

小腸有機アニオン輸送体OATP2B1に及ぼす食品作用の多様性

著者	藤田 大地
著者別表示	Fijita Daichi
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第4990号
学位名	博士（創薬科学）
学位授与年月日	2019-09-26
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059288

doi: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00921>



博士論文

小腸有機アニオン輸送体 OATP2B1 に及ぼす食品作用の多様性

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬物動態学研究室

学 籍 番 号 1629012015

氏 名 藤田 大地

主任指導教員名 玉井 郁巳 教授

目次

略語表.....	1
第一章 序論.....	3
第二章 アミノ酸残基に着目した OATP2B1 における Multiple Binding Sites の実証. 10	
第一節 緒言.....	10
第二節 実験方法.....	14
2-2-1 試薬.....	14
2-2-2 実験動物.....	14
2-2-3 OATP2B1 ヒスチジン及びアルギニン変異体発現プラスミド DNA の作製	14
2-2-4 OATP2B1 cRNA 合成.....	16
2-2-5 Oocyte の調製及び cRNA の注入.....	16
2-2-7 Oocyte を用いた [³ H] E ₁ 3S 及び [³ H] PGE ₂ の取り込み試験.....	17
2-2-8 Oocyte を用いた fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine の取り込み試験.....	18
2-2-9 LC-MS/MS 定量条件.....	18
2-2-10 データ解析.....	21
2-2-11 OATP2B1 の二次構造予測.....	22
2-2-12 OATP2B1 の立体構造予測.....	22
第三節 実験結果.....	23
2-3-1 OATP2B1 を介した E ₁ 3S 輸送の濃度依存性試験.....	23
2-3-2 ヒスチジン残基及びアルギニン残基が E ₁ 3S high affinity site 及び E ₁ 3S low affinity site に与える影響.....	25
2-3-3 H579Q-、H618Q-及び H579Q/H618Q-OATP2B1 を用いた E ₁ 3S 輸送の濃度依存性試験.....	27
2-3-4 H579Q-及び H618Q-OATP2B1 の E ₁ 3S 輸送活性に対する naringin 及び progesterone の影響.....	30
2-3-5 OATP2B1 を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、PGE ₂ 輸送に対する naringin の影響.....	31

2-3-6	OATP2B1 を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、PGE ₂ 輸送に対する progesterone の影響	33
2-3-7	H579Q-、H618Q-、R607A-OATP2B1 各 OATP2B1 変異体を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、および PGE ₂ 輸送	34
2-3-8	OATP2B1 の輸送活性部位予測	36
第四節	考察	38
第三章	トランスポーター遺伝子発現に与える食品ナノ粒子の影響	41
第一節	緒言	41
第二節	実験方法	43
3-2-1	試薬	43
3-2-2	りんご由来ナノ粒子画分の調製	43
3-2-3	NP の粒子径測定	43
3-2-4	電子顕微鏡による APNP 画分中の APNP の観察	43
3-2-5	NP の熱・超音波処理.....	43
3-2-6	APNP 画分中の脂質膜及び核酸の染色	44
3-2-7	細胞培養.....	44
3-2-8	qRT-PCR	45
3-2-9	SDS-PAGE と Western Blotting Analysis	46
3-2-10	Caco-2 細胞への E ₁ S 取り込み試験	47
3-2-11	データ解析.....	48
第三節	実験結果	49
3-3-1	APNP 画分中に含まれるナノ粒子の粒子径・形状.....	49
3-3-2	Caco-2 細胞への APNP の取り込み	51
3-3-3	Caco-2 細胞における輸送体遺伝子の発現に対する APNP の影響	53
3-3-4	OATP2B1 mRNA 発現に対する APNP の影響.....	54
3-3-5	OATP2B1 のタンパク質発現量及び輸送活性に対する APNP の影響	55
3-3-6	APNP 画分中に存在する低分子の影響	56
3-3-7	低 pH における APNP の安定性	57
第四節	考察	59

第四章	Apple マイクロ RNA による OATP2B1 の遺伝子発現調節作用.....	63
第一節	緒言.....	63
第二節	実験方法.....	65
4-2-1	pRL-TK/OATP2B1 の作製.....	65
4-2-2	細胞培養.....	65
4-2-3	Deletion Assay.....	66
4-2-4	qRT-PCR.....	66
4-2-5	RNAhybrid を用いたバイオインフォマティクス解析.....	68
4-2-6	pGL3-p/OATP2B1-3'UTR の作製.....	68
4-2-7	HEK293 細胞への pGL3-p/OATP2B1-3'UTR、miRNA inhibitor の導入.....	70
4-2-8	Caco-2 細胞への miRNA mimic の導入.....	71
第三節	実験結果.....	72
4-3-1	Apple miRNA の Caco-2 細胞への取り込み.....	72
4-3-2	qRT-PCR 法による AP 由来 NP 画分の OATP2B1 mRNA に対する作用部位探索.....	73
4-3-3	qRT-PCR による AP 由来 NP 画分の OATP2B1 mRNA に対する作用部位探索.....	74
4-3-4	OATP2B1 3'UTR に及ぼす APNP の作用.....	75
4-3-5	OATP2B1 3'UTR への APNP の経時的作用.....	76
4-3-6	OATP2B1 3'UTR に作用する miRNA の予測.....	77
4-3-7	APNP 画分中の候補 miRNA の検出.....	78
4-3-8	APNP 画分中の候補 miRNA の検出.....	79
4-3-9	APNP による OAPT2B1 発現低下に対する miRNA inhibitor の抑制作用....	79
4-3-10	候補 miRNA mimic による OATP2B1 発現低下作用.....	80
4-3-11	Ago2 複合体を形成する候補 miRNA の検出.....	81
第四節	考察.....	83
引用文献	89
参考論文	98

副論文..... 98

謝辭..... 99

略語表

3'UTR: 3' untranslated region

ABC: ATP binding cassette

ABC: ATP binding cassette

Ago2: Argonaute 2

AIC: Akaike's information criterion

AJ: Apple juice

APNP: Apple-derived nanoparticle

AUC: Area under the plasma curve

BCRP: Breast cancer resistance protein

BSP: Bromosulphophthalein

cRNA: Complementary RNA

CYP: Cytochrome P450

DEPC: Diethylpyrocarbonate

DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate

DNA: Deoxyribonucleic acid

E₁3S: Estrone-3-sulfate

FBS: Fetal bovine serum

FJ: Fruit juice

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GFJ: Grapefruit juice

HEN1: Hua enhancer 1

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMG-CoA: Hydroxymethylglutaryl-CoA

HPLC: High performance liquid chromatography

HRPT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

K_m: Michaelis Menten constant

MBI: Mechanism-based inhibition

MBS: Modified Barth's solution

MBS: Multiple Binding Sites

MDR: Multidrug resistance

MES: 2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate

miRNA: microRNA
mRNA: Messenger RNA
NP: Nanoparticle
OATP: Organic anion transporting polypeptide
OJ: Orange juice
PBS: Phosphate buffered saline
P-gp: P-glycoprotein
PCR: Polymerase chain reaction
PEPT: Oligopeptide transporter
PGE₂: Prostaglandin E₂
qRT-PCR: Quantitative RT-PCR
RISC: RNA-induced silencing complex
RNA: Ribonucleic acid
S.D.: Standard deviation
S.E.M.: Standard error of mean
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SLC: Solute carrier
SNP: Single nucleotide polymorphism
TRBP: tar-RNA-binding protein
V_{max}: Maximum velocity

第一章 序論

栄養素としての作用のほかに食品には多様な生理機能を期待した適用がうたわれているが、作用機構については科学的根拠が明確でなく、経験的な場合が多い。また、医薬品と併用される場合も多いと想定されるが、相互作用についての情報も乏しい。食品による作用は全身に及ぶが、中でも食品成分が高濃度に曝露される消化管は、その作用が大きいと考えられる。小腸の上皮層を構成する上皮細胞は栄養物や経口薬の吸収ならびに内因性化合物の再吸収を担う。そのため、食事成分によって小腸上皮細胞の機能が制御される可能性は十分に考えられ、食品が小腸上皮細胞の機能調節に及ぼす影響は大きいと考えられる。

栄養物や薬物に関わらず、消化管吸収において小腸上皮細胞の透過経路として、細胞間を通過する細胞間隙輸送、単純拡散や輸送体を介した経細胞輸送、あるいは膜動輸送に分類される。輸送体は基質選択的に化合物の膜透過を担う膜タンパク質である。輸送体は大きく二種類に分類されており、一つは ATP の加水分解のエネルギーを利用して異物を細胞外に排出する一次性能動輸送型の ATP binding cassette (ABC) 輸送体であり、もう一つは促進拡散型あるいは二次性能動輸送型である solute carrier (SLC) 輸送体である。上述のように消化管内には高濃度の食品成分が存在するため、消化管上皮細胞の輸送体に直接作用して、それらの活性変動を引き起す可能性を考慮する必要がある。消化管組織での薬物と飲食物との相互作用については、フルーツジュース (fruit juice: FJ) 及びその成分に起因した相互作用が問題視されている [1, 2]。中でもグレープフルーツジュース (grapefruit juice: GFJ) は多くの薬物の体内動態を変動させることが報告されており [3]、消化管組織に発現する薬物代謝酵素 CYP3A4 に対する阻害作用を有することも考慮すると、その影響は大きい。FJ が上記の排泄型輸送体を阻害する場合、基質薬物の吸収性の増大に伴う生物学的利用能 (bioavailability: BA) の増加を引き起こす。また、このような輸送体上で生じる薬物-FJ 間相互作用には種差が生じ、その影響予測を困難にすることも知られている。例えば P-gp 基質として知られる β 受容体遮断薬 talinolol は GFJ との併用時にはラットでは血漿中濃度の上昇、ヒトでは低下するという種差がある [4, 5]。この相互作用の種差に対しては、GFJ 中の阻害成分 naringin の P-gp に対する阻害活性に種差があり、予測される消化管管腔の GFJ 中濃度ではヒト P-gp を阻害しないことで説明されている [6]。一方、ヒトで吸収が低下する一因には吸収型輸送体の関与が考えられ、当研究室では、このような吸収に働く輸送体に着目した研究を進めている。以上の事例はいずれも消化管輸送体に対して作用部位である管腔中

の阻害成分濃度と輸送体に対する阻害強度(IC₅₀)を基に、臨床における相互作用の可能性を考察している。それは、FJ 及びその成分が標的輸送体に対して競合的阻害により作用していると想定しているためである。

以上の作用の他に、当研究室では、小腸上皮細胞刷子縁膜に発現が見られ、小腸管腔内から上皮細胞内への基質の取り込みに寄与する OATP2B1 に対する食品作用について研究を行ってきた。現在までに内因性化合物として E₁3S や DHEAS、薬物としては HMG-CoA 還元酵素阻害薬や抗ヒスタミン薬などが基質として報告されている[7]。これまで、OATP2B1 発現アフリカツメガエル卵母細胞(*Xenopus oocyte*)を用いた検討で、FJ あるいは FJ 中の成分が OATP2B1 の輸送活性を低下させることを示しており、阻害作用の機序として競合的な同時阻害に加え、持続的阻害作用の存在を示唆している。すなわち、FJ を OATP2B1 発現 *oocyte* に一定時間曝露した場合、その後 FJ を除去しても OATP2B1 活性の低下が持続することを見出している[8]。このような持続的活性低下は GFJ では観察されず、アップルジュース(AJ)やオレンジジュース(OJ)に特異的であることから、同時阻害とは異なる機構を有していると考えられる。この持続的な活性低下が *in vivo* でも生じる場合、FJ または FJ 中作用成分が消化管管腔中で存在しない場合においても、OATP2B1 を介した薬物吸収が低下し続ける可能性が考えられる。このように、阻害薬の輸送体に対する阻害機構が多岐に渡る場合、阻害薬の作用部位における濃度と作用の程度を関連付ける上で、その作用機構を詳細に解明することが重要である。また当研究室においても *in vitro* 試験および *in vivo* 試験により、OATP2B1 の c.1457C>T の変異 (OATP2B1*3/*SLCO2B1*c.1457C>T)によって fexofenadine の血中濃度が低下したことを示すとともに、AJ の併用によっても同様の血中濃度低下が観察されたことを報告している[9, 10]。しかし、OATP2B1 上で薬物-FJ 間相互作用が生じる場合には FJ によって基質薬物の吸収は一様に低下することが予想されるが、実際には相互作用の程度は薬物により大きく異なる[11]。その例として、臨床投与量では FJ により fexofenadine では AUC が低下する一方で、pravastatin では AUC が変化しない。この原因として、OATP2B1 に対する基質輸送のキネティック解析から、FJ 感受性の異なる複数の基質結合部位 (Multiple Binding Sites: MBS) の存在が提唱されている (Figure 1-1)[12]。そのため、OATP2B1 は基質及びその濃度の違いによって阻害薬の作用が異なるため、食品作用に多様性が生じる可能性がある。

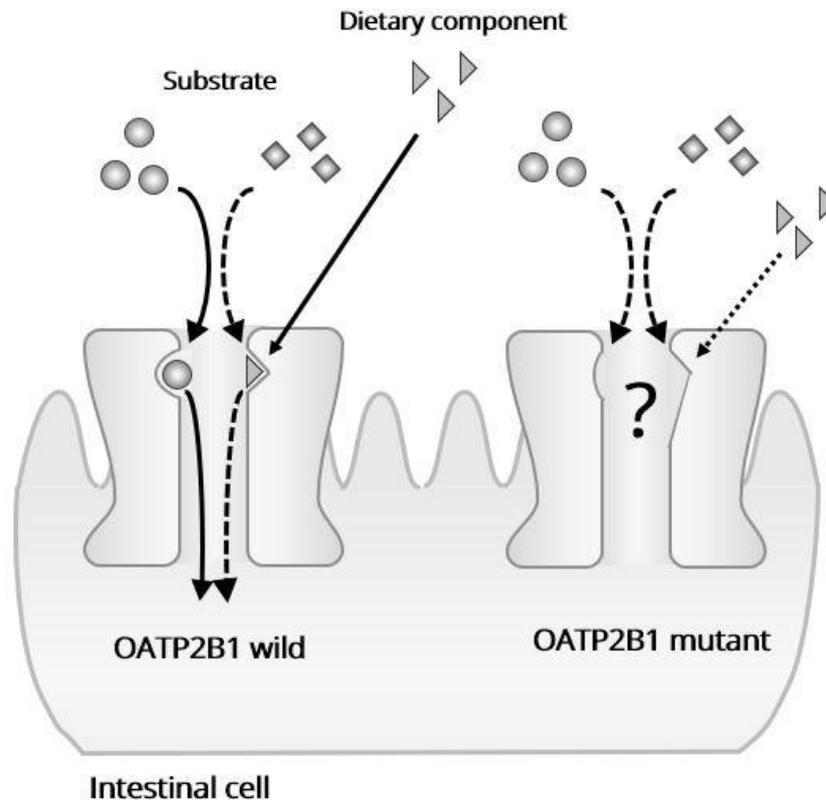


Figure 1-1 Possible model of multiple binding site on OATP2B1.

また、OATP2B1 は HMG-CoA 還元酵素阻害剤や talinlolol 等の β 受容体遮断薬、fexofenadine のような H_1 -拮抗薬等、多様な薬物を基質として認識する[13]。そのため、前述した複数基質結合部位のような輸送体特性の解析は、食品作用の機序解明だけではなく、薬物動態因子としての考察にもつながる。薬物動態の変動をもたらす薬物間相互作用並びに薬物-食品間相互作用は、医薬品の適正使用に関して避けるべき因子であるが、輸送体上の相互作用による薬物動態の変動を利用することで、生体にとって有益な現象として捉えられるのではないかと考えた。そのため、これまで当研究室では、食品による小腸輸送体調節の有用性について研究してきた。その一例として、SN-38 の消化管組織内移行に参与する OATP2B1 を AJ で阻害することによって、SN-38 誘発性消化管障害の緩和される可能性が示している[14]。SN-38 は抗がん薬イリノテカン塩酸塩 (CPT-11) の活性代謝物であり、消化管障害である遅発性の下痢と骨髄抑制は用量規制因子に定められているほど副作用が問題となっている[15, 16]。消化管障害は、SN-38

が肝臓内でグルクロン酸抱合を受けた後、胆汁中排泄によって消化管管腔内に移行し、腸内細菌由来の β -glucuronidase によって脱抱合を受けた SN-38 が消化管粘膜を傷害することで発症すると考えられている。SN-38 の消化管障害の防止策として、腸内殺菌を目的とした抗菌薬の使用や、脱抱合阻害を目的とした漢方薬 半夏瀉心湯が使用されてきた[17, 18]。抗がん剤の副作用防止のためのさらなる薬物投与は患者の QOL 低下を招くため、食品がこれら医薬品と同様に抗がん剤の副作用回避に寄与するならば、不要な医薬品使用を抑制できる可能性がある。そのため、薬物-食品間相互作用の回避のみならず、抗がん剤の副作用回避のように有益な手段となりうることから、消化管組織に対する食品作用機序の解明は、現実的な有用性を備えていると考えられる。

以上、小腸輸送体に及ぼす食品作用について述べたが、これらはいずれも競合阻害を想定している。競合阻害以外の機序としては、St. John's wort 中に含まれる hyperforin による P-gp の発現誘導が報告されているが[19]、いずれも食品中に含まれる低分子成分が原因成分であり、食品作用の新たな原因成分や作用機序の探索には至っていない。食品中には低分子に加えて、タンパク質や核酸等の高分子も含まれているが、消化管管腔内 pH 条件や消化酵素等による安定性の問題点や、高分子量による低膜透過性のため高分子成分の直接的な作用は考慮されていない。これに対し近年、低分子や高分子を内包するナノ粒子 (NP) が果物や野菜中に存在することが報告されている[20, 21]。NP は脂質膜で構成されたベシクル様構造であり、動物に経口投与したのち食品由来 NP が消化管機能に影響することが報告されている[20]。食品由来 NP は、エクソソームと同様に内容物のキャリアとして機能すると考えられており、内容物の組織移行に関与する可能性がある。また、消化管管腔内環境から内容物が保護されているため、安定性の向上も見込まれる。以上より、食品由来 NP に着目することで、既知の低分子成分による競合阻害とは異なる、全く新しい作用機序の解明につながると期待される。さらに、植物由来 NP の報告もあることから、ヒト消化管機能に及ぼす植物由来高分子成分による異種間相互作用の可能性は興味深く、小腸輸送体に対する食品作用の新たな概念を提唱できるものと期待できる (Figure 1-2)。

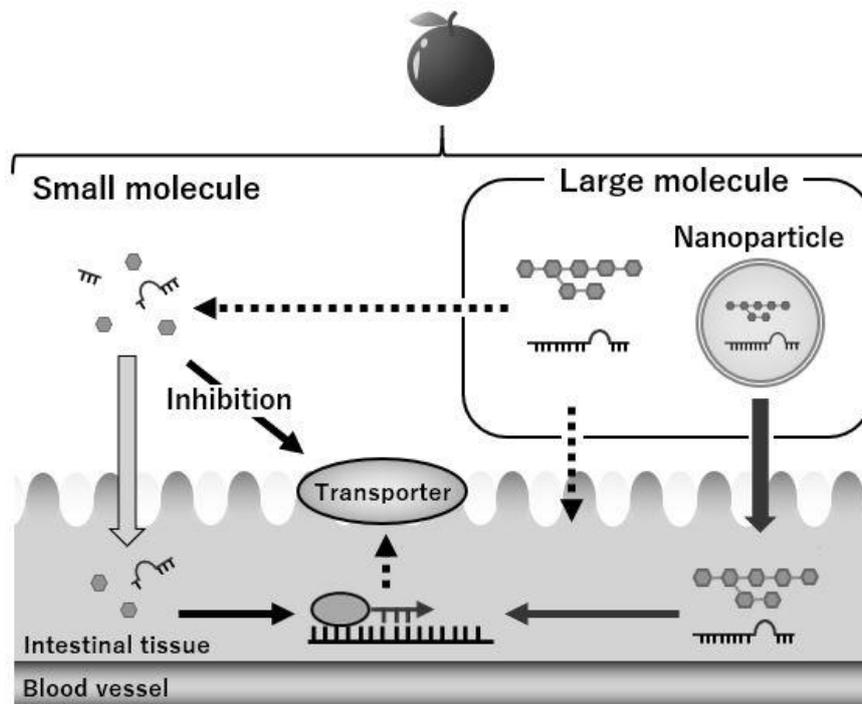


Figure 1-2 Possible mechanism of food effect for intestinal transporter.

本研究では、小腸機能に及ぼす食品作用の発現機序の解明を目指し、OATP2B1 に対する食品作用の発現要因を解明することを目的として、OATP2B1 の機能評価を行った。第二章では、食品作用の感受性を左右する、輸送体の特徴を明らかにするため、OATP2B1 構造上に MBS が存在するかを検証するため、OATP2B1 を形成するアミノ酸が輸送活性に及ぼす影響を評価した。基質結合部位に関与しうるアミノ酸残基に着目し、OATP2B1 のアミノ酸変異体を用いて、OATP2B1 基質の輸送活性のキネティック解析や阻害薬感受性の評価によって、各基質の基質結合部位について考察した。本章の結果より、E₁3S に対して low affinity site 及び high affinity site の異なる基質結合部位が存在し、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の結合部位は E₁3S affinity site と近い結果を示したことから、同じ結合部位を介して輸送されている可能性がある一方で、fexofenadine 及び PGE₂ の結合部位は E₁3S とはことなる結合部位であると推測された。したがって、OATP2B1 上の複数基質結合部位の存在が食品作用の発現に関与する因子であることが明らかとなった。第二章で使用した阻害剤はいずれも低分子成分であり、これまでも輸送体に及ぼす食品作用は競合阻害や発現量の変動によって評価されているが、食品中の低分子成分でのみ説明されてきた。したがって、第三章では新規原因成

分の探索を目的に、高分子を内包する食品由来 NP が輸送体の機能を調節するかを検証した。りんごから回収した APNP 画分が、Caco-2 細胞に発現する輸送体の mRNA 発現量の低下を示した。さらに、OATP2B1 に対しては、タンパク質発現量及び E₁3S 取り込み量の減少から、機能調節にまで作用しうることを見出した。第三章の結果が、APNP を介した内容物である高分子成分が原因となっていると考え、第四章では、原因成分の同定と作用機序の解明を目的とした。APNP が OATP2B1 3'UTR を介して発現低下を示すことから、microRNA(miRNA)を原因成分と推測し OATP2B1 の発現制御に関与する apple miRNA の同定を目指した。その結果、特定の apple miRNA が OATP2B1 の発現制御に関与することが示され、APNP を介した apple miRNA が輸送体の発現調節に寄与している可能性が示された。

本研究より、OATP2B1 上に MBS の存在が示され、輸送体の結合部位が食品作用の感受性に関与する因子となることから、食品作用の発現を左右する因子である可能性が新たに見出された。また、輸送体に対する食品作用の新規作用成分として、食品由来 NP を介した miRNA の関与が明らかとなった。これは、植物由来高分子がヒト遺伝子発現制御に関与する異種間相互作用の存在を支持する結果であり、食品作用機序に新たな概念を提示する結果である。今後、輸送体に限らず消化管組織に及ぼす食品作用の評価や、NP に含まれる miRNA 以外の高分子成分の探索によって、科学的根拠に基づいた食品による疾患予防や健康増進に応用されることが期待される。

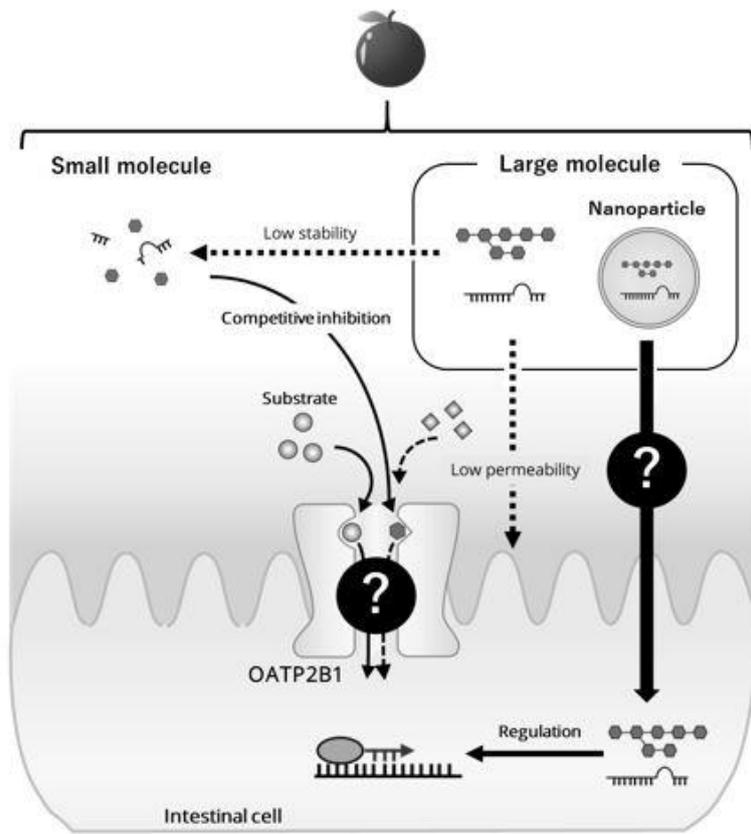


Figure 1-3 Possible mechanism for diversity of food effect.

