、ヒト cDNA ライブラリーより新規有機カチオントランスポーターOCTN1 のクローニングに成功し、その腎近位尿細管に存在する有機カチオン/H<sup>+</sup>交換輸送系との機能的相関について検討した。

OCTN1 はヒト胎児肝臓由来 cDNA ライブラリーよりクローニングを行い、Northern blot 法により生体内組織分布の解析を行った。OCTN1 は、その遺伝子配列より、アミノ酸 551 残基、11 回膜貫通型の膜タンパク質と推定され、ATP binding site sequence motif を 1 ヶ所保持している点が特徴的であった。OCTN1 のアミノ酸配列における相同性は、腎近位尿細管において既に発現が確認されている有機カチオン輸送体、ラット OCT1、ラット OCT2、ヒト OCT1 およびヒト OCT2 と比較して、それぞれ 32%、33%、31%および 33%であった。また、Northern blot 解析の結果より、OCTN1 はヒト成人腎、気管、骨髄など広い生体内分布を示し、さらに HeLa 細胞および K562 細胞など複数の腫瘍細胞においても OCTN1 の検出が観察された。

次にアフリカツメガエル卵母細胞および HEK293 細胞を用いた遺伝子発現系において、OCTN1 の有機カチオン性化合物の輸送活性を検討した。有機カチオン性物質のモデル化合物としては、tetraethylammonium (TEA)を用いた。OCTN1 の [<sup>14</sup>C]TEA 輸送活性を測定した結果、両発現系において [<sup>14</sup>C]TEA の取り込みは飽和性を示し、HEK293 細胞では Km: 0.436 (mM)、アフリカツメガエル卵母細胞では Km: 0.195 (mM)が得られ、これらの値は過去に報告されている腎近位尿細管刷子縁膜の有機カチオン/H<sup>+</sup>交換輸送系で得られている Km 値と非常に近い値であった。OCTN1 による [<sup>14</sup>C]TEA 取り込みの pH 依存性を検討した結果、両発現系において、酸性 pH 領域と比較して塩基性 pH 領域において有意な取り込み上昇が観察された。また、OCTN1 発現卵母細胞では [<sup>14</sup>C]TEA 取り込みに膜電位依存性は検出されず、OCTN1 発現 HEK293 細胞からの [<sup>14</sup>C]TEA 排出は、細胞外緩衝液の塩基性 pH 領域と比較して酸性 pH 領域の場合に活性化された。このため、OCTN1 の [<sup>14</sup>C]TEA 輸送の駆動力は H<sup>+</sup>との逆輸送であることが強く示唆された。さらに、OCTN1 発現 HEK293 細胞における [<sup>14</sup>C]TEA 取り込みは、ATP 涸渇時において有意な取り込みの減少が確認されたため、OCTN1 の TEA 輸送機構における ATP 依存性の関与が示唆された。

また、OCTN1 による基質認識性を明らかにするため、複数の薬物により OCTN1 発現 HEK293 細胞における TEA の取り込み阻害実験を行った結果、cimetidine, procainamide など複数の有機カチオン性化合物により有意な阻害傾向が観察されたが、PCG, PAH など有

機アニオン性化合物では阻害が観察されなかった。さらに OCTN1 発現卵母細胞を用いて、有機カチオン性化合物の輸送を検討した結果、 $[^3\text{H}]$ quinidine,  $[^3\text{H}]$ pyrilamine,  $[^3\text{H}]$ verapamil において有意な取り込み上昇が観察された。

以上の結果より、新規クローニングに成功した OCTN1 は有機カチオン性化合物に対して広い基質認識多様性を持つ有機カチオン/ $\text{H}^+$ 交換輸送体であることが明らかになった。現時点で OCTN1 の腎近位尿細管における詳細な組織分布を明らかにできなかったが、OCTN1 が腎近位尿細管上皮細胞刷子縁膜側に存在し、薬物排出に重要な役割を担うと推測される有機カチオン/ $\text{H}^+$ 交換輸送体の実体である可能性が高いと考えられる。

## 結論

本研究は、これまで分子レベルでの実体が明らかではなかった小腸吸収および腎・肝排泄に関わる有機イオン性化合物の担体輸送系の一部を、遺伝子レベルでの機能解析により明らかにすることに成功した。新規有機カチオントランスポーターOCTN1 のクローニングの成功と、腎臓を始めとする広い生体内組織分布および多様な基質認識特性の解明は、OCTN1 が有機カチオン性化合物の生体内組織分布を理解する上で重要な知見を与えるものと思われる。Npt1 の肝臓・腎臓における組織分布および $\beta$ -ラクタム抗生物質の輸送活性は、Npt1 が $\beta$ -ラクタム抗生物質の肝・腎指向性を決定づける重要な因子となる可能性を示している。また OCTN1 と Npt1 はともに、これまで実体が不明であった薬物排出の最終関門である腎近位尿細管上皮細胞管腔側に存在する有機カチオン (TEA など) あるいは有機アニオン (PAH など) の排出システムに関与する可能性のあるトランスポーターとして、初めての知見を与えるものであった。

さらに無機アニオントランスポーターとして知られていた AE2 および Npt1 の有機アニオン輸送活性が検出できたことから、既知のトランスポーターであっても、生体内において従来知られていなかった薬物輸送に寄与する可能性を示した点で、本研究成果は今後の薬物輸送担体の同定に新しい方法論を提示するものであると考える。

## 学位論文審査結果の要旨

当該論文に対する個別審査後、平成10年8月7日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

薬物の吸収、分布、排泄に関わる組織細胞膜透過にトランスポーターが介在することが、組織灌流系、単離または培養細胞系、膜小胞系を用いた実験により提唱されてきたが、それらに介在するトランスポーターの実体を分子レベルで明らかにした例は多くない。

本研究では、有機アニオンおよび有機カチオン系薬物の細胞膜輸送に関与するトランスポーター遺伝子を特定する研究に着手し、以下に列挙する新しい知見を得た。

- ① マウスアニオン交換トランスポーター AE 2 が小腸上皮細胞において benzoate などの有機モノカルボン酸系薬物を  $\text{HCO}_3^-$  と交換して輸送することを初めて明らかにした。
- ② マウスおよびヒトアニオントランスポーター Npt 1 が benzylpenicilin のみならず p-aminohippurate をも輸送することを初めて明らかにした。また、この Npt 1 が肝臓、腎臓において有機アニオン系薬物の細胞からの排出輸送に関わっている機構を提唱した。
- ③ 有機カチオン系薬物を輸送するヒト新規トランスポーター OCTN 1 をクローニングすることに成功した。この OCTN 1 が腎尿細管において有機カチオン  $\text{H}^+$  交換トランスポーターとして機能することを初めて明らかにした。

以上の研究成果は、薬物の吸収、分布、排泄に関わる体内動態を制御する上で重要な知見を与えるものであり、博士(薬学)論文に値すると認める。