第二章 アミノ酸残基に着目した OATP2B1 における Multiple Binding Sites の実証

第一節 緒言

OATP2B1 は消化管上皮細胞刷子縁膜に発現する輸送体であり、基質を消化管管腔から細胞内への取り込みに寄与すると考えられている。しかし、ヒト空腸組織や Caco-2 細胞タンパク質発現局在や OATP2B1 基質の透過試験の結果から、OATP2B1 の発現局在は基底膜側であると主張する報告もあり[22]、薬物の消化管吸収や薬物-FJ 相互作用における OATP2B1 の寄与について懐疑的な見方もある。現在までに内因性化合物として E₁S や DHEAS、薬物としては HMG-CoA 還元酵素阻害薬や抗ヒスタミン薬などが基質として報告されている[7]。OATP2B1 の SNP を利用した *in vitro* 試験および臨床試験から、OATP2B1 の薬物の消化管吸収への関与が示唆されている。当研究室では、*in vitro* 試験における OATP2B1*3 の変異による OATP2B1 の活性低下 [9]、さらには、臨床試験における OATP2B1 の基質薬物 fexofenadine の AUC が AJ 併用下で顕著に低下したことを示しており [10]、薬物の消化管吸への OATP2B1 の寄与を提唱している。Fexofenadine 以外の薬物の事例として、celiprolol や montelukast においても、OATP2B1 の single nucleotide polymorphism (SNP)を有するヒトで血中濃度あるいは AUC の低下が報告されており[23, 24]、薬物の消化管吸収への OATP2B1 の関与が明確になりつつある。一方、fexofenadine は FJ の同時摂取により AUC が低下する [10, 25]。 *In vitro* 試験において、FJ が OATP2B1 の活性低下を示すことを考慮すると[8, 10]、FJ による fexofenadine の吸収低下は OATP2B1 の競合阻害が一因であると考えられる。

しかし、前述した FJ による薬物吸収の低下は、全ての OATP2B1 基質薬物で共通に観測される現象ではない。薬物-FJ 間相互作用の中でも、臨床試験における GFJ の作用に着目すると、fexofenadine、celiprolol に限らず、aliskiren や talinolol についても同様に、GFJ 併用時において C_{max} と AUC の有意な低下が報告されている[4, 26]。一方、同様に OATP2B1 基質でありながら、pravastatin や glibenclamide については、GFJ の併用下においてそれぞれ C_{max} と AUC に有意な差は認められず[27, 28]、GFJ と OATP2B1 の基質薬物間の相互作用には基質依存性が存在する。GFJ 作用の OATP2B1 基質依存性について完全には明らかになってはいないが、当研究室では、基質間で GFJ 相互作用が多様化する原因として、OATP2B1 上に FJ 感受性の異なる MBS の存在を提唱している[12]。内因性化合物や薬物の吸収を担う OATP2B1 において、MBS の存在は食品作用の発現を左右する因子と考えられるため、薬物吸収や内因性化合物の再吸収における恒常性の維持のためにも MBS の存在を明確にする必要がある。また、薬物投与時に、不要な食事制限

による患者の QOL 低下の回避につながることから、OATP2B 上の基質結合部位に対する食品作用を明確に評価することは有益な情報となる。しかし、OATP2B1 上の MBS の存在は、OATP2B1 を介した基質輸送のキネティック解析や基質輸送特性からの示唆に限られている。

現在、OATP2B1 上の MBS については、E₁S の輸送について阻害剤感受性及び pH 感受性が異なることから、E₁S に対して高親和性の基質結合部位 (E₁S high affinity site) 及び低親和性の基質結合部位 (E₁S low affinity site) の存在を示唆している[12]。また、progesterone は OATP2B1 を介した E₁S や DHEAS の輸送活性を上昇させる促進剤として働くが、Bromosulphophthalein (BSP) や atorvastatin、glibenclamide に対する輸送活性には影響がなく、progesterone 感受性の異なる基質結合部位の存在が考察されている[29]。これらの検証は全て、基質輸送特性が基質間あるいは基質濃度によって異なる点から MBS の存在を示唆している。一方 P-gp においては、上記の様な輸送特性の解析による示唆に加え[30]、photo affinity labeling により複数のリガンド結合部位が存在を示唆することや[31]、site-directed mutagenesis により輸送体上の異なる位置のアミノ酸が基質輸送に影響を与えること[32]からも支持されている。さらに、同じ OATP 分子種である OATP1B1 や OATP1B3 については、輸送機能に対するアミノ酸残基の影響が報告されていることから[33, 34]、これら輸送体の構造上における結合部位が推測されている。OATP2B1 の機能や構造に關与するアミノ酸残基の情報として、9 番目及び 10 番目の膜貫通ドメイン間の細胞外ループに存在する C498 と C557 のアラニン変異体は(Figure 2-1-1)、OATP2B1 を介した E₁S の輸送活性を低下させる報告がある[35]。また、ヒスチジンを特異的に修飾する diethylpyrocarbonate (DEPC) 添加時に E₁S 輸送が減少することや[36]、OATP2B1 の立体構造の予測から H579 の基質輸送への関与が示唆されていることから、OATP2B1 の基質輸送においてヒスチジンが関与する可能性が高いと考えられる。一方で、R607 のアラニン変異体は E₁S の輸送活性を顕著に低下させる報告があり[37]、ヒスチジンと同様に側鎖にアミノ基を有する塩基性アミノ酸であり、OATP2B1 の E₁S 輸送が pH 依存性に關与しているのではないかと考えられる。以上より、OATP2B1 を形成するアミノ酸の構造変化による E₁S 輸送活性の変動から、OATP2B1 の立体構造解析の基質結合部位の推測が可能となる。そのため、OATP2B1 の立体構造上における MBS の実証によって、予測される基質結合部位の關係性から、相互作用の予測に応用できると期待できる。したがって、OATP2B1 の E₁S の輸送活性に対するアミノ酸残基の影響から、OATP2B1 上の E₁S high affinity site と E₁S high affinity site の存在をより明確に示すことができる。一方で、いずれの報告も OATP2B1 基質として E₁S

を使用しており、他の基質化合物に対する影響は評価されていない。OATP2B1 の基質輸送に対する食品作用は基質依存性を示すことから、OATP2B1 基質間における結合部位の関係性を評価することで、輸送体に及ぼす食品作用の多様性の一因となる可能性がある。

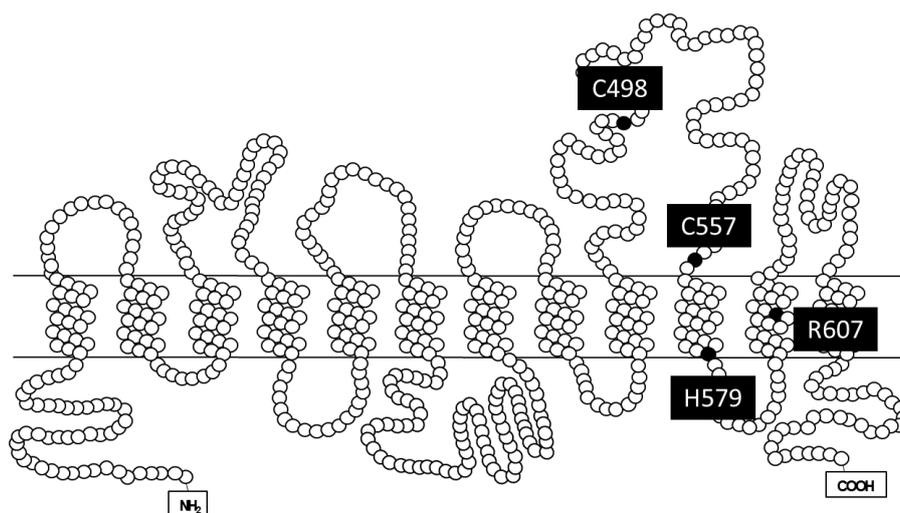


Figure 2-2-1 Predicted 12 Transmembrane Domain Model of OATP2B1

Predicted 12 transmembrane domain model of OATP2B1 was made using TopPred2 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.p>).

そこで、第二章では OATP2B1 上に MBS の存在を裏付けることを目的とした。まず、現状で示唆されている E₁S high affinity site と E₁S low affinity site の存在を明確にするため、E₁S 輸送に影響するアミノ酸残基の報告を基に、E₁S high affinity site と E₁S low affinity site に関与するアミノ酸の探索を行った。Diethylpyrocarbonate (DEPC) による E₁S 輸送の低下から、ヒスチジン残基内のイミダゾール基の寄与が大きいと考え、イミダゾール基をアミド基に置換したグルタミンへの変異体を作製することとした。また、R607 のアラニン変異体が E₁S 輸送を顕著に低下させることから[37]、OATP2B1 上の全ヒスチジン 16 種と 607 番目のアルギニンの変異体を作製し、E₁S 輸送活性の変動から E₁S high affinity site と E₁S low affinity site に関与する候補アミノ酸をしばらくこむこととした。続いて、E₁S high affinity site と E₁S low affinity site の存在を裏付けるため、E₁S high affinity site と E₁S low affinity site に関与する候補アミノ酸の変異体を用いたキネティック解析、および OATP2B1 阻害剤や促進剤の感受性を評価した。続いて、他の

OATP2B1 基質結合部位と E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site との関係性を示すため、E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site に関与するアミノ酸変異体における輸送活性の変動及び、阻害剤や促進剤の感受性を評価した。

第二節 実験方法

2-2-1 試薬

Estrone sulfate ammonium salt [6,7-³H(N)]-: [³H] E₁3S (1687.2 GBq/mmol) は PerkinElmer Life and Analytical Sciences (MA, USA)より購入した。Prostaglandin E₂ [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15-³H(N)] (6660 GBq/mmol) は ParkinElmer Life and Analytical Sciences (MA, USA)より購入した。Pravastatin sodium は小林化工(株) (Fukui, Japan) に提供して頂いた。他の試薬はそれぞれ Sigma-Aldrich (MO, USA)、Wako Pure Chemical (Osaka, Japan)、Invitrogen Life Technologies (MD, USA)、Kanto Chemicals (Tokyo, Japan)および Nacalai tesque (Kyoto, Japan)より購入した。

2-2-2 実験動物

アフリカツメガエルは、カトー S カガク (Chiba, Japan) より購入した。動物の取り扱い及び飼育は、金沢大学動物実験規程 (第 833 号) に従った。

2-2-3 OATP2B1 ヒスチジン及びアルギニン変異体発現プラスミド DNA の作製

OATP2B1 の cDNA を鋳型とし、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technology) 及び、ヒスチジンをグルタミンに、アルギニンをアラニンに変異させるプライマーを用い(Table 2-2-1)、変異を導入した。変異導入の条件は、熱変性反応(95 °C、30 sec)、アニーリング反応(55 °C、1 min)、伸長反応(68 °C、10 min) を 15 サイクル行った。目的の変異が導入されていることを DNA シークエンサー (ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer、Applied Biosystems) により確認した。DNA シークエンスには BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用した。目的部位以外の変異を防ぐため、変異導入部分を制限酵素により切断後、wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて DNA 断片を調製した。その後、野生型の OATP2B1 cDNA にも同様に制限酵素処理を行って DNA 断片を調製し、T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いて変異を含む DNA 断片と ligation 反応を行った。

Table 2-2-1 Primer sequences for Site-Directed Mutagenesis

Primer		Sequence (5' to 3')
H46Q	sense	CGGCCAAGTGTGTTCCAAAACATCAAGCTGTTTCG
	antisense	CGAACAGCTTGATGTTTTGGAACACACTTGGCCG

H55Q	sense	GTTCGTTCTGTGCCAGAGCCTGCTGCAGCTG
	antisense	CAGCTGCAGCAGGCTCTGGCACAGAACGAAC
H113Q	sense	TTGGCAGCCGGGTGCAACGACCCCGAATGATTG
	antisense	CAATCATTCCGGGGTCGTTGCACCCGGCTGCCAA
H136Q	sense	CATGACTCTCCCGCAGTTCATCTCGGAGCC
	antisense	GGCTCCGAGATGAACTGCGGGAGAGTCATG
H185Q	sense	CACAGAAACCCAGCAGCTGAGTGTGGTGGG
	antisense	CCCACCACACTCAGCTGCTGGGTTTCTGTG
H219Q	sense	CGATGACTTTGCCCAAACAGCAACTCGCCCC
	antisense	GGGGCGAGTTGCTGTTTTGGGCAAAGTCATCG
H370Q	sense	CTGCAGACCCTACGCCAGCCATCTTCCTG
	antisense	CAGGAAGATGGGCTGGCGTAGGGTCTGCAG
H436Q	sense	GGTCAAGCGGCTCCAAC TGGGCCCTGTGGG
	antisense	CCCACAGGGCCCAGTTGGAGCCGCTTGACC
H468Q	sense	GGCTGCTCCAGCCAGCAGATTGCGGGCATC
	antisense	GATGCCCGCAATCTGCTGGCTGGAGCAGCC
H475Q	sense	GCGGGCATCACACAGCAGACCAGTGCCAC
	antisense	GTGGGCACTGGTCTGCTGTGTGATGCCCGC
H480Q	sense	CAGACCAGTGCCAGCCTGGGCTGGAGCTG
	antisense	CAGCTCCAGCCCAGGCTGGGCACTGGTCTG
H517Q	sense	CATCACACCCTGCCAGGCAGGCTGCTCAAG
	antisense	CTTGAGCAGCCTGCCTGGCAGGGTGTGATG
H559Q	sense	CTCAACGTGCAGCCAGCTGGTGGTGCCCTTC
	antisense	GAAGGGCACCACCAGCTGGCTGCACGTTGAG
H579Q	sense	GCCTGTCTCACCCAGACACCCTCCTTCATG
	antisense	CATGAAGGAGGGTGTCTGGGTGAGACAGGC
H618Q	sense	CAGCCCCGTGATCCAGGGCAGCGCCATCG
	antisense	CGATGGCGCTGCCCTGGATCACGGGGCTG
H628Q	sense	CACCACCTGTGTGCAGTGGGCCCTGAGCTG
	antisense	CAGCTCAGGGCCCACTGCACACAGGTGGTG
R607A	sense	CCAGTTCATGTTCCCTGGCGATTTTGGCCTGGATGC
	antisense	GCATCCAGGCCAAAATCGCCAGGAACATGAACTGG

Table 2-2-2 Primer sequences for DNA sequencing

Primer	Sequence (5' to 3')
Seq primer 1	ACGCTCAACTTTGGCAGA
Seq primer 1.5	TCCAGGTGTGTTTCTGTG
Seq primer 2	GAGCTCCATCTCCACAG

Seq primer 2.25	CAGCATCTGAGTGTGGTG
Seq primer 2.5	GCACCAAACCTGACTGTG
Seq primer 3	CATCTTCCTGCTGGTGG
Seq primer 4	GGCAGCCGATGAGCAGG
Seq primer 4.25	CTTTGCCTGCTGGGGATG
Seq primer 4.5	GTGGAATACATCACACCC
Seq primer 5	GCTGCCTCAGGACAGCC

2-2-4 OATP2B1 cRNA 合成

OATP2B1 の cRNA 合成を効率的に行うため、3'末端側を制限酵素 *Nhe*I で処理し直鎖状にした(37°C、3-6 時間)。OATP2B1 の 5'末端側配列に基づいた T7 RNA polymerase による cRNA 合成及び Capping は、mCAP mRNA capping mMACHINE Kit (Ambion) を用いて行った。鋳型 DNA を除くために DNase I 処理(37°C、15 分)を行い、phenol-chloroform-isoamylalcohol 及び chloroform による RNA 抽出後、isopropanol 及び ammonium acetate を加え、遠心により沈殿として RNA を回収した。70% ethanol で洗浄後、DNase/RNase-free water で溶解した。

2-2-5 Oocyte の調製及び cRNA の注入

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の下腹部を開腹して oocyte を取り出し、ピンセットでほぐしながら OR2 buffer で 10 回洗浄した。続いて、2 mg/mL collagenase A (Wako Pure Chemical Industries) 溶液 10mL 中に oocyte を加え、緩やかに転倒攪拌させながら反応させた (20-25 分、室温)。反応後、OR2 buffer で 10 回洗浄した後 MBS buffer で 5 回洗浄することで MBS buffer に置換した。Oocyte を defolliculation buffer 中に移し、顕微鏡下でピンセットを用いて濾胞膜を除いた。その後、oocyte を gentamicin 50 µg/mL を含む MBS buffer 中で、18°Cの恒温槽内で静置した。cRNA 溶液は 65°Cで 5 分間熱変性させた後、マイクロインジェクターを用いて濾胞膜を除去した oocyte に cRNA を 50 nL ずつ注入し、gentamicin 50 µg/mL を含む MBS buffer 中で、18°Cの恒温槽内に静置した。静置中は 1 日に 2 回 MBS buffer を交換し、cRNA 注入から 3 日後に取り込み試験に用いた。対照として water を 50 nL 注入した oocyte を用いた。

OR2 buffer

NaCl	100 mM
MgCl ₂	1.0 mM
KCl	2.0 mM
HEPES	5.0 mM

adjusted to pH 7.4 with NaOH

MBS (modified Barth's solution) buffer

NaCl	88 mM
KCl	1.0 mM
Ca(NO ₃) ₂	0.33 mM
CaCl ₂	0.41 mM
MgSO ₄	0.82 mM
NaHCO ₃	2.4 mM
HEPES (pH7.4) or MES (pH6.5)	10 mM

adjusted to pH7.4 or 6.5 with NaOH or HCl

Defolliculation buffer

NaCl	110 mM
EDTA	1.0 mM
HEPES	10 mM

adjusted to pH 7.4 with NaOH

2-2-7 Oocyte を用いた [³H] E₁3S 及び [³H] PGE₂ の取り込み試験

cRNA 注入後 3 日間培養した oocyte を試験に用いた。取り込み試験は 25°C に設定した水浴上で行った。各化合物を MBS buffer (pH 6.5) に溶解させ、同様に水浴を用いて 25°C の溶液とした。あらかじめ、24 well plate 中に 500 μL の MBS buffer (pH 6.5) を加え、その中に oocyte を入れた状態から、基質化合物を含む 500 μL の溶液と置換することで反応を開始した。初期濃度測定のために、開始直後に上清 20 μL を採取した。一定時間後、

氷冷した MBS buffer で 3 回洗浄して取り込み反応を停止させた。反応停止後、oocyte を速やかに 1.5 mL チューブに移し、5% sodium dodecyl sulfate で可溶化した後、Clearsol-1 (Nacalai tesque)を加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka) で放射活性を測定した。

2-2-8 Oocyte を用いた fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine の取り込み試験

cRNA 注入後 3 日間培養した oocyte を試験に使用した。取り込み試験は 25°C に設定した水浴上で行った。各化合物を MBS buffer (pH6.5) に溶解させ、同様に水浴を用いて 25°C の溶液とした。あらかじめ、24 well plate 中に 500 μ L の MBS buffer (pH6.5) を加え、その中に oocyte を入れた状態から、500 μ L の薬物を含む溶液と置換することで反応を開始した。初期濃度測定のために、開始直後に上清を 20 μ L 採取した。一定時間後、氷冷した MBS buffer で 3 回洗浄して取り込み反応を停止させた。反応停止後、oocyte を速やかに 1.5 mL チューブに移し、遠心チューブ内の液体をピペットで除いた。氷冷した methanol: 水 = 7:3 に調製した溶液 500 μ L を遠心チューブ内に加え、超音波で oocyte を破碎 (M8808: Wakenyaku Co., Ltd.) し、15000 rpm、15 min、4°C で遠心した (CF15RX: Hitachi Koki Co., Ltd.)。その後、上清 400 μ L を新たな遠心チューブに移し、一体型遠心濃縮システム (Savant Speed Vac SPD 2010, Thermo.) を用いて溶液を蒸発させ、各化合物の移動相で再溶解し LC-MS/MS 用測定試料とした。

2-2-9 LC-MS/MS 定量条件

< fexofenadine >

LC condition

HPLC System: LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column: Mercury MS (10 \times 4.0 mm, Luna 5 μ m C18, Phenomenex, Torrance, CA)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid, (B) acetonitrile

Gradient Program: (B) 5% (0 min) \rightarrow (B) 5% (1.25 min) \rightarrow (B) 95% (2.25 min) \rightarrow (B) 95% (4.35 min) \rightarrow (B) 5% (4.51 min) \rightarrow Stop (5.5 min)

Flow Rate: 0.3 mL/min

Equilibrate: 1.0 min

Injection Volume: 20 μ L

Column Temperature: 40°C

MS condition

MS Spectrometer: API 3200™ LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Polarity: Positive

m/z (Q1/Q3): 502.3/466.3

Ion Source: Turbo Spray

Curtain Gas (CUR): 10.0 psi

Collision Gas (CAD): 3 psi

IonSpray Voltage (IS): 5,500.0 V

Temperature (TEM): 700.0°C

Ion Source Gas1 (GS1): 40.0 psi

Ion Source Gas2 (GS2): 60.0 psi

Interface Heater (ihe): off

< Pravastatin >

LC condition

HPLC System: LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column: Mercury MS (10×4.0 mm, Luna 5µm C18, Phenomenex, Torrance, CA)

Mobile Phase: (A) 12 mM ammonium acetate (pH 4.5), (B) methanol

Gradient Program: (B) 10% (0 min) → (B) 10% (1 min) → (B) 70% (2.0 min) → (B) 70% (5.5 min) → (B) 10% (6.0 min) → Stop (7.0 min)

Flow Rate: 0.3 mL/min

Equilibrate: 0.5 min

Injection Volume: 20 µL

Column Temperature: 40°C

MS condition

MS Spectrometer: API 3200™ LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Polarity: Positive

m/z (Q1/Q3): 442.3/209.2

Ion Source: Turbo Spray

Curtain Gas (CUR): 15.0 psi

Collision Gas (CAD): 3 psi

IonSpray Voltage (IS): 5,500.0 V

Temperature (TEM): 200.0°C
Ion Source Gas1 (GS1): 70.0 psi
Ion Source Gas2 (GS2): 80.0 psi
Interface Heater (ihe): off

< rosuvastatin >

LC condition

HPLC System: LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column: Mercury MS (10×4.0 mm, Luna 5µm C18, Phenomenex, Torrance, CA)
Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid, (B) methanol
Gradient Program: (B) 5% (0 min) → (B) 5% (1.50 min) → (B) 80% (2.00 min) → (B) 80% (5.50 min) → (B) 5% (6.00 min) → (B) 5% (7.00 min) → Stop (7.01 min)
Flow Rate: 0.3 mL/min
Equilibrate: 0.5 min
Injection Volume: 20 µL
Column Temperature: 40°C

MS condition

MS Spectrometer: API 3200™ LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA)
Polarity: Positive
m/z (Q1/Q3): 482.1/258.3
Ion Source: Turbo Spray
Curtain Gas (CUR): 10.0 psi
Collision Gas (CAD): 3 psi
IonSpray Voltage (IS): 4,000.0 V
Temperature (TEM): 700.0°C
Ion Source Gas1 (GS1): 80.0 psi
Ion Source Gas2 (GS2): 70.0 psi
Interface Heater (ihe): off

< sulfasalazine >

LC condition

HPLC System: LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column: Mercury MS (10×4.0 mm, Luna 5 μm C18, Phenomenex, Torrance, CA)
Mobile Phase: (A) 5mM ammonium formate, (B) acetonitrile
Gradient Program: (B)10% (0 min) → (B)10% (1.50 min) → (B)75% (3.20 min) → (B)98% (4.00 min) → (B)98% (5.50 min) → (B)5% (5.51 min) → Stop (6.50 min)
Flow Rate: 0.4 mL/min
Equilibrate: 0.5 min
Injection Volume: 30 μL
Column Temperature: 40°C

MS condition

MS Spectrometer:
API 3200™ LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA)
Polarity: Positive
m/z (Q1/Q3): 399.1/381.0
Ion Source: Turbo Spray
Curtain Gas (CUR): 10.0 psi
Collision Gas (CAD): 3 psi
IonSpray Voltage (IS): 4,500.0 V
Temperature (TEM): 600.0°C
Ion Source Gas1 (GS1): 30.0 psi
Ion Source Gas2 (GS2): 70.0 psi
Interface Heater (ihe): off

2-2-10 データ解析

Oocyte への化合物の取り込み活性は、取り込み試験時間内に oocyte に取り込まれた化合物量を反応液中基質濃度で除して得られる uptake clearance (μL/15 min/oocyte) で示した。また、OATP2B1 を介した特異的輸送は、cRNA 注入 oocyte における取り込み量から水注入 oocyte における取り込み量を減じたものとした。OATP2B1 による基質輸送の kinetic parameter 算出は、MULTI プログラム[38]を用いて以下の2つの式を使い分けて算出した。

$$(1) \quad V = V_{\max}(1) \times S / (K_m(1) + S)$$

$$(2) \quad V = V_{\max}(1) \times S / (K_m(1) + S) + V_{\max}(2) \times S / (K_m(2) + S)$$

なお、 V は取り込み速度 (pmol/15 min/oocyte)、 S は初期基質濃度、 V_{\max} は最大取り込み速度、 K_m はミカエリスメンテン定数 (μM) を表す。各 affinity site の寄与率は、 E_13S high affinity site、 E_13S low affinity site それぞれにおける取り込み速度を算出し、合計の速度に対する割合として算出した。

OATP2B1 のヒスチジン及びアルギニン変異体の取り込み活性は、野生型 OATP2B1 における取り込み量を 100% とした相対値で示した。また、取り込み活性に対する阻害効果及び促進効果の検討では、阻害剤あるいは促進剤非存在下を対照群とし、取り込み活性を 100% とし、相対活性で示した。

全ての有意差検定は、Student's t-test を用い $P < 0.05$ のときに統計的に有意な差があると判断した。

2-2-11 OATP2B1 の二次構造予測

OATP2B1 の二次構造予測には TopPred2 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.p>) を用いた。

2-2-12 OATP2B1 の立体構造予測

phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi>) を用いて、OATP2B1 の立体構造予測を行った。立体構造予測のテンプレートとしては glycerol-3-phosphate transporter を使用して解析を行った。OATP2B1 上に存在すると考えられる cavity の予測には phyre2 で予測した立体構造を基に、q-site finder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>) を使用した。

第三節 実験結果

2-3-1 OATP2B1 を介した E₁3S 輸送の濃度依存性試験

OATP2B1 発現 oocyte を用いて、OATP2B1 を介した E₁3S 輸送の濃度依存性による解析から MBS の示唆を目的に検討を行った。

Michaelis-Menten plot から、E₁3S 輸送に飽和性が認められ(Figure 2-3-1 A) 、また、Eadie-Hofstee plot から E₁3S 輸送について二相性が観察された(Figure 2-3-1 B)。OATP2B1 を介した E₁3S 輸送を 2-2-10 の(1)式を用いて解析すると、E₁3S high affinity site 及び low affinity site の K_m 値はそれぞれ $0.463 \pm 0.091 \mu\text{M}$ 及び $51.4 \pm 8.33 \mu\text{M}$ 、V_{max} 値はそれぞれ $0.867 \pm 0.166 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ 及び $19.8 \pm 1.46 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ と算出された。算出された K_m、V_{max} の妥当性を評価するため、既報の文献と比較したところ、E₁3S high affinity site 及び low affinity site の K_m 値は $0.10 \mu\text{M}$ 及び $29.9 \mu\text{M}$ [12] または $0.55 \mu\text{M}$ 及び $41.0 \mu\text{M}$ [8] と報告されている。また、V_{max} 値は $0.211 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ 及び $14.9 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ [12]、あるいは $4.32 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ 及び $49.5 \text{ pmol}/15 \text{ min}/\text{oocyte}$ [8] と報告されている。本研究で得られた K_m 値及び V_{max} 値はこれら 2 つの報告値と同程度であるため、実験結果として適切であると判断した。

以降の検討で、E₁3S high affinity site と E₁3S low affinity site の評価に用いる濃度条件を決定するため、Figure 2-3-1 で得られたパラメータを用いて、各 E₁3S 濃度条件における E₁3S high affinity site と E₁3S low affinity site の寄与率の算出を行った。E₁3S の輸送は、基質濃度が $1 \mu\text{M}$ 程度で両 affinity site の寄与率の大小関係が逆転し、基質濃度 $0.1 \mu\text{M}$ 以下では high affinity site の寄与率は 80%以上、基質濃度 $20 \mu\text{M}$ 以上では low affinity site の寄与率が 80%以上となることが示された(Figure 2-3-2B)。したがって、以降の検討では、E₁3S high affinity site の評価を $0.005 \mu\text{M}$ 、E₁3S low affinity site の評価を $50 \mu\text{M}$ で行うこととした。

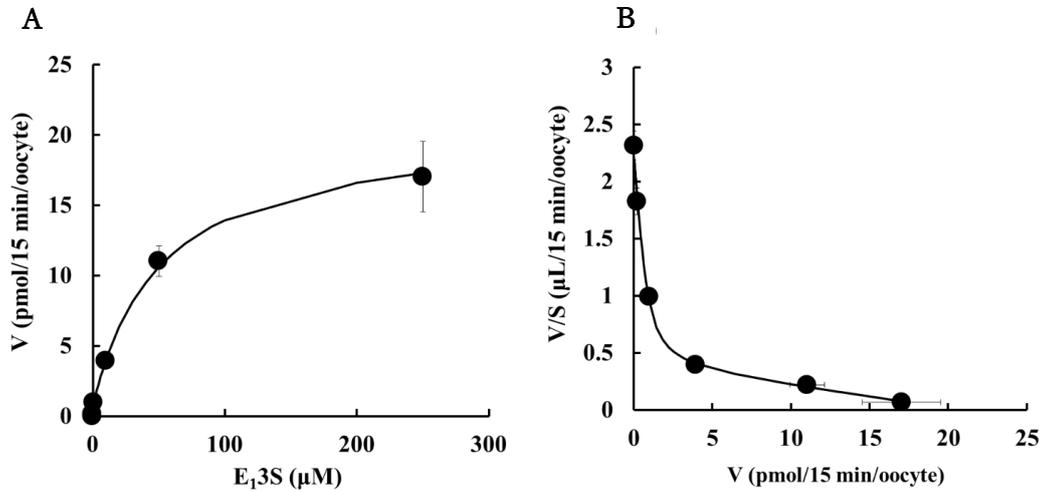


Figure 2-3-1 Concentration dependence of OATP2B1-mediated uptake of E₁3S.

(A) Michaelis-Menten plot and (B) Eadie-Hofstee plot of E₁3S uptake at concentrations of 0.005, 0.1, 1, 10, 50, 250 μM by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1, measured for 15 min at 25°C and pH 6.5. Data are shown as means ± S.E.M. (n = 9-10).

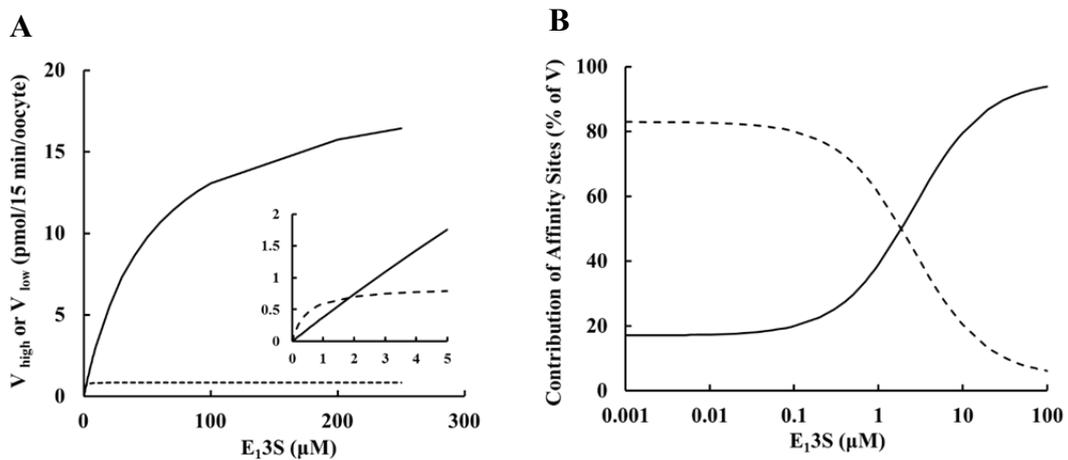


Figure 2-3-2 Simulated contributions of high and low affinity sites to OATP2B1-mediated E₁3S transport.

Transport of E₁3S mediated by the high affinity (dotted line) and low affinity (solid line) sites on OATP2B1 was simulated using the kinetic parameters obtained in figure 2-3-1. (A) Simulated

Michaelis-Menten plot of E₁3S transport mediated by high affinity (V_{high}, dashed line) and low affinity (V_{low}, solid line) sites on OATP2B1. (B) Simulated contributions of high affinity (dashed line) and low affinity sites (solid line) to OATP2B1-mediated transport of E₁3S. The contributions of the high and low affinity sites to OATP2B1-mediated transport of E₁3S are presented as percent of total velocity ($V = V_{\text{high}} + V_{\text{low}}$).

2-3-2 ヒスチジン残基及びアルギニン残基が E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site に与える影響

OATP2B1 を介した E₁3S 輸送のキネティクス解析から、high affinity site 及び low affinity site の存在が確認されたが、これにより OATP2B1 の構造上に異なる E₁3S 輸送部位が存在する可能性がある。OATP2B1 の構造解析から MBS の存在を示すために、OATP2B1 を構成するアミノ酸と E₁3S 輸送の関係性を探索することを目的とした。そこで、OATP2B1 上のアミノ酸残基が基質輸送に与える影響から OATP2B1 上における E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site の存在を検討するため、OATP2B1 のアミノ酸を用いて E₁3S の輸送評価を行った。

ヒスチジンを特異的に修飾する DEPC によって OATP2B1 による E₁3S 輸送が低下すること[36]、さらには立体構造予測から 579 番目のヒスチジンの輸送活性に対する関与が報告されていることに加え[39]、ヒスチジン内のイミダゾール基がプロトン移動に関与することから、E₁3S 輸送の pH 依存性を生じている可能性も考えられる。DEPC の作用機序が、ヒスチジン内に存在するイミダゾール基の窒素原子とエトキシカルボニル化することで、ヒスチジンを修飾するため、イミダゾール基が輸送活性に寄与する構造と考えられる。そこで、アミノ酸残基の分子量と電荷の変化による影響を少なくするため、分子量が同程度である中性アミノ酸グルタミンを置換後のアミノ酸として選択した。また、607 番目のアルギニンのアラニン変異体は E₁3S 輸送を顕著に低下させるため、候補のひとつとした。したがって、OATP2B1 上のヒスチジン 16 箇所をそれぞれのグルタミンに、及び 607 番目のアルギニンをアラニンに置換したプラスミドを作製した(Figure 2-3-2)。それらを用いて、E₁3S affinity site の機能に関与するアミノ酸の探索のため、E₁3S 濃度 0.005 μM 及び 50 μM における E₁3S 取り込みをそれぞれ E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site の機能と考え、野生型 OATP2B1(wild) の輸送活性と比較評価した。また、アミノ酸変異体を用いた検討を進める上で、野生型と比較して、輸送活性が 50%以下の低値を示した場合において、変異のアミノ酸残基が基質輸送に影響を与え

たと判断した。

H219Q-、H579Q-、H618Q-及び R607A-OATP2B1 の4種の OATP2B1 変異体で野生型と比較して E₁S 取り込みが 50%以下の低値を示した。H219Q-OATP2B1 では E₁S 0.005 μM 及び 50 μM において野生型と比較して、それぞれ 42.2%及び 48.2%の取り込みが減少した (Figure 2-3-4)。H579Q-OATP2B1 では E₁S 0.005 μM 及び 50 μM において、野生型と比較してそれぞれ 57.4 % 及び 14.0 % の取り込み量であり、E₁S 高濃度における E₁S 輸送が顕著に低下した (Figure 2-3-3)。このことから、H579Q-OATP2B1 では E₁S low affinity site の活性が選択性高く低下していると考えられた。H618Q-OATP2B1 では E₁S 0.005 μM 及び 50 μM において、野生型と比較して 17.6% 及び 85.8%の取り込みであり、E₁S 低濃度における E₁S 輸送が顕著に低下した (Figure 2-3-3)。このことから、H618Q-OATP2B1 では E₁S high affinity site が選択性高く活性低下していると考えられた。また、R607A-OATP2B1 では E₁S 0.005 μM 及び 50 μM において、野生型と比較してそれぞれ 1.31%及び 8.78 %であった (Figure 2-3-4)。

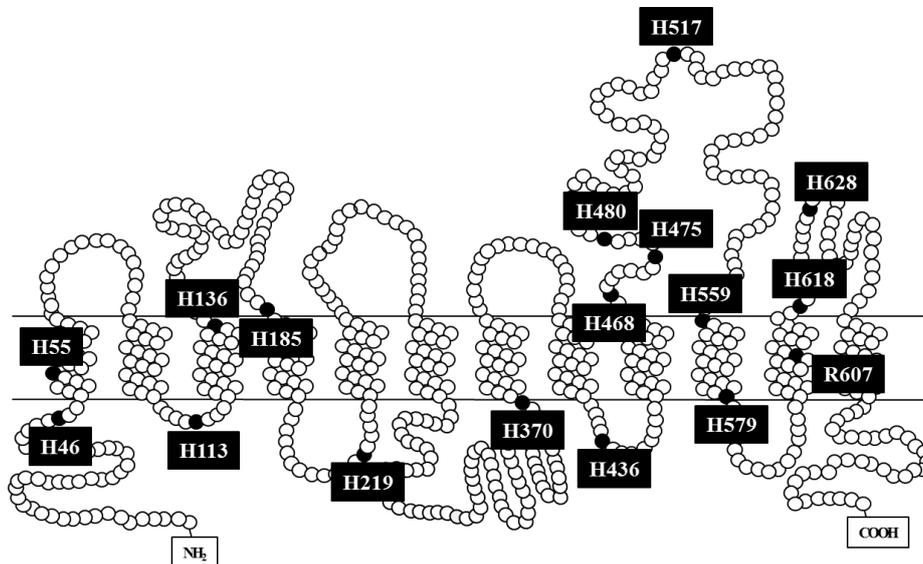


Figure 2-3-3 Predicted 12 transmembrane domain model of OATP2B1.

Predicted 12 transmembrane domain model of OATP2B1 was made using TopPred2 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.p>).

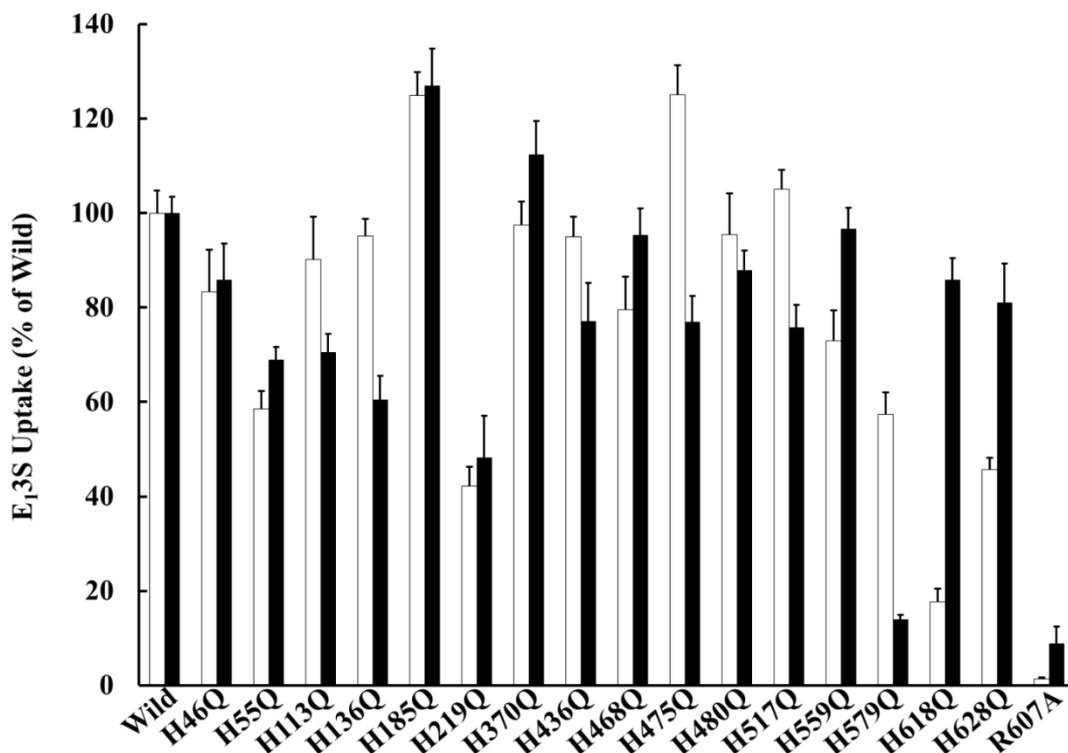


Figure 2-3-4 Effect of histidine or arginine on high and low affinity sites of E₁3S on OATP2B1.

Uptake of E₁3S mediated by high and low affinity sites on OATP2B1 by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1 wild and mutants was measured for 15 min at 25°C. Uptake of E₁3S mediated by high and low affinity sites was estimated at substrate concentrations of 0.005 μM (opened columns) and 50 μM (closed columns), respectively. OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. Uptake activity was expressed as % of wild, compared with oocyte expressing OATP2B1 wild. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 7-10).

2-3-3 H579Q-、H618Q-及び H579Q/H618Q-OATP2B1 を用いた E₁3S 輸送の濃度依存性試験

H579Q-及び H618Q-OATP2B1 はそれぞれ E₁3S 高濃度及び低濃度における取り込み減少が顕著であり、H579 は E₁3S low affinity site の機能への関与が、H618 は E₁3S high affinity site の機能への関与が示唆された。そこで、H579 及び H618 が E₁3S の基質結合

部位に与える影響を、両ヒスチジン変異体の E₁3S 輸送における K_m 値及び V_{max} 値を野生型と比較評価した。また、H579 と H618 が、それぞれ E₁3S low affinity site と E₁3S high affinity site の機能に対して寄与が大きいと考え、この二つのアミノ酸の変異体である H579Q/H618Q-OATP2B1 プラスミドを作製した。H579Q/H618Q-OATP2B1 については、E₁3S の low affinity site と high affinity site の機能低下を期待して、H579Q-、H618Q-及び H579Q/H618Q-OATP2B1 の 3 つの OATP2B1 変異体について、K_m 値及び V_{max} 値を野生型比較するため、E₁3S の濃度依存性試験を行った。

濃度依存性試験の結果、H579Q-OATP2B1 における E₁3S 取り込みは、E₁3S 50 μM 及び 250 μM で対照値 (water を注入した oocyte) と比較して有意な増加が観察されなかった。また、Eadie-Hofstee plot 解析では二相性は観察されず(Figure 2-3-6)、H579Q-OATP2B1 の E₁3S 輸送に対する K_m 値と V_{max} 値はそれぞれ 0.180 ± 0.028 μM、0.345 ± 0.033 pmol/15 min/oocyte と算出され、野生型の E₁3S high affinity site の K_m 値及び V_{max} 値と同程度の値が得られた(Table 2-3-1)。H618Q-OATP2B1 における E₁3S 取り込みは Eadie-Hofstee plot 解析により二相性が観察され、E₁3S high affinity site の K_m 値及び V_{max} 値は 0.149 ± 0.227 μM 及び 0.0402 ± 0.0402 pmol/15 min/oocyte、E₁3S low affinity site の K_m 値及び V_{max} 値は 91.1 ± 16.4 μM 及び 60.0 ± 7.34 pmol/15 min/oocyte と算出された(Figure 2-3-4, Table 2-3-1)。H618Q-OATP2B1 の E₁3S 取り込みにおける E₁3S high affinity site の寄与率は E₁3S 0.005 μM において 28.4%と算出され、その寄与率は E₁3S 濃度依存的に減少することから、H618Q では主に E₁3S low affinity site が E₁3S 輸送に関与していると考えられた。H579Q/H618Q による E₁3S 取り込みは Eadie-Hofstee plot 解析により二相性が観察され、H579Q/H618Q の E₁3S high affinity site の K_m 値は 0.808 ± 0.519 μM、V_{max} 値は 0.380 ± 0.239 pmol/15 min/oocyte と算出され、E₁3S low affinity site の K_m 値は 312 ± 243 μM、V_{max} 値は 30.9 ± 16.8 pmol/15 min/oocyte と算出されたこと。したがって、野生型と比較して H579Q/H618Q-OATP2B1 の E₁3S 輸送活性の低下が示され、E₁3S low affinity site への H519 の関与、E₁3S high affinity site への H618 の関与が示唆された(Figure 2-3-5、Table 2-3-1)。

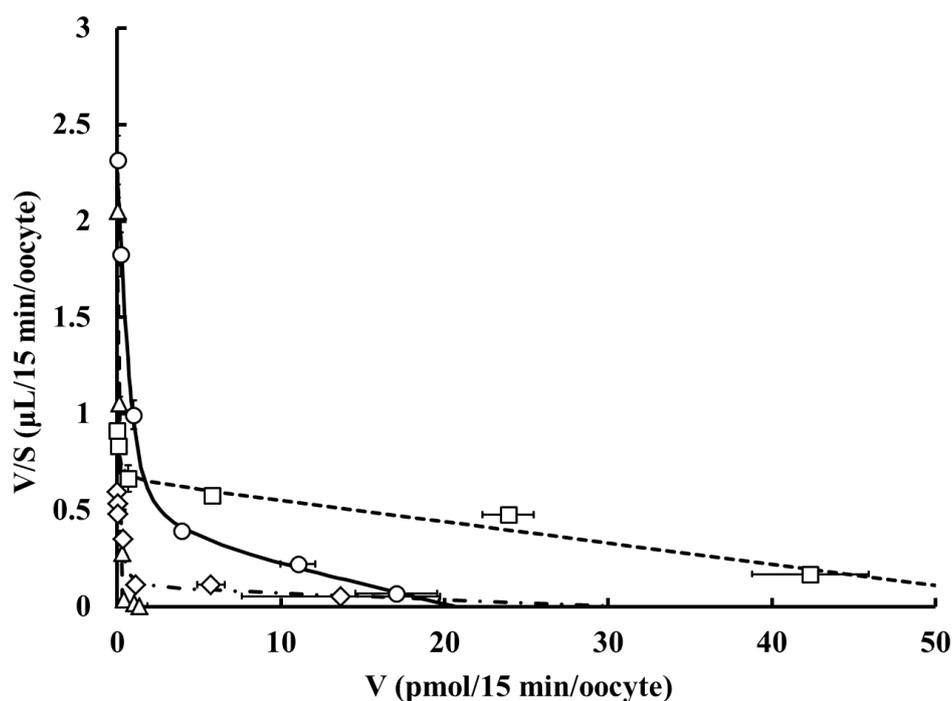


Figure 2-3-5 Concentration dependence of OATP2B1-mediated transport of E₁3S by OATP2B1 wild and mutants.

Eadie-Hofstee plot of E₁3S uptake by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1 wild and mutants at various concentrations (0.005, 0.1, 1, 10, 50, 250 μM for OATP2B1 wild and H618Q-OATP2B1. 0.005, 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 250 μM for H579Q- and H579Q/H618Q-OATP2B1) for 15 min at 25 °C and pH 6.5. OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. ○: OATP2B1 wild. △: H579Q. □: H618Q. ◇: H579Q/H618Q. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 5-10).

Table 2-3-1 Kinetic parameters on E₁3S uptake by OATP2B1 wild and mutants.

	High affinity site			Low affinity site		
	K _m (μM)	V _{max} (pmol/15 min/oocyte)	V _{max} /K _m (μL/15 min/oocyte)	K _m (μM)	V _{max} (pmol/15 min/oocyte)	V _{max} /K _m (μL/15 min/oocyte)
Wild	0.463 ±0.0914	0.867 ±0.166	1.87	51.4 ±8.33	19.8 ±1.46	0.385

H579Q	0.180 ±0.0282	0.345 ±0.0335	1.91	—	—	—
H618Q	0.149 ±0.227	0.0402 ±0.0594	0.269	91.1 ±16.4	60.0 ±7.34	0.659
H579Q/H618Q	0.808 ±0.519	0.380 ±0.239	0.471	312 ±243	30.9 ±16.8	0.0987

—: Uptake was too low to evaluate.

Data are shown as means ± S.D. (n=5-10)

2-3-4 H579Q-及び H618Q-OATP2B1 の E₁S 輸送活性に対する naringin 及び progesterone の影響

濃度依存性試験の結果から、H579Q-及び H618Q-OATP2B1 はそれぞれ E₁S low affinity site と E₁S high affinity site の機能が低下していると考えられた。そこで、OATP2B1 の E₁S 輸送における輸送特性として、阻害剤及び促進剤の感受性を H579Q-及び H618Q-OATP2B1 について比較評価した。E₁S high affinity site と low affinity site を区別するため、affinity site によって作用が異なる化合物である、GFJ の主要成分 naringin とステロイドホルモンである progesterone を用いて輸送特性を評価した。Naringin は low affinity site の活性に影響せず、high affinity site の活性阻害を示す一方で、progesterone は (low affinity site の活性阻害を示し、high affinity site の活性促進を示す。

E₁S 0.005 μM において、H579Q-OATP2B1 の E₁S 取り込みは naringin 存在下で低下し、progesterone 存在下で増加が観察されたことから、H579Q-OATP2B1 で機能している基質結合部位は野生型の E₁S high affinity site と同様の特性を有すると考えられた (Figure 2-3-5)。また、H618Q-OATP2B1 を介した E₁S 取り込みは期待した結果と異なり、naringin 存在下で低下し、progesterone 存在下で上昇したことから、E₁S low affinity site と異なる性質を有すると考えられた (Figure 2-3-5)。

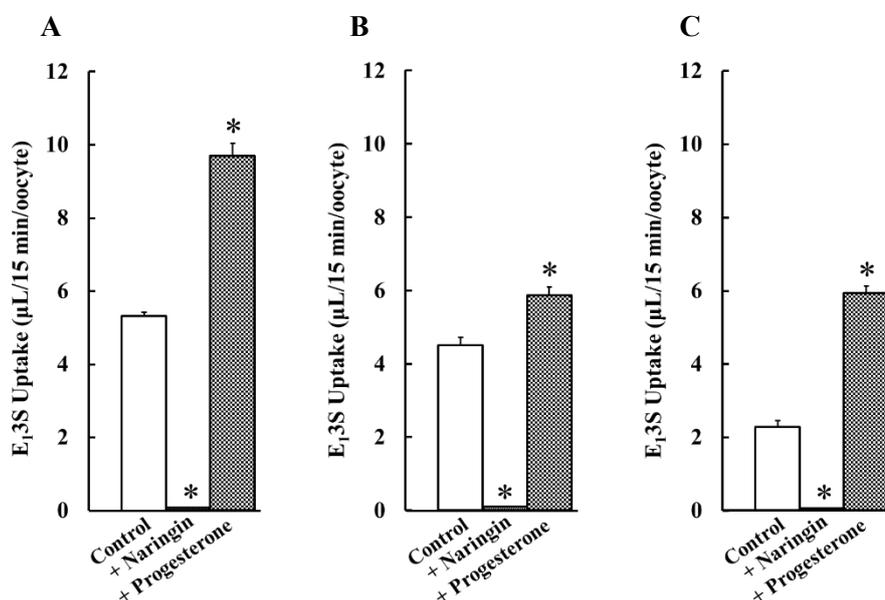


Figure 2-3-6 Effect of naringin and progesterone on E₁3S uptake by OATP2B1 wild and mutants.

Uptake of E₁3S (0.005 µM) mediated by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1 wild (A), H579Q (B), or H618Q (C) was measured for 15 min at 25 °C without naringin and progesterone or with naringin (1000 µM) or progesterone (100 µM). OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 7-8). * indicates a significant difference from the control by Student's t-test (p < 0.05).

3-3-5 OATP2B1 を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、PGE₂ 輸送に対する naringin の影響

OATP2B1 上における、E₁3S 以外の基質結合部位と E₁3S affinity site との関係性を探索するため、E₁3S low affinity site の活性に影響せず、high affinity site の活性阻害を示すことから、naringin 感受性を用いて E₁3S affinity site の輸送特性と比較することとした。他の OATP2B1 基質薬物として fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine 及び PGE₂ を選択した Fexofenadine は、臨床結果において OATP2B1*3 を有するヒトにおける AUC の低下から、薬物吸収に OATP2B1 が関与する代表的な基質である。また、

fexofenadine は GFJ 併用時に AUC の低下が示されているが[25]、一方で、pravastatin は GFJ による AUC の低下が観察されないことから[27]、fexofenadine は naringin 感受性結合部位であり、pravastatin は naringin 非感受性の結合部位であると予想され、pravastatin が fexofenadine とは異なる結合部位である可能性から選択した。また、E₁S と基質結合部位が異なる可能性がある基質として、sulfasalazine 及び rosuvastatin に着目した。さらに、rosuvastatin は、in vitro 試験における OATP2B1*3 の活性評価において、E₁S における取り込みの減少とは異なり変化せず[7]、OATP2B1*3 を有するヒトにおいて、sulfasalazine と rosuvastatin は AUC の上昇が報告されている[8]。そのため、E₁S とは異なる結合部位であることを期待して、rosuvastatin と sulfasalazine を選択した。PGE₂ は、E₁S と同様に内因性物質であるということから同様の結合部位である可能性を期待して選択した。

各基質輸送に対する naringin の阻害効果を検討した結果、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の取り込みは naringin 存在下で減少した(Firuge 2-3-6 B, C, D)。一方、fexofenadine 及び PGE₂ は naringin による取り込み低下が観察されなかった(Figure 2-3-6 A, E)。各基質輸送に対する naringin の阻害効果から、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine は naringin 感受性の基質結合部位を介して輸送され、fexofenadine 及び PGE₂ は naringin 非感受性の基質結合部位を介して輸送されることが示された。

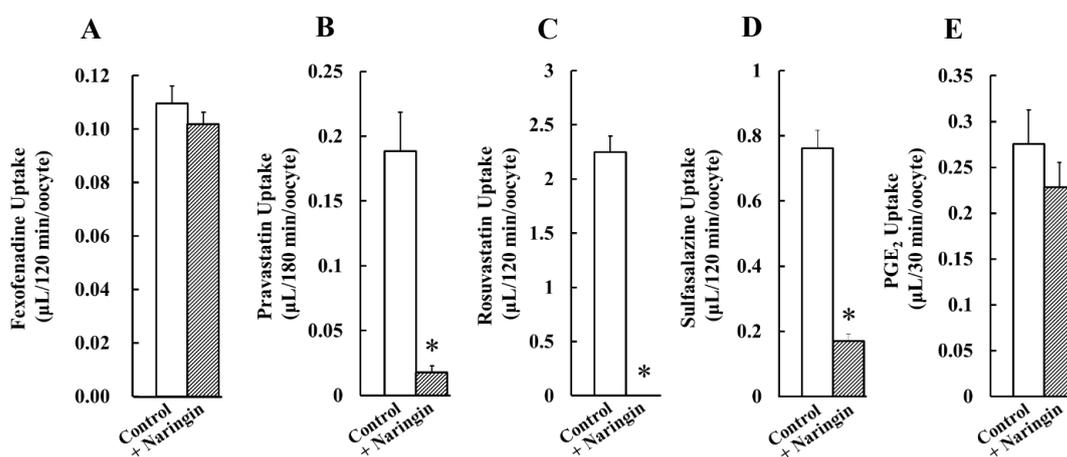


Figure 2-3-7 Inhibitory effect of naringin on fexofenadine, pravastatin, rosuvastatin, sulfasalazine, and PGE₂ transport mediated by OATP2B1.

Transport of (A) fexofenadine (1 μ M) , (B) pravastatin (1 μ M) , (C) rosuvastatin (1 μ M) , (D) sulfasalazine (1 μ M), and (E) PGE₂ (3 nM) mediated by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1

was measured at 25°C in the absence or presence of naringin (1000 μM). Uptake of fexofenadine, rosuvastatin, and sulfasalazine was measured for 120 min. Uptake of pravastatin was measured for 180 min. Uptake of PGE₂ was measured for 30 min. OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 7-8). * indicates a significant difference from the control by Student's t-test (p < 0.05).

2-3-6 OATP2B1 を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、PGE₂ 輸送に対する progesterone の影響

各基質輸送に対する naringin の阻害効果から、各基質の結合部位は naringin 感受性が異なることが明らかになった。naringin と同様に、E₁S high affinity site を活性化し、E₁S low affinity site を阻害することが示された progesterone (Figure 2-3-7) が各基質輸送に与える影響から、E₁S 結合部位と各基質結合部位の共通性を検討した。

その結果、いずれの基質においても progesterone 100 μM による有意な取り込みの変化は観察されず、各基質結合部位は E₁S と異なることが示唆された (Figure 2-3-7)。

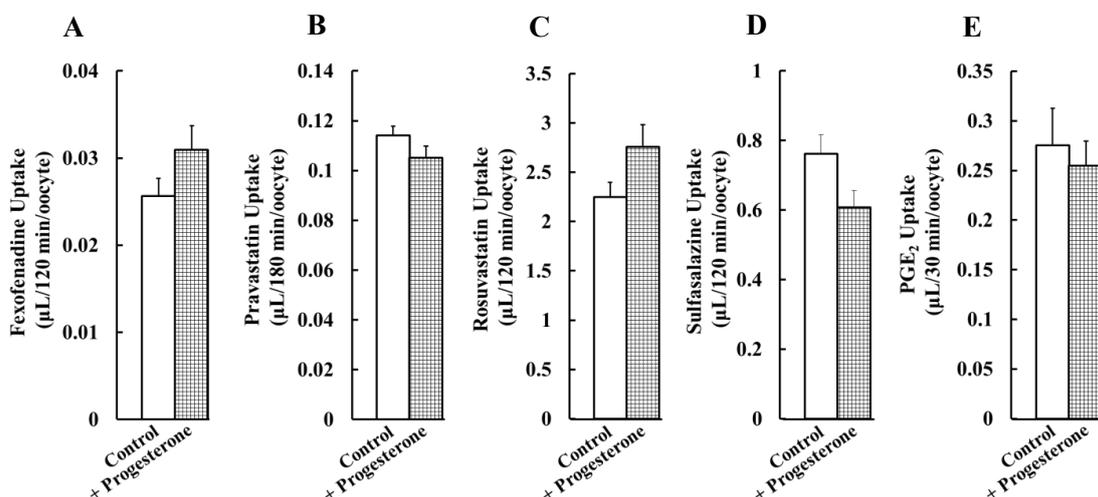


Figure 2-3-8 Effect of progesterone on fexofenadine, pravastatin, rosuvastatin, sulfasalazine, and PGE₂ transport mediated by OATP2B1.

Transport of (A) fexofenadine (1 μM), (B) pravastatin (1 μM), (C) rosuvastatin (1 μM), (D) sulfasalazine (1 μM), and (E) PGE₂ (3 nM) mediated by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1

was measured at 25°C in the absence or presence of progesterone (100 μM). Uptake of fexofenadine, rosuvastatin, and sulfasalazine was measured for 120 min. Uptake of pravastatin was measured for 180 min. Uptake of PGE₂ was measured for 30 min. OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 7-8). * indicates a significant difference from the control by Student's t-test (p < 0.05).

2-3-7 H579Q-, H618Q-, R607A-OATP2B1 各 OATP2B1 変異体を介した fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine、および PGE₂ 輸送

OATP2B1 を介した各基質輸送に対する naringin 感受性及び progesterone 感受性から、fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine 及び PGE₂ はいずれも E₁S と異なる基質結合部位を介して輸送されると考えられた。そこで、E₁S の輸送を低下させる OATP2B1 の変異体が各基質輸送に与える影響から E₁S 結合部位と各基質結合部位の輸送体上における構造的関係を推測した。E₁S 結合部位に関与することが示された H579-OATP2B1 及び H618-OATP2B1、ならびに E₁S 輸送を顕著に低下させた R607-OATP2B1 が各基質輸送に与える影響を比較するため、変異体による各基質取り込みを野生型 の輸送活性を対照とした活性変動の割合で評価した。

変異体を用いて各基質輸送を評価した結果、fexofenadine 及び PGE₂ における基質取り込みは H579Q-OATP2B1 において、野生型と比較してそれぞれ 147%、138%の取り込みが観察され、H618Q-OATP2B1 ではそれぞれ 121%、97%の取り込みであり、輸送活性の低下は見られなかった。また、E₁S の輸送が顕著に低下する R607A-OATP2B1 において、fexofenadine と PGE₂ の取り込みは、それぞれ 28.5%と 45.3%であり、輸送活性の低下を示した (Figure 2-3-8 A, E)。一方で、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine については、H579Q-OATP2B1 及び H618Q-OATP2B1 において取り込み低下が観察された (Figure 2-3-8 B, C, D)。また、R607A-OATP2B1 において pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の取り込みは、それぞれ野生型と比較して 0.233%、5.79%、7.57% であり、fexofenadine、や PGE₂ と比べて輸送活性が大きく減少した。

以上より、E₁S の輸送活性を低下させる変異体で fexofenadine 及び PGE₂ の輸送と比較して pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の輸送が低下したことから、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の結合部位が fexofenadine 及び PGE₂ の結合と比較して E₁S 結合部位と輸送体の構造上近接して存在していることが推測された。

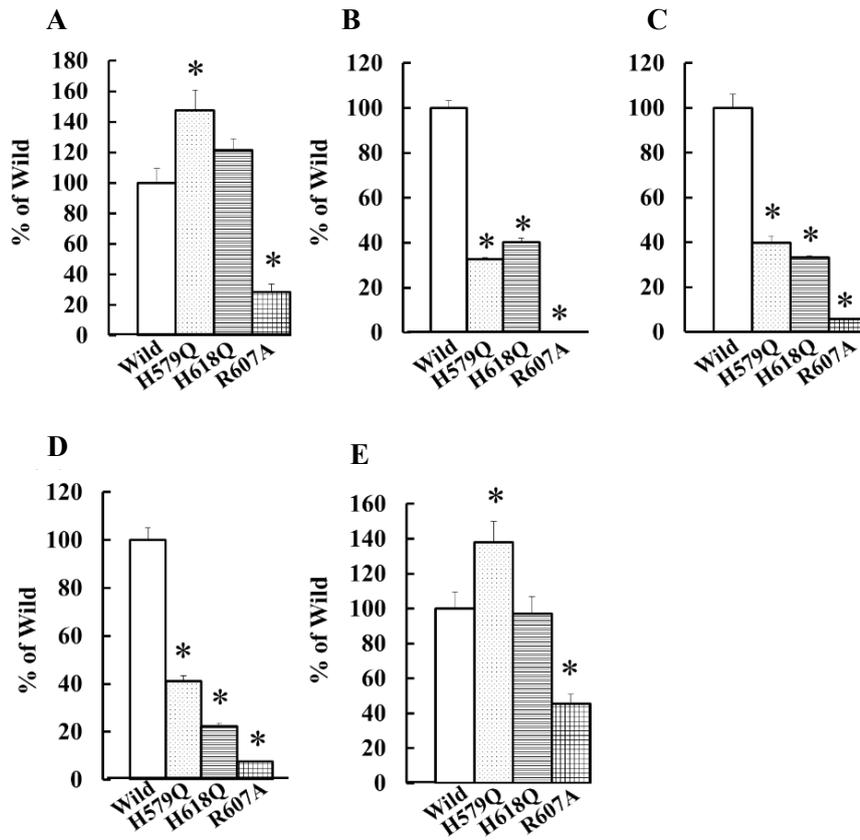


Figure 2-3-9 Effect of histidine and arginine on OATP2B1-mediated transport of fexofenadine, pravastatin, rosuvastatin, sulfasalazine, and PGE₂.

Transport of (A) fexofenadine (1 μ M), (B) pravastatin (1 μ M), (C) rosuvastatin (1 μ M), (D) sulfasalazine (1 μ M), and (E) PGE₂ (3 nM) mediated by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1 wild, H579Q, H618Q, or R607A was measured at 25°C. Uptake of fexofenadine, rosuvastatin, and sulfasalazine was measured for 120 min. Uptake of pravastatin was measured for 180 min. Uptake of PGE₂ was measured for 30 min. OATP2B1-mediated uptake was determined by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocyte. Uptake activity was expressed as % of wild, compared with oocyte expressing OATP2B1 wild. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 7-10). * indicates a significant difference from wild by Student's t-test (p < 0.05).

2-3-8 OATP2B1 の輸送活性部位予測

TopPred2 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.p>) を用いて、OATP2B1 の立体構造及び H579、H618 及び R607 の位置を予測した。予測した立体構造に存在する cavity は、基質結合部位の予測に有用であると考えられるため、TopPred2 で作製した立体構造予測を基に、q-site finder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>) を用いて OATP2B1 上に存在すると予想される cavity を推測した(Figure 2-3-9)。

OATP2B1 の立体構造を予測した結果、H579 は cavity 2 と cavity 8 を形成する C576 及び cavity 2 と cavity 10 を形成する T580 と、H618 は cavity 7 を形成する L654 と、R607 は cavity 2 を形成する F603、L606 及び I608 と 3 Å 以内の距離に位置すると推測された。水素結合が 2.8 Å で最も強く働くことを考えると、3 Å 以内にあるアミノ酸残基同士で相互作用が生じる可能性がある。したがって、H579Q-OATP2B1 では cavity 2、8 及び 10 を形成するアミノ酸残基への相互作用が変化し、H618Q-OATP2B1 では cavity 7 を形成するアミノ酸残基への相互作用が変化することで、それぞれ E₁S low affinity site 及び E₁S high affinity site の活性を低下させている可能性が考察できる。また、R607A の変異は E₁S の輸送をほぼ消失させたことから、cavity 2 を形成するアミノ酸への相互作用が変化した結果、膜貫通領域に存在する OATP2B1 基質の輸送経路に変化が生じた可能性がある。

しかし、OATP2B1 の立体構造予測の精度の低さが問題である。OATP2B1 の立体構造を予測する際に、結晶構造解析が行われている輸送体を構造予測の骨格として利用する必要がある。今回の検討では、OATP 分子種の立体構造予測を行う際に用いられる glycerol-3-phosphate transporter を骨格として使用しているが[39]、この輸送体と OATP2B1 はアミノ酸相同性が 15%程度であり、OATP2B1 の立体構造を精度良く予測出来ておらず、Figure 2-3-9 においても細胞内及び細胞外ループの立体構造を表せていない。膜タンパク質の立体構造予測の多くは X 線結晶構造解析によって行われている一方で、核磁気共鳴法 (NMR 法) や電子線回折による解析も行われているが補助的な方法に留まっている[40, 41]。そのため、X 線結晶構造解析が望まれるが、膜タンパク質の結晶を得ることは技術的に困難である。その原因として、膜タンパク質の熱安定性の問題による大量調製が困難であることや、膜タンパク質の親水性表面が少ないため結晶化が容易でないことが挙げられる。今後は、OATP2B1 を含めた膜タンパク質の立体構造予測の精度の向上、膜タンパク質の機能解析を目的とした膜タンパク質の結晶化技術の発展が期待される。

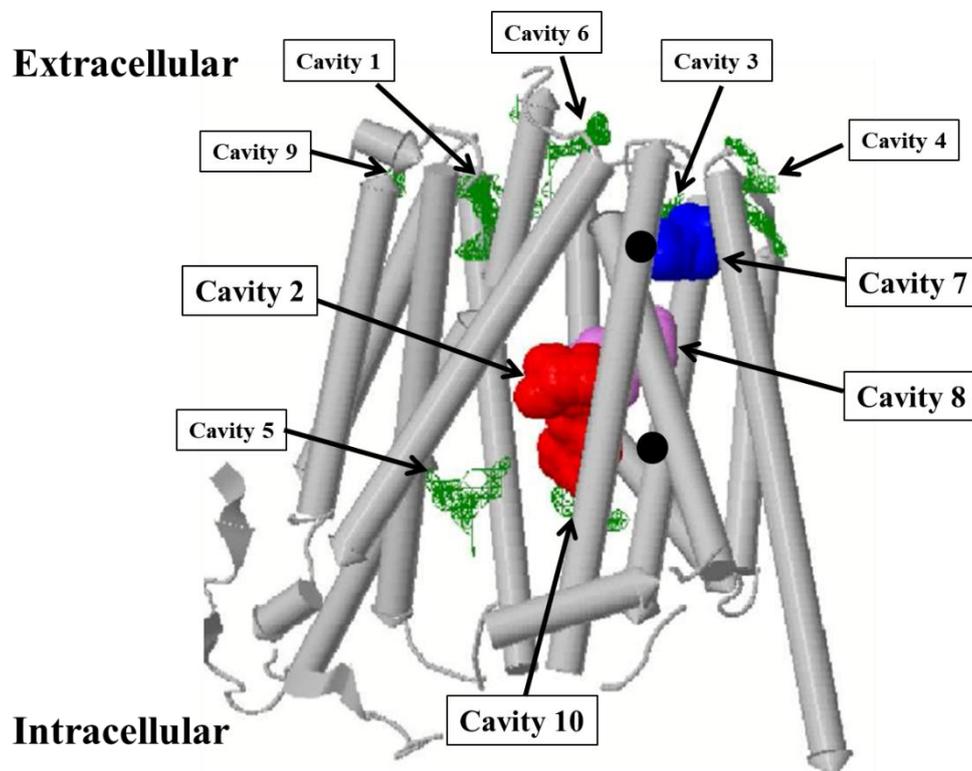


Figure 2-3-10 Predicted three-dimensional model of OATP2B1.

Predicted Three-dimensional model of OATP2B1 was made using phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi>) based on the glycerol-3-phosphate transporter. The three residues, H579, R607, and H618 are shown in this model. Based on this model, the cavities were predicted using q-site finder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>).

第四節 考察

本章では OATP2B1 上の基質結合部位が複数存在することを明確に示すことを目的とし、アミノ酸残基が OATP2B1 基質輸送に与える影響を検討した。

まず、OATP2B1 を介した E₁3S 輸送に複数の基質結合部位が関与すること、及びそれぞれの基質結合部位を評価する E₁3S 濃度を設定するため、E₁3S の濃度依存性試験を行った。E₁3S の濃度依存性試験の結果、OATP2B1 の E₁3S 輸送には二相性が観察され、二種類の K_m、V_{max} が算出されたことから、E₁3S 輸送について二つの基質結合部位の関与が考えられた。また、E₁3S 低濃度域で寄与する結合部位を high affinity site、高濃度域で寄与する結合部位を low affinity site として、E₁3S 濃度と affinity site の寄与率を算出した。E₁3S affinity site の寄与率が最大となる濃度として、E₁3S high affinity site の評価において 0.005 μM、E₁3S low affinity site に評価に 50 μM を用いることとした。

OATP2B1 の構造上に MBS が存在する可能性があることから、アミノ酸残基が基質輸送に与える影響を評価するため、アミノ酸変異体を用いて検討した。ヒスチジンの変異が E₁3S 輸送に与える影響を検討した結果、H219Q-、H519Q-及び H618Q-OATP2B1 について、野生型と比較して E₁3S 取り込みが半分以下に低下した。H219Q-OATP2B1 は E₁3S 低濃度及び高濃度における、輸送活性の低下が同程度であったため、E₁3S 結合部位ではなく oocyte における OATP2B1 発現量を減少させることや E₁3S の輸送経路に影響する可能性が考えられる。H579Q-OATP2B1 は E₁3S 低濃度における取り込みの低下に加え、E₁3S 高濃度条件ではより顕著な取り込み低下が示された。さらに、E₁3S low affinity site の機能低下が考えられる H579Q-OATP2B1 における Eadie-Hofstee plot 解析は一相性を示し、算出された K_m 値、V_{max} 値は E₁3S high affinity site に近い値であった。一方で、H618Q-OATP2B1 は E₁3S 高濃度条件よりも低濃度条件において、より顕著な取り込み低下が示された。さらに、濃度依存性試験の解析結果からも E₁3S low affinity site と同程度の K_m 値、V_{max} 値であり、E₁3S high affinity site の機能が低下していると考えられる。H579 の E₁3S low affinity site への関与、並びに H618 の E₁3S high affinity site への関与をより強く示唆するため、H579 及び H618 のいずれもグルタミンに変異させた H579Q/H618Q-OATP2B1 を用いた濃度依存性試験を行った。H579Q/H618Q-OATP2B1 では E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site の活性低下が示唆され、H579 及び H618 が E₁3S の基質結合部位への関与が支持された。以上の検討より、H579 及び H618 はそれぞれ E₁3S low affinity site 及び E₁3S high affinity site の活性に関与することが示唆された。

H579Q-及び H618Q-OATP2B1 で機能していると考えられる E₁3S high affinity site 及び E₁3S low affinity site の輸送特性を野生型と比較検討するため、各変異体の naringin 感受性及び progesterone 感受性を評価した。H579Q-OATP2B1 では E₁3S 輸送が naringin で阻害され、progesterone で促進されたことから、H579Q-OATP2B1 における E₁3S high affinity site は野生型と同様の性質であると考えられた。H618Q-OATP2B1 は E₁3S 輸送が naringin

によって阻害されず、progesterone で阻害されることを期待して検討を行った。しかし、期待とは異なり、H618Q-OATP2B1 の E₁S 取り込みは naringin 存在下で減少し、progesterone 存在下で上昇した。H618Q の E₁S low affinity site が野生型の E₁S low affinity site と異なる阻害薬感受性を示した考察として、E₁S high affinity site と E₁S low affinity site が OATP2B1 上で近接しており、H618 の変異が E₁S low affinity site の輸送特性に影響を及ぼした可能性が考えられる。また、R607A-OATP2B1 は E₁S 0.005 μM 及び 50 μM において、取り込み量は野生型の 10%以下に低下していることから、high affinity site 及び low affinity site の活性をほぼ消失していると考えられる。R607A-OATP2B1 における E₁S 輸送の顕著な低下と、R607 が膜貫通領域の中央に存在することを考えると、輸送体の基質輸送経路の形成に R607 が関与していることが考えられる。

続いて、他の OATP2B1 基質と E₁S の基質結合部位との関係性を明確にすることを目的として、fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine 及び PGE₂ の輸送に対する naringin 及び progesterone 感受性に加え OATP2B1 上のアミノ酸残基の変異が基質輸送に与える影響を検討した。

まず、各基質輸送の輸送活性部位を特定するため、各基質輸送に対する naringin 感受性及び progesterone 感受性の点から評価した。Naringin は OATP2B1 の pitavastatin 輸送及び E₁S high affinity site を阻害し、talinalolol 輸送及び E₁S low affinity site を阻害しないことが報告されており [12, 42, 43]、naringin 感受性は各基質の結合部位を特定するために有用であると考えられた。各基質輸送に対する naringin 阻害効果を検討した結果、pravastatin、rosuvastatin 及び sulfasalazine の輸送は naringin で阻害され、fexofenadine 及び PGE₂ 輸送は naringin で阻害されなかった。したがって、これらの基質は naringin 感受性の異なる基質結合部位を介した輸送であると考えられる。しかし、E₁S high affinity site は naringin 感受性であり、E₁S low affinity site は naringin 非感受性であることから、naringin 感受性からだけでは E₁S 基質結合部位と各基質の基質結合部位が異なるか、判断ができない。そこで次に、E₁S high affinity site を活性化し、E₁S low affinity site を阻害することが示された progesterone を用いて、各基質結合部位と E₁S 結合部位の共通性を検討した。Progesterone が各基質輸送に与える影響を検討した結果、いずれの基質においても有意な輸送促進効果及び輸送阻害効果は観察されなかった。各基質輸送に対する naringin 及び progesterone 効果から考えると、OATP2B1 上には E₁S と異なる基質結合部位が複数存在することが示唆された。

そこで次に、OATP2B1 上の E₁S 結合部位と各基質結合部位の輸送体上における構造的関係を E₁S の輸送を低下させる 3 種類の変異体が各基質輸送に与える影響から推測した。OATP2B1 の変異体を用いた検討の結果、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の取り込みは H579Q-OATP2B1 及び H618Q-OATP2B1 で減少し、R607A-OATP2B1 で輸送が著しく低下した。変異体を用いた検討の結果から、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine は E₁S と基質結合部位が異なるものの、輸送体上で基質結合部位が近接していると考えられる。一方で、fexofenadine 及び PGE₂ は R607A で輸送の減少が見られたものの、H579Q 及び H618Q で輸送の減少が観察されず、fexofenadine 及び PGE₂ 結合部位は E₁S

結合部位とは異なる位置に存在するが推測された(Figure 2-4-1)。

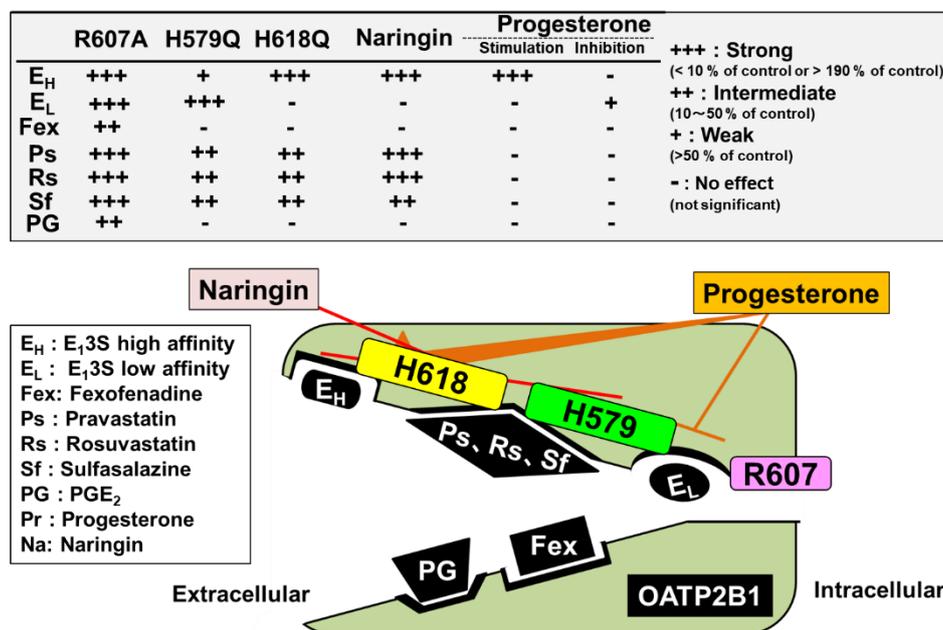


Figure 2-4-1 Hypothetical multiple binding sites on OATP2B1.

以上の検討結果から、OATP2B1 上には E₁3S と異なる基質結合部位の存在が示唆され、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazine の結合部位は E₁3S affinity site と近接して存在する一方で、fexofenadine 及び PGE₂ は E₁3S とは異なる結合部位であると推測された。OATP2B1 上に E₁3S と異なる基質結合部位の存在が示されたことから、OATP2B1 上の相互作用を評価する場合、対象基質の選択によって試験化合物の阻害効果は異なるため、単一の OATP2B1 基質に対する評価だけでは、相互作用のリスクを見落とす可能性がある。また、特性の異なる複数の基質結合部位の存在が示されたことから、OATP2B1 上で起こる相互作用を予測するためには基質結合部位の促進剤感受性および阻害剤感受性などの基質結合部位の特性を明確にすることが望まれる。

以上より、OAT2B1 には E₁3S 結合部位と異なる複数の基質結合部位が存在することが示され、薬物-食品間相互作用の多様性が OATP2B1 の複数基質結合部位に起因する仮説が支持された。現在、OATP2B1 は消化管からの薬物吸収に関与することが示唆されているが、OATP2B1 の発現は消化管に限らず、肝臓、心臓、肺など全身で見られる [44, 45]。したがって、OATP2B1 の基質輸送機構を解明することは薬物吸収性の予測に留まらず、各組織への薬物移行の理解にも繋がると考えられる。本章の成果は輸送体特性に起因する食品作用の新たな機序を提案するものであり、薬物療法ならびに医薬品開発における食品作用の適切な評価に貢献できるものと期待される。

第三章 トランスポーター遺伝子発現に与える食品ナノ粒子の影響

第一節 緒言

近年、グレープやショウガ、グレープフルーツ等の食用植物中に数百 nm 程度の粒子の存在が報告されている[20, 46-48]。植物由来 NP はベシクル様の構造を形成しており、植物由来の低分子成分や高分子成分が含んでいる[49]。グレープ由来 NP は動物試験において、小腸幹細胞への作用によって、DDS(dextran sulfate sodium)誘発性大腸炎に対する保護効果を示している[48]。一方で、グレープフルーツ由来 NP は腸管マクロファージに取り込まれ炎症性サイトカイン産生抑制に伴い、DDS 誘発性大腸炎を抑制している[50]。これらの報告より、食品由来ナノ粒子は消化管組織に対して影響を及ぼす可能性が示されている。興味深いことに、生体内で安定性及び膜透過性に乏しい核酸やタンパク質等の高分子成分が、NP を介して細胞内に移行する可能性が考えられる。エクソソームは多様な細胞から産生されるが、mRNA や miRNA、タンパク質といった高分子成分が内包されており[51]、細胞間の物質輸送に働く[52, 53]。食品由来ナノ粒子も、エクソソーム同様に多様な成分を内包しているため、消化管機能を調節しうると考えられる[54, 55]。

食品成分の中でも、果汁は薬物輸送体や薬物代謝酵素に作用する事で、薬物の消化管吸収を変動させる例が多数報告されている。果汁による薬物吸収の促進は、グレープフルーツ果汁による CYP3A4 や P-gp の活性阻害によって説明されている[56, 57]。これに加えて、グレープフルーツ果汁中の主要なフラノクマリン類である bergamottin と 6',7'-dihydroxybergamottin は CYP3A4 に対して阻害作用を有することが報告されている一方で[58, 59]、6',7'-epoxybergamottin と 6',7'-dihydroxybergamottin は P-gp の阻害作用が報告されている[60]。これまで、当研究室では AJ、OJ 及び GFJ 存在下で OATP2B1 の輸送活性が減少することを報告しており、阻害成分として naringin や hesperidin をはじめとした低分子成分の特定に至っている[61]。これに加え、ヒト試験において、りんご果汁摂取時に OATP2B1 基質薬物である Fexofenadine の血中濃度の低下することを報告しており、果汁が及ぼす OATP2B1 への作用を裏付けている[10]。一方で、AJ による OATP2B1 の機能阻害を利用することで、抗がん剤 SN-38 による消化管障害が緩和できる可能性も示している[14]。したがって、薬物間相互作用や薬物—食品相互作用の回避による医薬品の適正使用や、相互作用を応用した副作用軽減の観点から、食品による消化管輸送体の活性調節機構の解明は有益な知見と考えられる。

また、リポソームのような人工膜ベシクルは既に薬物送達に利用されており、植物由来 NP を利用した安全の高い DDS キャリアの開発が目指されている。植物由来 NP に

は食物由来の低分子成分や高分子成分が含まれていることから[49]、食品中 NP がリポソーム同様、内容物を標的組織・細胞に輸送するキャリアとして働きうると考えられる。実際に、ショウガの NP を構成するリン脂質を構成成分として、薬物を封入した膜ベシクルを作製し、既存の人工膜ベシクルと同等の薬物移行性を示すが、細胞障害性が小さいため、有用性が示唆されている[62]。このように、食品由来の安全性や製造の簡便さから DDS キャリアとしての有用性が示されているが[46, 62, 63]、天然物由来であるため実用化に向けた安定的な品質保持は今後の課題とされている。

これまで、食品が消化管吸収に及ぼす作用が数多く報告される中で、その作用は低分子成分で説明されてきた。しかし、高分子成分を内包する食品由来 NP に着目することで、高分子成分の生体内における低安定性や低膜透過性を補っていると考えられる。牛乳由来 NP はヒト消化管上皮細胞 Caco-2 細胞やラット消化管細胞に取り込まれ[64]、さらにはナノ粒子内の miRNA が Caco-2 細胞を透過することが報告されている(23)。そこで、高分子成分が植物由来 NP を介して、小腸機能の調節に働いていると仮説を立てた。その際、*in vitro* 試験における OATP2B1 に対する阻害作用や、臨床試験における OATP2B1 基質の AUC 低下を示す FJ の中でも、競合阻害とは異なる長期的な阻害効果を有するりんごを選択して、小腸輸送体に及ぼすりんご由来ナノ粒子(Apple derived nanoparticle: APNP)に着目した。したがって、第三章では、APNP が既知の低分子成分による活性阻害とは異なる機序で作用する事を示すために、りんごから回収した APNP 画分を用いて、小腸輸送体機能に及ぼす影響を評価した。また、既知の低分子成分による競合阻害と異なる遺伝子発現制御の点から、小腸輸送体に対する APNP の作用機序並びに原因成分を考察した。

第二節 実験方法

3-2-1 試薬

りんごは岩手県産ふじ(フルーツリゾート澤口, Iwate, Japan)を用いた。Anti-SLCO2B1 抗体は abcam (Cambridge, UK)より、Anti-GAPDH 抗体は Cell Signaling Technology (MA, USA) より購入した。その他の試薬は市販される特級品を用いた。

3-2-2 りんご由来ナノ粒子画分の調製

プラスチック製のすりおろし器を用いて、りんごを皮ごとすりおろした。果汁中の果肉を除くため、得られた果汁を遠心(2,000×g, 20分, 4°C)した後、上清を回収した。また、遠心後の上清を遠心(13,000×g, 70分, 4°C)した後、その上清の遠心(120,000×g, 130分, 4°C)によって得られた沈殿物を、PBS で懸濁し回収した。懸濁液中の夾雑物を除くため、13,000×で 70 分間遠心した後、上清を回収した。さらに、遠心後の上清を 120,000×g で 130 分間遠心して得られた沈殿物を、PBS によって再懸濁した溶液を APNP 画分とした。遠心機は、アングルローター (T11A21, HITACHI) を用いた himac CF15R (HITACHI)、あるいはスイングローター (P28S, HITACHI) を用いた himac CF70MX (HITACHI)を使用して遠心操作を行った。

3-2-3 NP の粒子径測定

APNP 画分中に含まれる NP の存在を示すため、Tunable resistive pulse sensing (TRPS) の原理により粒子径を測定する qNano (IZON Science Ltd.) を用いて粒子径を測定した。調製したナノ粒子画分を PBS により適当な濃度に希釈して、Nanopore NP200 を用いて測定した。測定操作は機器付属のプロトコルにしたがって行った。操作上の注意は Mass らの報告に従った[65]。

3-2-4 電子顕微鏡による APNP 画分中の APNP の観察

APNP 画分中にふくまれる NP の存在を示すため、電子顕微鏡によって粒子径及び粒子形態を観察した。グリッド(Nisshin EM, Tokyo, Japan)にりんごナノ粒子画分 10 μL を添加した後、1 分間静置した(26)。その後、余分な液体を除き、1% uranyl acetate によって染色した。撮像には、TEEM HT7700(Hitachi Hitech, Tokyo, Japan)を用いて行った[66]。

3-2-5 NP の熱・超音波処理

Atayde らや Raimondo らの報告をもとに[67, 68]、超音波処理は、氷上で APNP 画分に

対して 1 回 25 秒を 25 秒間隔で 6 回繰り返して超音波破碎することで調製した。熱処理は水浴を用いて 99°C、10 分間加熱することで調製した。

3-2-6 APNP 画分中の脂質膜及び核酸の染色

APNP の脂質膜及び内容物の核酸の蛍光標識には、それぞれ PKH26(Sigma-Aldrich)及び Exo-GLOW Exosome Labeling Kit (System Biosciences)より購入した。脂質膜の蛍光標識は、diluent C 溶液に APNP を懸濁させ、PKH26 の終濃度を 2 μ M とした混合液を 37°C で 5 分間反応させた。反応停止のため、1% BSA を加え氷上で 1 分間静置した後、未標識の蛍光色素を除くため 120,000 g で 90 分間遠心し、沈殿物を NP 画分として回収した。上清を除き、沈殿物を PBS で再懸濁した溶液を蛍光標識した APNP 画分とした。核酸の蛍光標識は、APNP 画分に Exo-GLO red 溶液を 10 分の 1 両加え、混合液を 37°C で 10 分間反応させた。反応停止のため、ExoQuick-Tc を等量加えた後、未標識の蛍光色素を除くため 120,000 g で 90 分間遠心し、沈殿物を NP 画分として回収した。上清を除き、沈殿物を PBS で再懸濁した溶液を蛍光標識した APNP 画分とした。蛍光標識 APNP を Caco-2 細胞に処置後、PBS で 2 回洗浄した後、氷冷した 4% Paraformaldehyde で固定した。さらに、Hoechst33342 で核を、WGA Alexa Fluor 477 で細胞膜を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710)で観察した。

3-2-7 細胞培養

Caco-2 細胞は理研 cell bank より提供されたものを使用した。Caco-2 細胞の培養液には 10 % fetal bovine serum (FBS)、100 U/mL benzylpenicillin、100 μ g/mL streptomycin、を含有した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、Life technologies) を用いた。輸送試験には、 1.0×10^5 cells/well の密度にてコラーゲンIでコートした 24well プレートに播種し 6 日間 CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂ : 5%) 中で培養したものを使用した。培養中は 1 日ごとに培養液を交換した。播種後 7 日目に PBS で細胞を洗浄したのち、規定濃度の APNP 画分を含む FBS 非含有の培養液を 500 μ L (10% PBS を含む) 添加し、各実験まで CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂ : 5%) 中で培養した。

PBS(-)

Chemical	Concentration
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
NaH ₂ PO ₄	7.9 mM

KH ₂ PO ₄	1.5 mM
---------------------------------	--------

0.1 % Trypsin	
---------------	--

Chemical	
----------	--

Trypsin	1.0 g
EDTA	0.2 g
PBS	1000mL

3-2-8 qRT-PCR

Caco2-細胞を培養後、PBS で 2 回洗浄し、RNAiso Plus により細胞を溶解し、RNAiso Plus 添付のプロトコルに従い RNA を抽出した。Total RNA 1 µg に対し、最終濃度 2.5 µM の Random Hexamer を加え、70°C で 7 分間反応後氷冷し、プライミングさせた。その後、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用い、Takara Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio.) を用いて 25°C で 10 分間、37°C で 120 分間、70°C で 10 分間反応させ cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として、各遺伝子に特異的なプライマーおよび SYBER green (Roche) を用い qRT-PCR 法により mRNA を定量した。測定には Mx3000P (Agilent Technologies、California USA) を用い、各遺伝子の mRNA 発現量の解析には、解析ソフト MxPro (Agilent Technologies、California USA) を用いた。

Table 3-2-1 Primer list for qRT-PCR

Primer	Sequence (5'to 3')	
	Forward	Reverse
hSLC5A1	AGACGGTGATCATGCTGGTG	AAGGTGGTGTTCATCAGA
hSLC10A2	TCGACTCTGGGAGCATCGTA	CTTTTTGGGGCCATTTGTGA
hSLC15A1	GATTCCGCCACAATGTCAAC	ATACTGCGGGATTTGCAGAG
hOATP2B1	TTCTTTATCGGCTGCTCCAG	AGGGTTAAAGCCGTCCAATG
hSLC22A4	TCGTGACCGAGTGGAAATCTG	GTACAGCCATGGTTGCGAAG
hSLC22A5	GATCTGCTTCGAACCTGGAA	TCACAAAGATGTCCCCATGC
hSLC46A1	TATCTGTGGCACCGCTTCAG	TGGGAGGTAAGGGTCTCCAC
hABCB1	ATGAAGTTGAATTAGAAAATGCAG	GGAAACTGGAGGTATACTTTCATC
hABCG2	AGCCGTGGAACCTTTGTGG	GCATCTGCCTTTGGCTTCAAT
hHPRT	TTCTTTGCTGACCTGCTGGA	CCCCTGTTGACTGGTCATTACA

Table 3-2-2 PCR reaction conditions

	Denaturation	Annealing	Extension	No. of cycles
hSLC5A1	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hSLC10A2	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hSLC15A1	95°C、4 秒		60°C、20 秒	40
hOATP2B1	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hSLC22A4	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hSLC22A5	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hSLC46A1	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40
hABCB1	95°C、6 秒	53°C、10 秒	66°C、20 秒	40
hABCG2	95°C、4 秒		62°C、20 秒	40

hHPRT の PCR 条件は各トランスポーター遺伝子の PCR 条件と同様の条件で行った。

3-2-9 SDS-PAGE と Western Blotting Analysis

Caco-2 細胞培養後、1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を含む M-PER buffer (Thermo Fisher Scientific)で cell lysate を調製した。BCA 法により、タンパク質量を測定した後 4×sample buffer を加え、SDS-PAGE サンプルとした。また以下の組成でゲルを作製した (Table 3-2-2)。

Table 3-2-3 Composition of running and stacking gel for SDS-PAGE.

	Running Gel (Acrylamide 8%)	Stacking Gel
30% Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1)	1.6 mL	300 µL
0.75 M Tris-HCl (pH 8.8)	3 mL	-
0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	1.5 µL
10% SDS	60 µL	30 µL
Water	1340 µL	1170 µL
TEMED	5 µL	2.5 µL
10% APS	50 µL	25 µL

Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にゲル板をセットし、SDS-PAGE 用 sample をコームに流し込み泳動した。OATP2B1 および GAPDH は 8% Acrylamide の running gel を用いて泳動を行った。泳動後、PVDF membrane (Immobilon, Millipore 0.45

μm) にタンク式転写装置 Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて 2 時間転写させた。2% skim milk/PBS-T で 1 時間ブロッキングした後、PVDF membrane を 2% skim milk/PBS-T で希釈した一次抗体溶液(rabbit anti-OATP2B1 antibody: 1:500, rabbit anti-human GAPDH antibody: 1:10,000) に密封し、6°Cに設定された低温室で一晩、または室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、PVDF 膜と 2% skim milk/PBS-T で希釈した二次抗体溶液 (Goat anti-rabbit IgG antibody: 1:10,000) を室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、Imunoster Zeta または Imunoster LD を用いて化学発光させ、検出した。検出されたバンドの定量的解析は Light Capture apparatus (ATTO) を用いた。

3-2-10 Caco-2 細胞への E₁3S 取り込み試験

TB で細胞を 1 回洗浄後 500 μL の TB を添加し、恒温槽を用いて 37°Cで 5 分間プレインキュベーションを行った。その後 TB を完全に除去し、37°Cに加温した³H]E₁3S 5 nM を含む TB 520 μL を添加することにより試験を開始とした。

一定時間、37°Cでインキュベーションし³H]E₁3S の取り込み反応を行った後、氷冷した TB で 2 回洗うことにより反応を停止した。取り込み停止後の細胞は 0.01% Triton X-100 を 260 μL 加えて細胞を溶解した。200 μL を 1.5 mL チューブに回収し、1 mL の Clear-sol I を加えて混和し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。また残りの溶解液から 20 μL を採取し、Bradford 法によりタンパク質濃度を測定した。³H]E₁3S の初期濃度は、取り込み試験開始直後に 20 μL を回収し、1 mL の Clear-sol I を加え放射能を測定することで求めた。

Transport Buffer (TB)

Chemical	Concentration
NaCl	110 mM
KCl	4 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 mM
MES	10.8 mM
D-mannitol	50 mM

3-2-11 データ解析

各輸送体の mRNA 発現変化は、NP 非曝露群を対照として $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法により算出した値で示した[69]。

培養細胞における放射性プローブ基質の取り込み量 ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) は、規定時間における細胞中の放射エネルギー ($\text{dpm}/\text{min}/\text{well}$) を uptake buffer 中の放射能の初期濃度 ($\text{dpm}/\mu\text{L}$) およびタンパク量 ($\text{mg protein}/\text{well}$) で除することにより算出した。

すべてのデータは $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で表記し、統計的有意差検定は、Student's t-test を用い $p < 0.05$ の場合に有意差があると判定した。

第三節 実験結果

3-3-1 APNP 画分中に含まれるナノ粒子の粒子径・形状

APNP 画分中に NP が含まれていることを示すため、粒度分布測定と電子顕微鏡による撮像の 2 点から検討した。

qNano による粒度分布測定によって、APNP 画分中には 100-400 nm の粒子が存在し、モード径は 170 nm であった(Figure 3-3-1A)。また、論文報告における植物由来 NP の粒子径と比較すると、Wang Q ら及び Wang B らの結果はモード径が 350 nm であり、Mu J らはモード径が 200 nm であることから、Mu J らの報告と近い値であった[46, 48, 70]。さらに、電子顕微鏡の画像から、画分中に 100 から 200 nm 程度のベシクル構造の粒子が観察され、qNano の結果と同様に APNP 画分中に NP の存在を示す結果であった(Figure 3-3-1B)。また、部分的に窪んだ形状が認められ、これは Wang B らのグレープフルーツ由来 NP と似た特徴を表している。以上より、超遠心法で回収した画分中に APNP が存在すると判断した。

さらに、NP を破壊する方法として、熱処理点及び超音波処理が利用されているが[67, 68]、これらの処理における NP に対する影響を qNano による粒度分布から評価した。熱処理あるいは超音波処理によって、未処理の APNP 画分と比較して、10 分の 1 以下の粒子数であった(Figure 3-3-1C, D)。この結果から、超音波処理及び熱処理によって NP が破壊されていると判断し、NP が破壊された画分として、以降の検討に用いた。一方で、市販の濃縮還元ジュース(Tropicana)を使用した APNP 画分には粒子が検出されなかった。

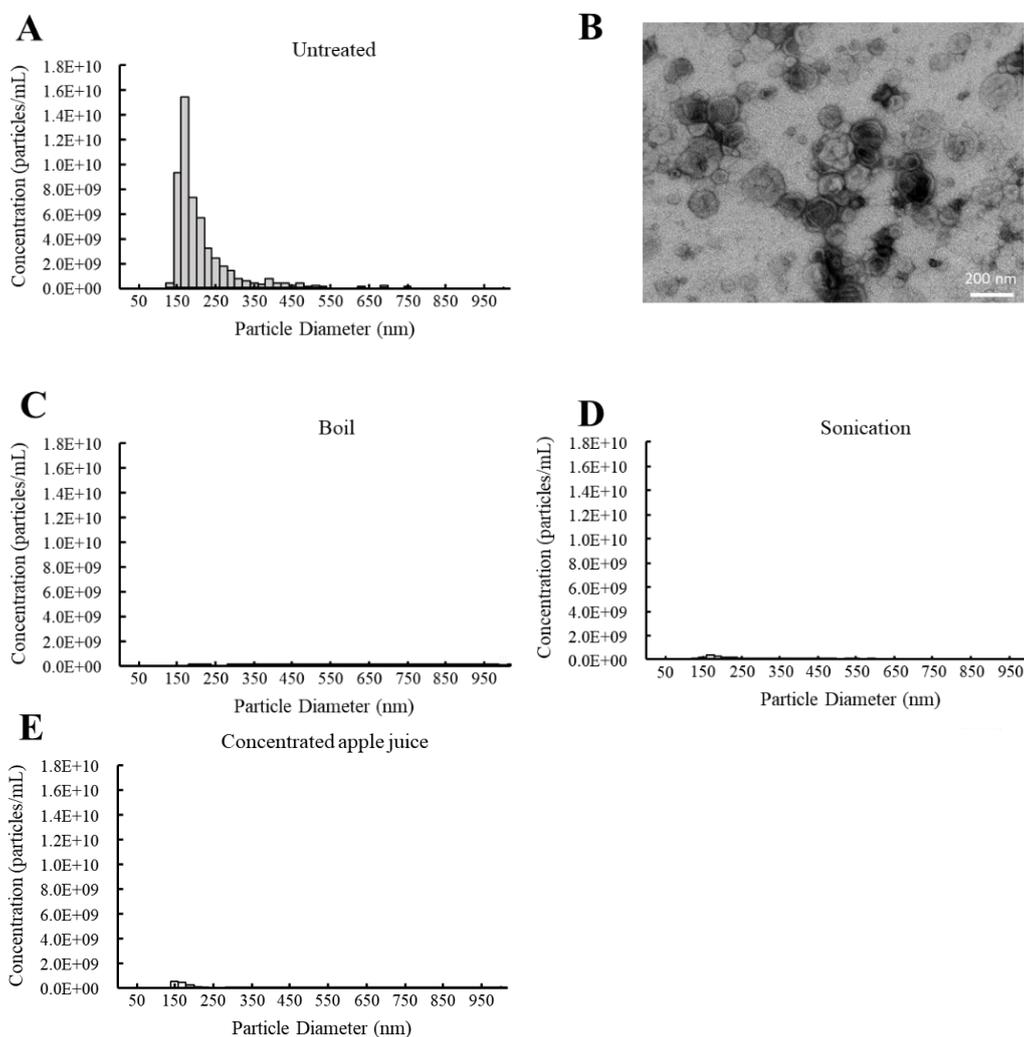


Figure 3-3-1 APNP size distribution and electron microscopy image.

The size distributions of the APNP fraction (A), sonicated fraction (C), boiled fraction (D), and concentrated apple juice (E) were analyzed by tunable resistive pulse sensing (qNano). The concentration of the APNP fraction was 4 $\mu\text{g/mL}$ (100% squeezed fruit juice). The concentration of particles was standardized using multipressure calibration with 200 nm particles at a concentration of 1×10^{12} particles/mL. NP size and vesicle formation were also evaluated by electron microscopy (B). The scale bar indicates 200 nm.

3-3-2 Caco-2 細胞への APNP の取り込み

APNP が Caco-2 細胞に取り込まれることを明らかにするため、蛍光標識した APNP 画分を Caco-2 細胞に処置することで、Caco-2 細胞内への APNP 取り込みを顕微鏡観察から評価した。

まず、脂質膜の蛍光標識に使用した PKH26 による、APNP の構造に及ぼす影響を評価するため、qNano を用いて粒子径を測定した。蛍光標識した APNP 画分の粒度分布及び粒子数は、非標識画分と同程度であった。したがって、蛍光標識操作による APNP の構造的変化は小さいと考え、以降の検討で用いることとした(Figure 3-3-2A)。

APNP を含まない PBS を用いて同様の蛍光標識操作を行ったサンプルを対照として、蛍光標識 APNP 画分の Caco-2 細胞内への移行を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。蛍光標識した APNP 画分において、PKH26 由来の赤色蛍光が、細胞膜を染色した緑色蛍光の内側に認められることから、APNP が Caco-2 細胞内に取り込まれていると考えられる(Figure 3-3-2C)。一方、蛍光標識操作を行った PBS を Caco-2 細胞に添加した場合には、赤色蛍光が認められず、Caco-2 細胞において蛍光標識 APNP 画分を処置した時の観測結果は非特異的な赤色蛍光ではないことが示唆されている(Figure 3-3-2B)。

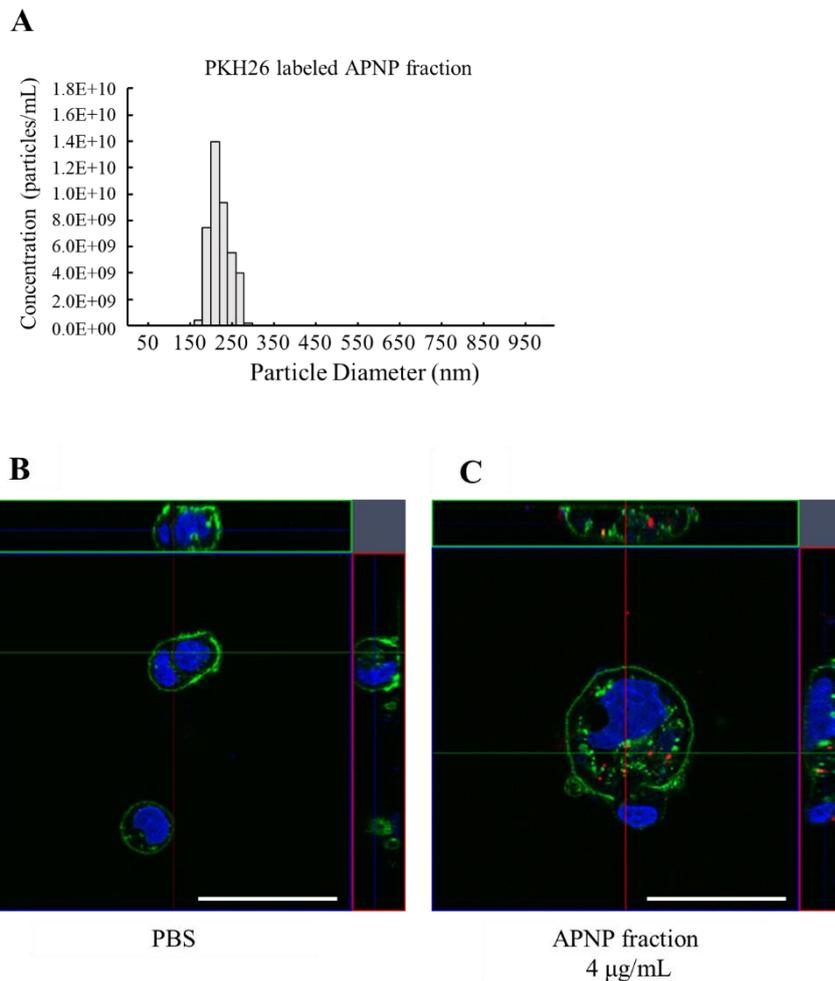


Figure 3-3-2 Uptake of APNPs by Caco-2 cells.

The size distributions of APNP fraction labeled by PKH26 (A) were analyzed by tunable resistive pulse sensing (qNano). Caco-2 cells were incubated with PKH26 (red)-labeled NP fraction (B) and PBS (C) for 6 h at 37°C. Nuclei and cell membrane were labeled with Hoechst 33342 (blue) and Alexa-Fluor-488-conjugated WGA (green), respectively. Uptake of PKH26-labeled NPs was examined by confocal microscopy. The scale bar indicates 50 μm .

3-3-3 Caco-2 細胞における輸送体遺伝子の発現に対する APNP の影響

APNP が消化管輸送体に及ぼす影響について Caco-2 細胞を用いて検討した。消化管に発現する輸送体 9 遺伝子の中、APNP 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処置条件下で、OATP2B1、ASBT、OCTN2 は mRNA 発現が有意に減少した(Figure 3-3-3)。一方、同条件において、BCRP は有意に増加した。本研究では、最も mRNA 発現量の変化の大きかった OATP2B1 に対する APNP の影響について、さらに検討を進めた。

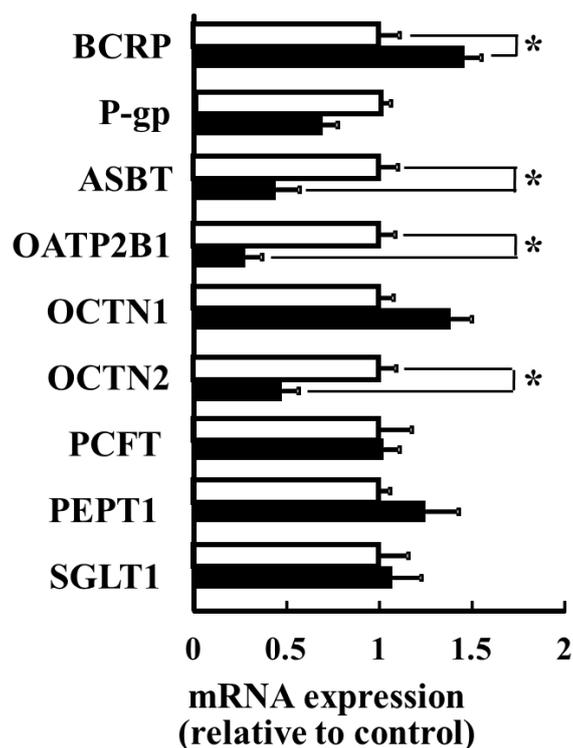


Figure 3-3-3 Effect of APNPs on mRNA expression of intestinal transporter in Caco-2 cells. Expression of ABC (P-gp, BCRP) and SLC (SGLT1, PEPT1, OCTN1, PCFT, ASBT, OATP2B1, OCTN2, OATP2B1, PCFT) transporter mRNAs in Caco-2 cells was measured by qRT-PCR. Caco-2 cells were cultured in medium for 24 h with (closed column) or without (open column) the APNP fraction at 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Each bar represents the mean \pm SEM ($n = 3$). * indicates a significant difference from the control ($P < 0.05$).

3-3-4 OATP2B1 mRNA 発現に対する APNP の影響

Figure 3-3-3 の結果に加えて、OATP2B1 が薬物吸収に関与する因子であり、これまでりんご果汁による作用を示してきた背景から、OATP2B1 を対象として、より詳細な検討を行った。

APNP 画分による OATP2B1 mRNA 発現低下をより裏付けるために、APNP 濃度依存的な mRNA 発現の変化を評価した。APNP 濃度依存的に OATP2B1 の mRNA 発現量は低下した。さらに、APNP 処置時間を比較したところ、24 時間処置と比較して 48 時間処置において、より大きな mRNA 発現低下が見られた(Figure 3-3-4A)。これにより、APNP による OATP2B1 mRNA 発現低下は濃度依存的及び時間依存的な作用であることが示された。さらに、熱処理あるいは超音波処理によって NP が破壊された画分では、OATP2B1 発現低下は観察されなかった(Figure 3-3-4B)。これにより、画分中の APNP が OATP2B1 発現抑制に寄与していることが示唆された。

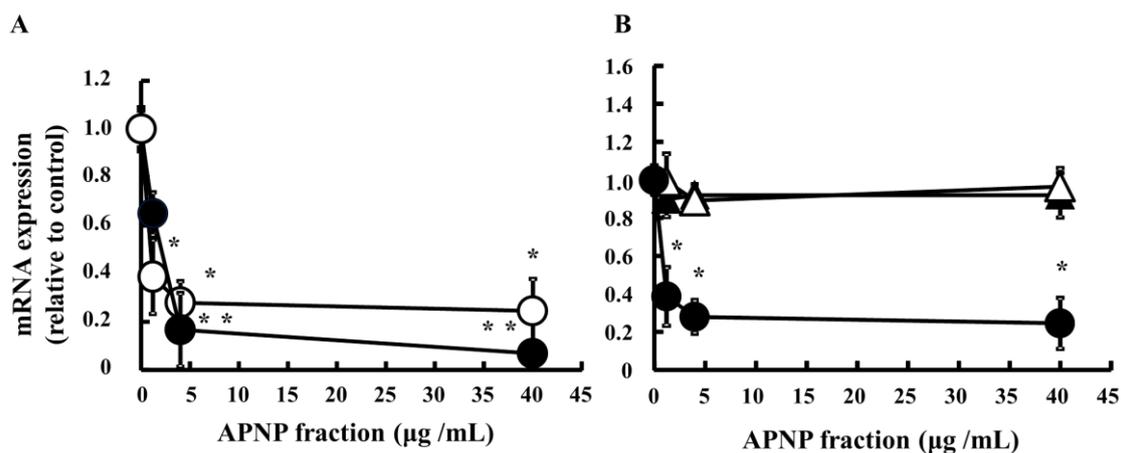


Figure 3-3-4 Effect of APNPs on OATP2B1 mRNA expression in Caco-2 cells.

mRNA expression of OATP2B1 in Caco-2 cells was measured by qRT-PCR. (A) Caco-2 cells were cultured in medium for 24 (open circles) or 48 h (closed circles) with APNP fractions. (B) For disruption of APNPs, the NP fraction was boiled or sonicated. Caco-2 cells were cultured in medium for 24 h with an untreated (closed circles), boiled (open triangles), or sonicated APNP fraction (closed triangles). Each bar represents the mean \pm SEM (n = 3). * indicates a significant difference from the control (P < 0.05).

3-3-5 OATP2B1 のタンパク質発現量及び輸送活性に対する APNP の影響

続いて、APNP による OATP2B1 mRNA 発現低下が、OATP2B1 の機能低下にまで影響を及ぼすかどうかを調べるため、タンパク質発現量及び輸送活性を評価した。

mRNA 発現量の変化が最も大きかった APNP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処置条件下で、OATP2B1 タンパク質発現量を Western blotting で、輸送活性を E_1S の取り込み量で評価した。APNP 処置によって、OATP2B1 タンパク質発現量は有意に低下した(Figure 3-3-5A and B)。また、APNP 処置によって、Caco-2 細胞の E_1S 取り込み量が低下していることから、OATP2B1 の輸送活性の低下が示唆された(Figure 3-3-5C)。これらの結果は、APNP による OATP2B1 mRNA 発現量の低下によるものと考えられる。

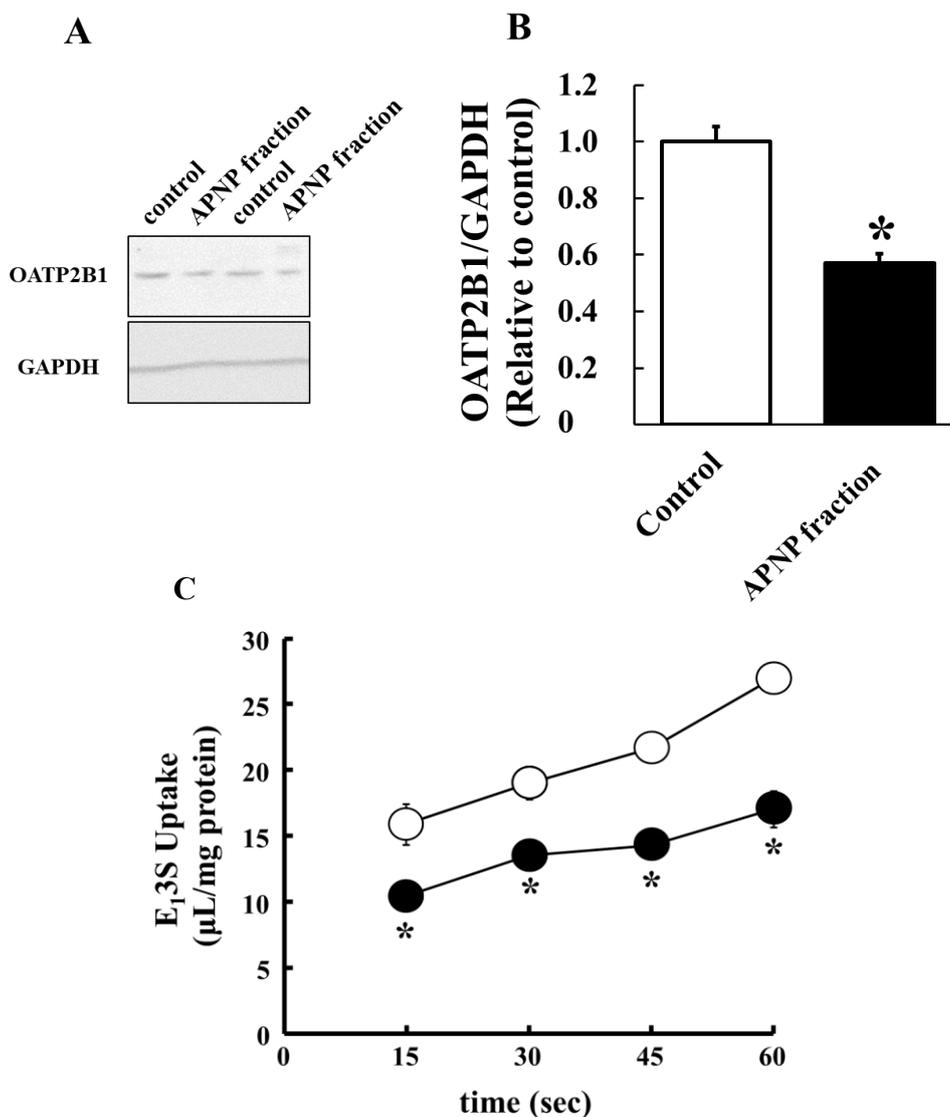


Figure 3-3-5 Effect of APNPs on protein expression and activity of OATP2B1 in Caco-2 cells.

(A, B) Western blot analysis of OATP2B1 protein expression in Caco-2 cells after 48 h treatment with (closed column) or without (open column) APNP fraction at 40 µg/mL. Each bar represents the mean ± SEM (n = 5). * indicates a significant difference from the control (P < 0.05). (C) Uptake of E₁S was measured for 15, 30, 45, and 60 sec at 37°C and pH 6.5. Caco-2 cells were cultured in medium with (closed circle) or without (open circle) the APNP fraction. Each result represents the mean ± SEM (n = 4). * indicates a significant difference from the control (P < 0.05).

3-3-6 APNP 画分中に存在する低分子の影響

以上の OATP2B1 に対する APNP の効果に対する、低分子成分の影響を評価するため、APNP 画分中の低分子成分濃度を測定した。測定化合物は OATP2B1 に対して阻害効果を有する 10 分子を対象として行った[61]。

APNP 画分に含まれる低分子濃度と比較するため、以前当研究室で測定したりんご果汁中の低分子成分濃度と比較した(Table 3-3-1)。APNP 画分に含まれる低分子は全て、LC-MS/MS の定量下限である 1 nM あるいは 0.5 nM 以下であり、APNP 画分中の低分子成分濃度は AJ と比較して顕著に低く、総じて低分子成分は低濃度と考えられる。また、対象低分子の OATP2B1 に対する IC₅₀ と比較すると、APNP 画分中の低分子濃度は IC₅₀ の 1000 分の 1 以下であり、これら低分子による競合阻害の影響はほとんど見られない濃度であると考えられる。そのため、APNP 画分の作用は、これまで報告してきた低分子による阻害作用とは異なる機序によるものと考えられる。

Table 3-3-1 Concentrations of various components in APNP fraction.

	C (µM)		
	APNP fraction	Apple juice	IC ₅₀ (µM)
Naringin	<0.0005	0.00150 ± 0.00010	4.63 ± 1.19
Naringenin	<0.0005	0.000850 ± 0.000100	49.2 ± 7.6
Hesperidin	<0.0005	0.247 ± 0.003	1.92 ± 0.28
Hesperetin	<0.0005	1.39 ± 0.02	67.6 ± 29.5
Phloridzin	<0.0005	16.8 ± 0.5	23.2 ± 4.0

Phloretin	<0.0005	0.233 ± 0.010	1.31 ± 0.16
Quercetin	<0.001	0.464 ± 0.016	9.47 ± 4.31
Kaemferol	<0.001	0.0324 ± 0.0048	21.3 ± 8.6
Bergamottin	<0.0005	0.0246 ± 0.0046	N.D.
6', 7'-Dihydroxy bergamottin	<0.0005	0.0701 ± 0.0480	N.D.

[C], concentration of components in 4 µg/mL of APNP: N.D., not determined.

Concentration of components of apple juice and IC₅₀ value for OATP2B1 were obtained from previously study[61]. Data are shown as means ± SEM (n = 3).

3-3-7 低 pH における APNP の安定性

OATP2B1 の発現する小腸上皮細胞まで APNP が到達するためには、唾液や胃液、腸液に含まれる消化酵素や pH 条件を乗り越えなければならない。消化管に特有な酸性 pH に対する APNP の安定性を、粒子数の変化から評価した。

胃内を想定した pH1 の溶液中 APNP を加えた 1 時間後、粒子数を qNano で測定した。pH7.4 と比較して全粒子数は 16.5%減少したが、粒度分布の顕著な変化は見られなかった。他の食品由来 NP が消化管組織に作用する報告も考慮すると、APNP は経口投与後も一定割合で携帯を維持し消化管組織内に到達することが期待できる。

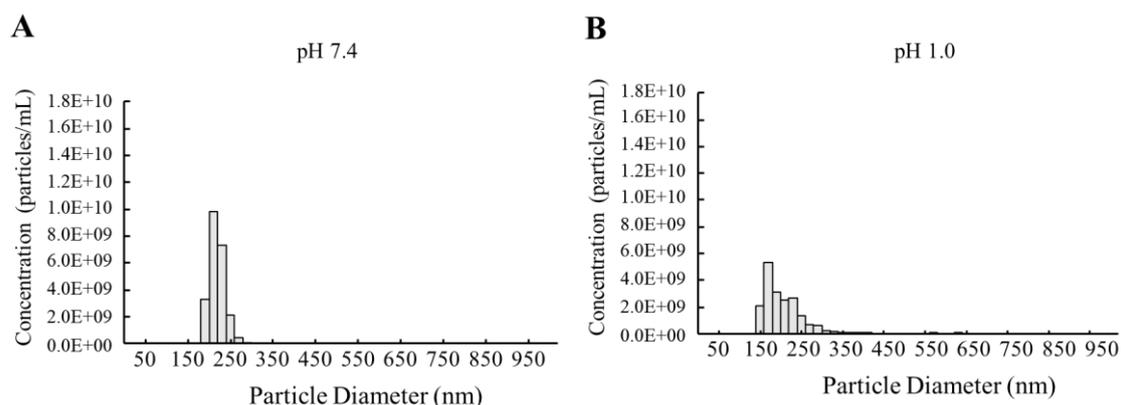


Figure 3-3-6 Size distribution of particles in APNP fraction after incubation at acidic pH. The size distributions of APNP fraction after incubation for 60 min at pH 7.4 (A) and pH 1.0 were analyzed by tunable resistive pulse sensing (qNano). The concentrations of APNP fraction were 4 µg/mL (100% squeezed fruit juice). The concentration of particles was standardized using multi-

pressure calibration with 200 nm particles at a concentration of 1×10^{12} particles/mL.

第四節 考察

本章では、小腸輸送体 OATP2B1 に対する阻害効果が *in vitro* 試験で示されており、臨床試験においても OATP2B1 基質の AUC 低下によって、OATP2B1 への作用が示唆されているりんごに着目して、APNP が小腸輸送体の機能を調節する一因となっていることを示すことを目的に、検討を行った。

まず、超遠心法を用いて、りんごから NP 画分を回収し、粒子径測定と電子顕微鏡を用いて粒子の存在と形状を確認した。qNano による粒子径測定の結果と電子顕微鏡の観察から、100 から 400nm の粒子の存在が観察された。論文報告で使用されていた熱処理や超音波処理によって、APNP 画分中の粒子数が減少していることから NP が破壊されていると考えられる[67,68]。しかし、牛乳に含まれるエクソソーム及び miRNA の破壊を目的に、超音波処理を行っている論文報告では、90 分の超音波処理によって牛乳中のエクソソーム量及び miRNA が低下している[71]。論文報告と比較して、本検討の超音波処理は計 1 分 30 秒と短時間ではあるが、APNP の内容物への影響も否定できない。また、粒度分布が近い形で全粒子数の減少が認められたことから、超音波処理によって粒子が凝集したため、粒子数が低く見積もられたわけではないと考えられる。しかし、qNano の測定範囲が 1000 nm 程度までであることから、測定範囲以上のサイズに凝集している可能性もある。また、市販の濃縮還元 AJ を使用した画分では粒子が検出されなかったことから、これまで当研究室で報告してきた AJ の作用は、APNP によるものではないと考えられる。一方で、本検討では、APNP の回収方法として簡便な超遠心法を選択した。りんごは食物繊維が豊富なため、120,000×g の遠心で得られた画分は食物繊維と思われる茶色の沈殿が多量に観察された。そのため、論文報告より[72, 73]、120,000×g で回収した画分に対して 13,000×g の遠心操作を行い、さらに 120,000×g の遠心で回収することで、りんご中の食物繊維が除かれていると考え、前述した操作方法で行った。しかし、論文報告では、より夾雑物の少ないスクロースクッション法や密度勾配遠心法による回収操作で行っているものも多く、NP の最適な回収方法については未だ議論されている[74, 75]。APNP に含まれる低分子成分として、OATP2B1 に阻害作用を示す 10 化合物を LC-MS/MS で定量したところ、いずれも検出限界以下であり、AJ と比較して極めて低濃度であった。また、これらの濃度を OATP2B1 に対する IC₅₀ と比較するといずれも 1000 分の 1 以下であるため、OATP2B1 に対する APNP の作用は低分子による競合阻害では説明できない。しかし、他の成分に関して評価しておらず、APNP 以外の影響をより小さくするためにも、NP の回収方法の最適化が課題と考えられる。

蛍光標識した APNP 画分を Caco-2 細胞に処置することで、細胞内への APNP の移行

が観察された。共焦点レーザー顕微鏡の観察から、細胞膜由来の蛍光の内側に APNP の存在が認められているため、細胞表面への付着ではない。しかし、定性的な評価であり、細胞内に取り込まれた APNP 量を定量的に評価はできていない。より定量的な評価として、蛍光標識した NP を用いた FACS 解析やプレートリーダーによる蛍光測定による報告がされている[76, 77]。植物由来 NP の細胞内移行メカニズムは膜動輸送と考えられており、NP の細胞内移行に対する各種エンドサイトーシス阻害剤の影響によって報告されている。グレープフルーツ由来 NP において、ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞に対してはファゴサイトーシスやクラスリン介在性エンドサイトーシス機構が示唆されている一方[78]、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に対してはマクロピノサイトーシスやクラスリン介在性エンドサイトーシス機構の関与が示唆されている[46]。このように、同じ植物種由来 NP であっても、対象細胞依存的に NP の移行量及び移行機構が異なる可能性が考えられる。このような膜動輸送が生じるためには、NP と細胞の接触が起点となるため、NP 表面に発現する膜タンパク質と対象細胞表面の膜タンパク質の相互作用の関与が考えられる。実際に、がん細胞由来のエクソソームにおいては、細胞接着因子である integrin が移行細胞の選択性に寄与することが報告されている[79]。さらに、がん細胞由来のエクソソームはプロテオーム解析の結果、CD24 や CD63、CD91 等の膜タンパク質がマーカー分子として報告されている[80-82]。植物由来 NP についても、プロテオーム解析やリポドミクス解析が行われているが、対象は特定の植物種に限られており、りんごでの報告はない。がん細胞由来エクソソームのように、植物由来 NP のマーカー分子を特定することで、抗体や磁気ビーズを用いた精製法等の抽出方法が利用可能となり[83]、純度の高い APNP を得ることが可能になると考えられる。また、本研究では、BCA 法によるタンパク質定量の結果を基に APNP 濃度の条件設定を行っているため、必ずしも APNP の量が反映されておらず、マーカー分子が解明されれば ELISA 法等による定量によって、実験間で生じる APNP 量の誤差を小さくすることが期待できる。そのため、APNP のマーカー分子の解明は、NP の細胞移行機序の理解に留まらず、再現性の良い実験のためにも有益な情報となり得る。

また、消化管組織は多種の細胞で構成されているが、取り込まれた NP 量を定量的に評価することで、消化管細胞種間の APNP 移行性の比較が可能となる。消化管細胞はそれぞれが特異的な機能を有しており、小腸機能の維持には欠かせないことから、APNP の小腸機能への影響をより深く理解するためには、NP が移行する細胞種の特定が重要である。論文報告ではグレープ由来 NP は小腸幹細胞に[48]、グレープフルーツ由来 NP は小腸マクロファージに集積することから[50]、食品間によっても、取り込まれやすい

細胞種は異なる可能性がある。消化管細胞種間で APNP の取り込み量を定量的に比較することで、APNP 移行にも細胞選択性が存在する場合、細胞選択性を活かした遺伝子発現制御として有用である。ショウガ由来 NP はその脂質膜を利用して薬物を内包することで、リポソームのような DDS キャリアとしての研究が進められている[62, 84, 85]。そのため、食品由来 NP の DDS への応用として、NP の細胞移行性の定量的な評価及び細胞移行機序の解明が望まれる。

APNP による消化管輸送体に対する mRNA 発現変動の評価によって、OATP2B1、ASBT、OCTN2 は有意な発現低下、BCRP は有意な発現上昇が認められた。この変化が APNP による影響であることをより強く示すため、OATP2B1 を対象に APNP 濃度依存性及び処置時間依存性を評価した。APNP 濃度及び処置時間の増加に伴い、OATP2B1 の発現低下率は大きくなったことから、APNP の作用であることが示唆された。また、前述したように、OATP2B1 に対して阻害作用を有する 10 化合物の APNP 中濃度を測定したところ、いずれも検出限界(1 nM あるいは 0.5 nM)以下であり、APNP 画分中の低分子濃度は極めて低いと考えられる。また、OATP2B1 に対する IC₅₀ と比較すると APNP 画分中の低分子濃度は IC₅₀ と比較して 1000 分の 1 以下であり、APNP の作用は低分子による競合阻害が原因ではない。また、APNP は OATP2B1 のタンパク質発現量及び輸送活性も低下させた。これは、APNP による OATP2B1 mRNA の低下によるものと考えられる。

食品由来 NP の小腸組織に対する作用を示す上で、消化管内での安定性について考察する必要がある。APNP の消化管管腔内における安定性の評価のひとつとして、低 pH 条件下における粒子数の変動を評価した。胃内を模した pH 1 の溶液中で 1 時間放置した後、APNP 画分中の粒子数を計測したところ 87.5%が保持されており、粒度分布にも顕著な変化はなかったため、低 pH 条件下の消化管内で粒子形状を保持されて小腸上皮まで到達する可能性は見込まれる。しかし、論文報告では、小腸上皮に到達するまでに暴露される唾液や胃液、腸液を模した溶液を使用しており[86, 87]、今回検討では pH 条件の影響に留まるため、より消化管内に近い環境下で APNP の安定性を評価する必要がある。論文報告では、マウスに経口投与した食品由来 NP が小腸組織内に存在する事が報告されているため[20]、APNP も生体内環境において、論文報告同様に小腸組織に到達すると期待できる。

以上、第三章では、りんごに含まれる APNP が小腸輸送体の遺伝子発現抑制に関与する可能性を新たに見出した。また、OATP2B1 を対象とした結果から、APNP は mRNA 発現低下に起因して、タンパク質発現量及び輸送活性の低下を示したと考えられる。食

品中 NP には、高分子成分だけではなく低分子成分も含め多様な成分が含まれていることから、遺伝子発現抑制の原因成分の特定と作用機序の解明によって、薬物食品間相互作用の発現機構の理解が進むことが期待される。しかし、本検討における NP 回収方法では、高質量のタンパク質や、タンパク質の凝集体が混入している可能性が否定できず、APNP の調製方法の最適化と共に、NP の作用について慎重に検討をしていく必要がある。また、食品由来 NP が DDS キャリアとしての研究も進んでいることから、APNP のリポドミクス解析やプロテオーム解析による NP の特徴から、食品由来 DDS キャリアに応用されることが期待される。

第四章 Apple マイクロ RNA による OATP2B1 の遺伝子発現調節作用

第一節 緒言

第三章では、APNP による OATP2B1 の遺伝子発現変動を示唆することができた。本章では、OATP2B1 遺伝子発現調節作用をもたらす原因成分の同定と、作用機序の解明を目指した。本研究では、新しい食品作用機構となる食品高分子に着目し、中でも特に、マイクロ RNA(miRNA)の可能性について検討を行った。

食品由来 NP には、mRNA や miRNA、タンパク質等の高分子成分が内包されている事報告されていることから、それら高分子成分が消化管組織に作用している可能性が考えられる。高分子成分の中でも、特に食品由来の miRNA がヒトの遺伝子発現を調節する可能性を示す報告がされている[21, 88]。一方、食品由来 miRNA がヒト血中で検出されないことや、動物試験において組織中や血中で検出されないことや[89, 90]、コンタミネーションなど実験手法の問題点から[91]、食品由来 miRNA 由来 miRNA の作用に対して否定的な報告も存在する。しかし、食品由来ナノ粒子中に miRNA の存在が認められることや[48]、食品由来 NP に含まれる miRNA が Caco-2 細胞に移行する報告もあり[92]、食品由来 miRNA がヒト遺伝発現を調節するか否かはいまだ議論が続いているのが現状である。そこで食事成分の暴露量が高い消化管組織に対してならば、食品由来 NP を介した miRNA 量も多いと予想されるため、その作用を評価しやすいと考えた。

miRNA は、20-25 塩基の一本鎖 RNA であり、標的遺伝子の発現制御に関与する[93]。miRNA は細胞質中において、Dicer や Argonaute 2 (Ago2)、tar-RNA-binding protein (TRBP) 等で構成される RNA induced silencing complex (RISC)と複合体を形成して機能する[94]。miRNA が標的 mRNA の主に 3'非翻訳領域 (untranslated region: UTR)に結合することで、翻訳抑制や RNA の分解を引き起こす[95]。miRNA は、細胞の分化や増殖、細胞死等の生命現象の調節に寄与している[96]。ヒトにおいては、輸送体や代謝酵素、転写因子等を制御する miRNA が多数報告されている。小腸輸送体に着目すると、排泄輸送体 BCRP は miR-328 によって制御され[97]、ペプチド輸送体 PEPT1 は miR-92b により制御されることが報告されている[98]。当研究室においても、OATP2B1 が miR-24 の発現制御に関わることを示している。ヒト miRNA による輸送体の発現制御は研究が進んでいるが、植物 miRNA による発現制御の例はない。

一方、植物においても miRNA は発達や分化の制御、栄養応答などの幅広い生理機能の制御にはたらく[99]。また、植物 miRNA は Hua Enhancer 1 (HEN1)によって 3'末端がメチル化修飾を受けるが、動物 miRNA の多くはメチル化修飾を受けないことから、メチル化修飾の有無で区別される[100]。前述した Ago は RNase 様の活性部位を持ち、

miRNA と相補的に結合した mRNA の分解を引き起こす。しかし、miRNA と標的 mRNA の結合の際に、ミスマッチが存在する場合は標的 mRNA の切断を生じない[101]。動物の場合、miRNA の配列が広範囲で標的 mRNA と相互作用することは少なく、多くは miRNA の 5'側から 2-8 番目の配列であるシード配列が相補的に結合する[102]。また、miRNA の標的部位は主に 3'UTR であるため[103]、標的 mRNA に作用する miRNA を予測する際は、miRNA のシード配列と標的 mRNA の 3'UTR 配列間の相補的な結合性を解析して検討した報告が多い。動物の場合、miRNA と標的 mRNA とのミスマッチが多いことから、その主な作用機序は mRNA の分解よりも、標的 mRNA の翻訳抑制が主だと考えられている。一方で、植物 miRNA の場合、標的 mRNA とのミスマッチが少ないため、主要な作用機序は mRNA の分解だと考えられている。しかし、これはあくまで動物 miRNA と動物 mRNA 間、あるいは植物 miRNA と植物 mRNA 間の関係性であり、本研究で想定している異種間相互作用においての特徴は明確になっていない。第三章の結果によると、OATP2B1 の遺伝子発現に対してタンパク質発現量と同様に、mRNA 発現量も低下していることから、APNP の作用は植物 miRNA 様の作用と考察され、植物 miRNA の関与の可能性があると考えている。

以上より、OATP2B1 を対象に植物 miRNA のヒト遺伝子発現制御を示すことは、種を越えた遺伝子発現制御の可能性を示すことになり、興味深い対象と言える。また、小腸輸送体に対する食品作用、更には薬物-食品間相互作用において全く新しい概念の提唱につながる。そこで、NP に含まれる食品由来 miRNA が消化管組織の遺伝子発現制御に関与していると仮説を立てて、第三章で示された APNP による OATP2B1 発現抑制における apple miRNA の関与、及び原因 miRNA の同定を目的として検討した。

第二節 実験方法

4-2-1 pRL-TK/OATP2B1 の作製

pRL-TK のウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) の代わりに OATP2B1 を組み込んだプラスミド DNA (以下、pRL-TK/OATP2B1) は以下の方法で構築した。

挿入する DNA は、挿入する制限酵素サイトから 15 塩基対が末端に付加されたプライマーを用いて、PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いて PCR を行うことで調製した。反応は、熱変性 (98°C、10 秒)、アニーリング (56°C、5 秒)、伸長 (72°C、15 秒) を 35 サイクル行った。鋳型とする DNA もしくは cDNA は Caco-2 細胞から調整した。この PCR 産物を、電気泳動した後に目的の DNA 断片が含まれる部分を切り出した。NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio) を用い、アガロースゲルから DNA を抽出した。pRL-TK は Nhe I と Xba I を用いて制限酵素処理 (37°C、6 時間) を行い、Rluc をコードする DNA を除去し直鎖状 DNA とした。その後、上記同様に電気泳動の後、アガロースゲルから DNA を抽出した。抽出した直鎖状 pRL-TK と PCR 産物を用いて In-Fusion HD Cloning Kit によって、pRL-TK/OATP2B1 を構築した。

Table 4-2-1 Primer list for pRL-TK/OATP2B1 PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
SLCO2B1 pRL-TK F-1 Nhe I 5'UTR	CTCACTATAGGCTAGCAAAAGGACAGGCTGAGGCTGA
SLCO2B1 pRL-TK R-1 Xba I CDS	AAGCGGCCGCTCTAGAAGCTCACACTCGGGAATCCTCT
SLCO2B1 pRL-TK F-2 Age I CDS	CTGCTCCGAAACCGGTTTCATCGGCCTCCAGTTCTTC
SLCO2B1 pRL-TK R-2 Xba I 3'UTR	AAGCGGCCGCTCTAGAAAAGATTGAAAAGATGTAA
hOATP2B1 pS CDS 695 Reverse	AAGCGGCCGCTCTAGAGATGGAGCTCTTTAGGTAGCC
hOATP2B1 pS CDS 1460 Reverse	AAGCGGCCGCTCTAGCTGGATCACAGTCAGGTTTGGTG
hOATP2B1 pS 3'UTR 3592 Reverse	AAGCGGCCGCTCTAGAGCCCAGGCATCGGAGAAC

4-2-2 細胞培養

HEK293 細胞の培養液は 10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/mL benzylpenicillin、100 µg/mL streptomycin、を含有した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life technologies) を用いた。試験に用いる細胞は、 2×10^5 cells/well の密度にてコラーゲン I (CORNING) でコートした 24 well プレートに播種し 1 日間 CO₂ インキュベーター (37°C、CO₂ : 5%) 中で培養したものを使用した。

PBS (-)

<u>Chemical</u>	<u>Concentration</u>
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
NaH ₂ PO ₄	7.9 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM

Adjusted to pH 7.4 with NaOH

0.1% Trypsin

<u>Chemical</u>	
Trypsin	1.0 g
EDTA	0.2 g
PBS	1000mL

Adjusted to pH 7.4 with HCl

4-2-3 Deletion Assay

作製した 615、1460、2528、3592、4320 bp の OATP2B1 を組み込んだ pRL-TK/OATP2B1 を用いて deletion assay を行った。細胞への pRL-TK/OATP2B1 の導入は Lipofectamine2000 を用いた forward transfection 法により行った。コラーゲン I (CORNING) でコーティングした 24 well culture plate に 2.0×10^5 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間後に pRL-TK/OATP2B1 を導入した。

培養後の HEK293 細胞に pRL-TK/OATP2B1 をトランスフェクションし、24 時間経過後のものを使用した。PBS で細胞を洗浄した後、規定濃度の NP 画分を含む FBS 非含有の培養液を 500 μ L 添加し、48 時間培養した。

4-2-4 qRT-PCR

3-2-8 と同様に、細胞から RNA の抽出及び cDNA の合成を行った。PCR 反応は熱変性反応 (95 $^{\circ}$ C、4 秒)、アニーリング反応および伸長反応 (62 $^{\circ}$ C、20 秒) を 40 サイクル行った。測定は Mx3000P (Agilent Technologies) を用い、各遺伝子の mRNA 発現量の解析は、解析ソフト MxPro (Agilent Technologies) を用いた。

Table 4-2-2 Primer list for qRT-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
SLCO2B1 5'UTR-CDS_exon1 Forward	TGCACTCCAGCAGTCATGG
SLCO2B1 CDS_exon2 Reverse	GGCACAGAACGAACAGCTTG
Renilla Forward	GCCTCGTGAAATCCCGTTAG
Renilla Reverse	GAATCCTGGGTCCGATTCAA

得られた cDNA を鋳型として、各遺伝子に特異的なプライマーおよび Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) を用い RT-PCR 法により mRNA 発現変化を検討した。

Table 4-2-3 Primer list for RT-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
SLCO2B1 5'UTR-CDS_exon1 Forward	TGCACTCCAGCAGTCATGG
SLCO2B1 CDS_615 Reverse	AGATGGAGCTCTTTAGGTAGCC
SLCO2B1 CDS_1460 Reverse	CTGGATCACAGTCAGGTTTGG
SLCO2B1 CDS-3'UTR_2528 Reverse	TCACACTCGGGAATCCTCTG
SLCO2B1 3'UTR_3592 Reverse	AGCCCAGGCATCGGAGAAC
SLCO2B1 3'UTR_4320 Reverse	CAAGCAATAATGGTGAGCAATG
Renilla Forward	GCCTCGTGAAATCCCGTTAG
Renilla Reverse	GAATCCTGGGTCCGATTCAA

Table 4-2-4 RT-PCR reaction conditions

	Denaturation	Annealing	Extension	No. of cycles
SLCO2B1 615	94°C/30 sec	60°C/30 sec	72°C/35 sec	30
SLCO2B1 1460	94°C/30 sec	60°C/30 sec	72°C/1 min 10 sec	30
SLCO2B1 2528	94°C/30 sec	60°C/30 sec	72°C/2 min 10 sec	30
SLCO2B1 3592	94°C/30sec	60°C/30 sec	72°C/3 min30 sec	25
SLCO2B1 4320	94°C/30 sec	60°C/30 sec	72°C/4 min 10 sec	25
Renilla	94°C/30 sec	58°C/15 sec	72°C/15 sec	20

4-2-5 RNAhybrid を用いたバイオインフォマティクス解析

バイオインフォマティクスデータベースの 1 つ RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) を用いて、miRbase (<http://www.mirbase.org/>) に 2016 年 10 月時点で登録されているりんご由来の microRNA (mdm-miRNA) と OATP2B1 mRNA (NM_007256.4) との結合予測を行った。RNAhybrid への microRNA、mRNA 配列の入力は、FASTA 形式で行った。予測時の条件は Zhang H らの報告をもとに設定した[104] (table 4-2-4)。なお、得られた mfe は Rehmsmeier M らのように配列長の影響を排除するように正規化を行っていない [105]。

Table 4-2-5 RNAhybrid parameter

Parameter	
hits per target	7
energy Threshold	-25
helix constraint from	2
helix constraint to	8
Max bulge loop length	5
Max internal loop length	9

4-2-6 pGL3-p/OATP2B1-3'UTR の作製

ヒト *SLCO2B1* の mRNA 内 3'UTR の配列 (Table 1) をルシフェラーゼ遺伝子配列の下流に挿入した (Figure 4-2-1)。

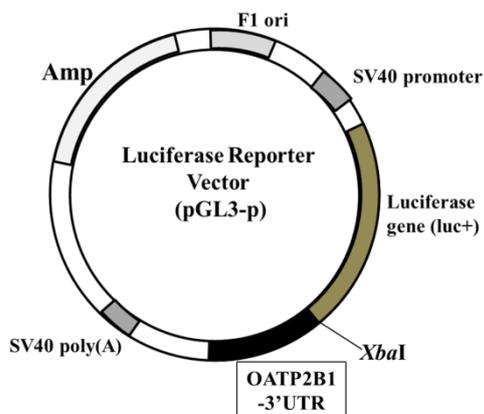


Figure 4-2-1 Construction of Luciferase Plasmids.

A fragment containing the 3'UTR of the human *SLCO2B1* cDNA was amplified by PCR and subcloned into the pGL3-p vector at the Xba I site downstream of the luciferase coding region.

pGL3-p/OATP2B1-3'UTR は以下の方法で構築した。アニールした際に両端が Xba I サイトで制限酵素により切断されるように設計した OATP2B1-3'UTR_S プライマーと OATP2B1-3'UTR_AS プライマーは OATP2B1-3'UTR の両端配列と Xba I 認識配列をもつ (Table 4-2-6)。ヒト正常肝組織サンプルから精製したゲノム DNA100 ng を鋳型とし、PCR を行った。98°C で 1 分間反応させた後、熱変性反応 (98°C、10 sec)、アニーリング反応 (59°C、15 sec)、伸長反応 (68°C、55 sec) を 35 サイクル、続いて 68°C で 3 分間反応させた。

Table 4-2-6 Primer sequences for pGL3-p/OATP2B1-3'UTR PCR

Primer	Sequence (5' to 3')
OATP2B1-3'UTR_S	TTTTCTAGAGCTGTCTTGGGGCCCCACCT
OATP2B1-3'UTR_AS	TTTTCTAGAAAAGATTGGAAAAGATGTAA
pGL3-LucEnd-S	AATCAGAGAGATCCTCATAAAG
SV40poly(A)-AS	TACTTGCTTTAAAAAACCTCCC

この PCR 産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、電気泳動後のアガロースゲルから抽出した。抽出した DNA 溶液を Xba I を用いて制限酵素処理(37°C、3~6 時間)を行った。その後、再度 DNA を精製した。pGL3-promoter ベクターを Xba I で処理した後、CIP を用いて脱リン酸化処理(37°C、1 時間)を行った。

脱リン酸化処理されたベクターと OATP2B1-3'UTR の DNA 断片を用いて、T4 Ligase によるライゲーション反応 (14°C、6 時間)を行った。コンピテントセル (DH5 α)にライゲーション溶液を加え氷上で 30 分間静置した後、42°C で 90 秒間熱処理を行い形質転換させた。900 μ L の LB 培地を加えて 37°C で 1 時間培養後、LB 寒天培地(ampicillin 含有)に播種し、37°C で 12 時間培養した。

コロニー内ベクターに目的の DNA 断片が挿入されていること確認するため、pGL3-LucEnd-S プライマーと SV40poly(A)-AS プライマー (Table 2)を用いたコロニーPCR を行った。LB 寒天培地(ampicillin 含有)から単離したコロニーを入れて混合し、94°C で 3

分間反応させた後、熱変性反応 (94°C、30 sec) 、アニーリング反応(55°C、30 sec) 、伸長反応 (72°C、30 sec) を 30 サイクル、続いて 72°C で 3 分間反応させた。反応後、目的産物の増幅を確認するため、PCR 産物を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。ベクター・インサート DNA とともに突出末端を形成する同じ制限酵素 (Xba I) で切断する場合、間違いなく両者を連結できるが連結の向きは不明である。そこで、連結の向きによって異なるサイズの DNA 断片が生じる制限酵素(Stu I)を用いて、断片の長さで連結の向きを判断した (Table 4-2-7)。

Table 4-2-7 The size of pGL3-p/OATP2B1-3'UTR which is cut by restriction enzyme

Restriction enzyme	Forward	Reverse
Stu I	1424/704	1247/881

目的の DNA 断片が含まれている大腸菌を増殖させるため、コロニーを LB 培地 (ampicillin 含有) に入れ、振盪機で 180 rpm、37°C で 6 時間培養した。その後大量培養のため、培養液を LB 溶液 (ampicillin 含有) 40 mL に入れ、37°C で一晩 (16~20 時間) 培養した。プラスミド DNA の大量調製は NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH&Co KG)を用いて行った。プラスミドの定量には NanoDrop を用いた。調製したプラスミドはシーケンス解析を行った。

4-2-7 HEK293 細胞への pGL3-p/OATP2B1-3'UTR、miRNA inhibitor の導入

HEK293 細胞への pGL3-p/OATP2B1-3'UTR の導入は Lipofectamine 3000 を用いて forward transfection 法により行った。コラーゲン I でコーティングした 48 well culture plate に 0.6×10^5 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間後に pGL3-p/OATP2B1-3'UTR を導入した。このとき導入効率を補正するため、ウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla LUC) 発現プラスミド (pRL-TK) を共導入した。pGL3-p/OATP2B1-3'UTR 45 ng と pRL-TK 5 ng、P3000 Reagent 0.5 μ L を FBS 及び抗生物質非含有 D-MEM に加えて 12.5 μ L に調製した (A)。また、Lipofectamine 3000 0.5 μ L を FBS 及び抗生物質非含有 D-MEM に加えて 12.5 μ L に調製した (B)。(A)と(B)を混合し、5 分間インキュベーション後、細胞へ 25 μ L/well ずつ添加し、6 時間培養した。また、miRNA inhibitor (Thermo Fisher Scientific) を導入する際は、終濃度が 10 nM となるように(A)に加え、以下同様の操作を行った。

4-2-8 Caco-2 細胞への miRNA mimic の導入

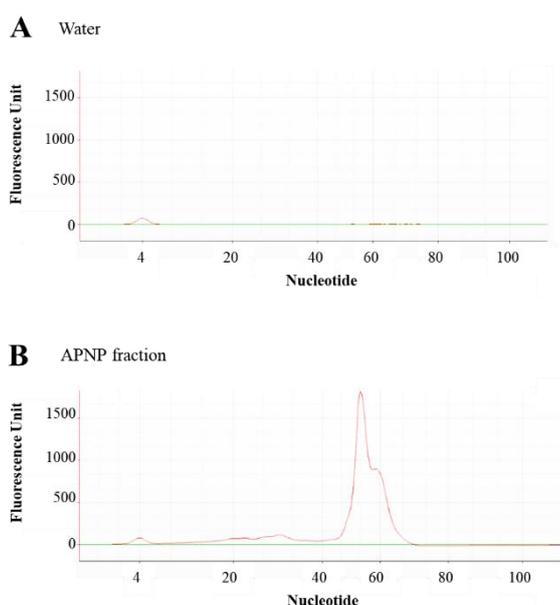
Caco-2 細胞への miRNA mimic の導入は Lipofectamine 3000 を用いて forward transfection 法により行った。コラーゲン I でコーティングした 24 well plate に 1.0×10^5 cells/well の細胞密度で播種し、24 時間後に miRNA mimic (Thermo Fisher Scientific) を導入した。4-2-6 と同様の操作で、miRNA mimic の終濃度が 10 nM となるように行った。

第三節 実験結果

4-3-1 Apple miRNA の Caco-2 細胞への取り込み

APNP を介して、Apple miRNA が OATP2B1 の発現低下に寄与する可能性を示すために、APNP 画分中における miRNA の存在を示唆することを目的として検討した。APNP 画分から RNA を抽出し、バイオアナライザを用いた電気泳動によって、APNP 画分に含まれる RNA のサイズを評価した。また、APNP 画分中の核酸を蛍光標識した後、Caco-2 細胞に処置することで、APNP 中の核酸の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

バイオアナライザを用いた電気泳動の結果より、APNP 画分から抽出した RNA において、20-30 塩基及び 60-70 塩基の核酸の存在が示されるピークが観察された(Figure. 4-3-1A, B)。miRNA のサイズが 20 塩基程度であることから、miRNA の存在が示唆された。さらに、60-70 塩基の核酸も含まれていることから、そのサイズに該当する precursor miRNA や tRNA も APNP に含まれている可能性がある。また、核酸を蛍光標識した APNP 画分を Caco-2 細胞に処置して 6 時間後、蛍光顕微鏡で観察すると、核酸由来の赤色蛍光が観察された。一方で、同様の標識操作を行った PBS 処置細胞では、赤色蛍光が観察されなかったことから、非特異的な蛍光ではないと考えられる。これらの結果から、APNP 画分中には 20 塩基程度の RNA が存在し、APNP 中の核酸は caco-2 細胞に取り込まれていることが示された。



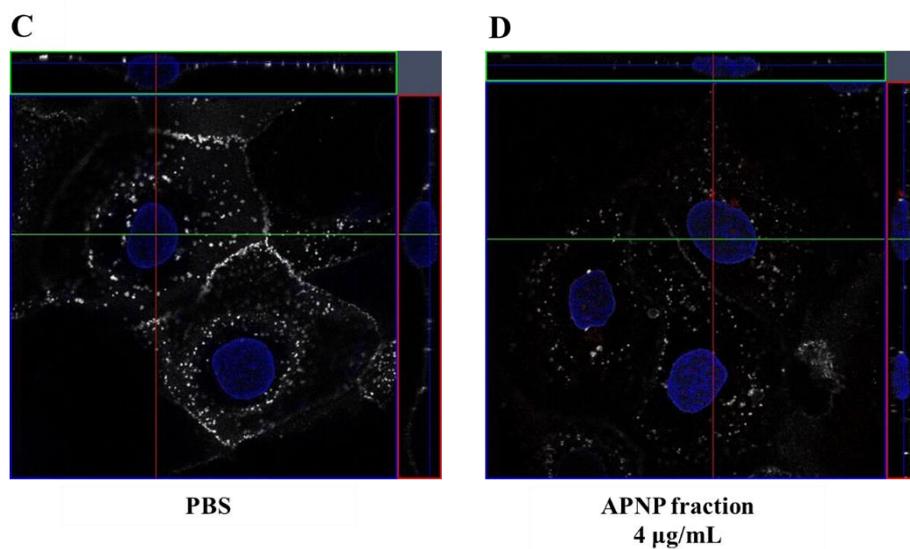


Figure 4-3-1 Electropherograms of small RNA contained in APNPs and uptake of nucleic acid contained in NPs into Caco-2 cells.

RNA was extracted from the APNP fraction, and the RNA in water (A) and the NP fraction (B) was electrophoresed. The graph shows fluorescence units on the vertical axis and nucleotide size on the horizontal axis. Caco-2 cells were incubated with Exo-GLOW (red)-labeled PBS (C) and NP fraction (D) for 6 h at 37°C. Nuclei and cell membrane were labeled with Hoechst 33342 (blue) and Alexa-Fluor-647-conjugated WGA (white), respectively. Uptake of PKH26-labeled NPs was examined by confocal microscopy. The scale bar indicates 50 µm.

4-3-2 qRT-PCR 法による AP 由来 NP 画分の OATP2B1 mRNA に対する作用部位探索

OATP2B1 mRNA 発現低下に関して、APNP が OATP2B1 mRNA のどの部位に作用するのかを探索するため、OATP2B1 mRNA の 3'側から配列を欠失させる deletion assay を

行い、qRT-PCR法で mRNA 発現変化を評価した。OATP2B1 mRNA 全長 4662 bp を基準に、およそ 1000 bp を段階的に欠失させることで、3592、2528、1460、615 bp の OATP2B1 mRNA 配列を含んだ pRL-TK/OATP2B1 を用いた。

4662 bp は 4、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の APNP 画分 24 時間処置において、mRNA の有意な現象が認められた。また、3592 bp は 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処置条件のみ、mRNA の有意な減少が示された。しかし、2528 bp 以下の OATP2B1 mRNA 配列を組み込んだ pRL-TK/OATP2B1 では、いずれの APNP 濃度でも mRNA 減少は認められなかった。

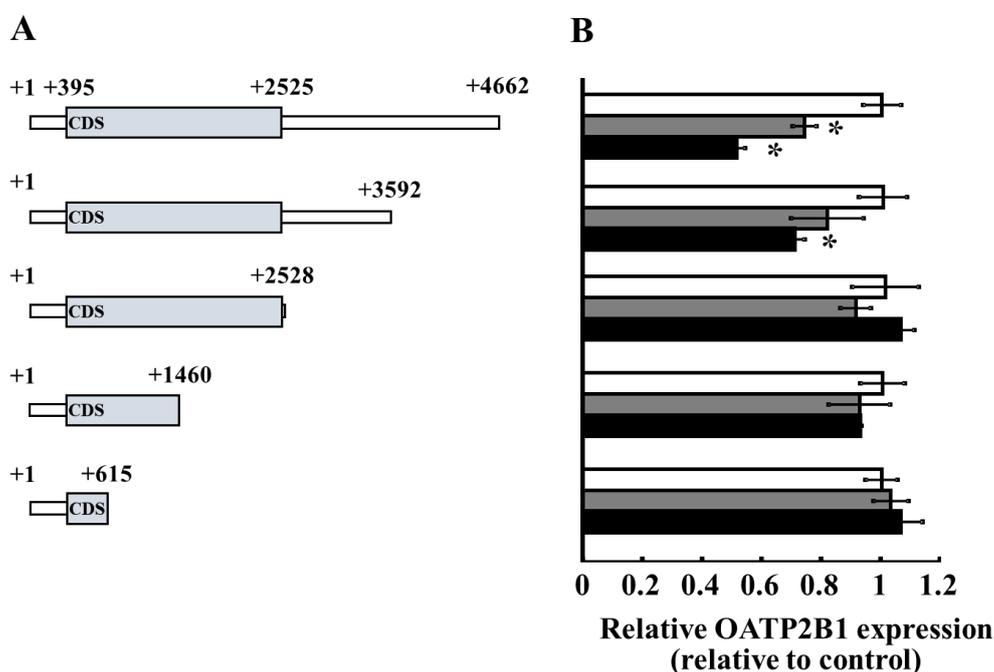


Figure 4-3-2 Effect of OATP2B1 mRNA truncations on suppression of mRNA expression by APNPs.

HEK293 cells were cultured with a 0 (white bar), 4 (gray), or 40 (black) $\mu\text{g}/\text{mL}$ APNP fraction for 24 h. mRNA expression of OATP2B1 in HEK293 transfected with pRL-TK/OATP2B1 was measured by qRT-PCR. * indicates a significant difference from the control by Student's t test ($p < 0.05$).

4-3-3 qRT-PCRによるAP由来NP画分のOATP2B1 mRNAに対する作用部位探索

4-3-2 で用いた pRL-TK/OATP2B1 を用いて RT-PCR 法により測定を行った。APNP 画分は 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間処置した。PCR を行う領域は、CDS の 5'側の末端から

3'末端までとした。

検討の結果、4-3-2 項と同様に、4362 bp、3592 bp の pRL-TK/OATP2B1 の mRNA は減少を示した一方で、他の pRL-TK/OATP2B1 では mRNA の減少は示さなかった。

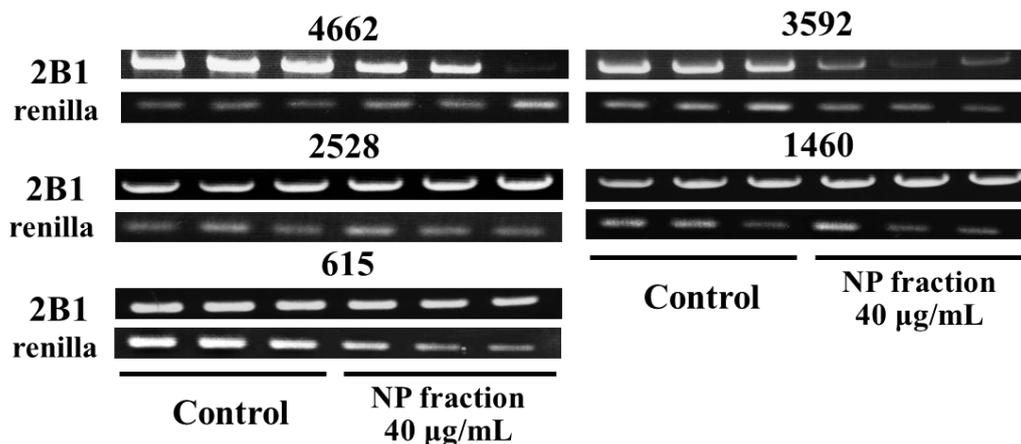


Figure 4-3-3 Effect of OATP2B1 mRNA truncations on suppression of mRNA expression by APNPs.

HEK293 cells transfected with pRL-TK/OATP2B1 expressing truncated OATP2B1 were cultured with 40 µg/mL APNP fraction for 24 h. mRNA expression was measured by RT-PCR.

4-3-4 OATP2B1 3'UTR に及ぼす APNP の作用

OATP2B1 3'UTR に対する APNP の作用を評価するために、pGL3-p/OATP2B1-3'UTR を用いて、luciferase assay により検討した。APNP 画分 1.2、4、40 µg/mL を 24 時間処置したところ、40 µg/mL 条件下においてのみ、pGL-3p/OATP2B1-3'UTR をトランスフェクションした HEK293 細胞で、ルシフェラーゼ活性が有意に低下した。また、NP を破壊する目的で熱処理・超音波処理した APNP 画分を使用したところ、40 µg/mL で観察されたルシフェラーゼ活性の低下は認められなかったため、APNP 画分中の NP による作用と考えられる。したがって、以降の検討は APNP 画分 40 µg/mL に設定して行うこととした。

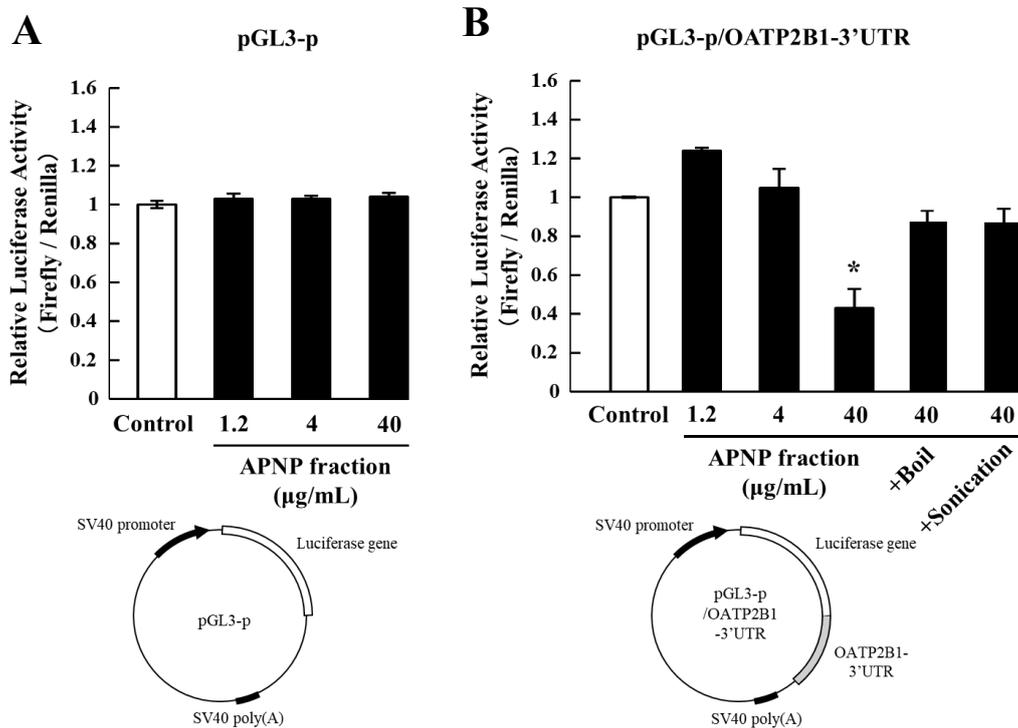


Figure 4-3-4 Effect of boiled or sonicated APNP OATP2B1 mRNA truncations on suppression of mRNA expression by APNPs.

HEK293 cells were transfected with pGL3-p (C) or pGL3-p/OATP2B1-3' UTR (D). HEK293 cells were exposed for 24 h to 1.2, 4, or 40 µg/mL of the APNP fraction 6 h after transfection. Luciferase activity was measured with a luminometer. * indicates a significant difference from the control by Student's t test ($p < 0.05$).

4-3-5 OATP2B1 3'UTR への APNP の経時的作用

OATP2B1 3'UTR に対する APNP の作用における、処置時間の影響を評価するため、APNP 画分処置 6、12、24 時間に設定し、luciferase assay を行った。いずれの処置時間においても、ルシフェラーゼ活性の有意な低下が示されており、その作用は 6 時間が最大であった。よって、APNP 作用が最も大きい処置時間 6 時間を以降の検討で用いることとした。

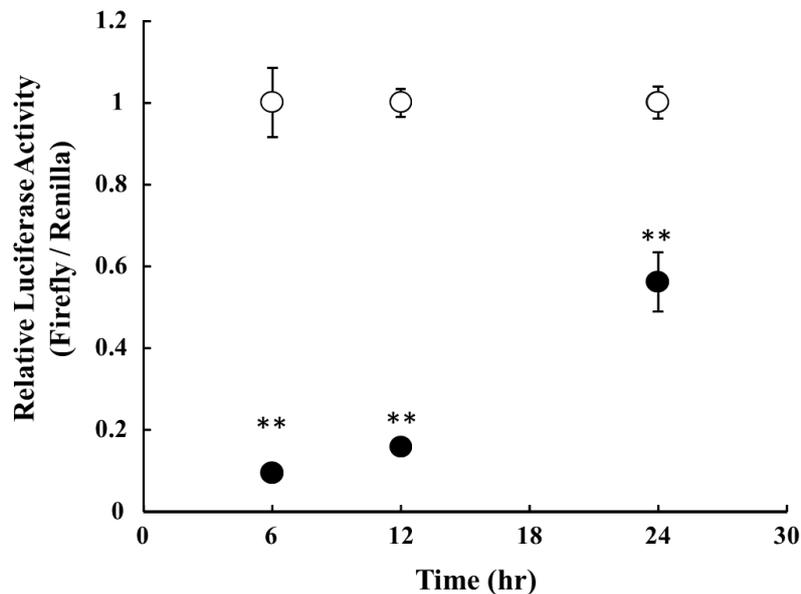


Figure 4-3-5 Time-dependent effect of APNP on OATP2B1-3'UTR luciferase activity.

HEK293 cells were transfected with pGL-3p-OATP2B1-3'UTR. After 6 h from transfection, HEK293 cells were exposed to 0 (open circle) or 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APNP fraction (closed circle) for 6, 12, or 24 h. Luciferase activity was measured by a luminometer. ** indicates a significant difference from the control by Student's t test ($p < 0.01$). Data were shown as means \pm S.E.M. (n=3).

4-3-6 OATP2B1 3'UTR に作用する miRNA の予測

RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) を用いて、OATP2B1 3'UTR に結合する可能性のある miRNA を予測した。miRBase (<http://www.mirbase.org>) に登録されている mdm-miR 全 207 種のうち、16 種の miRNA が候補として該当した。さらに、候補 miRNA の予測制度を高めるため、16 種の miRNA について、予測プログラム Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_71/) や miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) において予測パラメータとして用いられている relative position 並びに local AU contents を算出した。論文報告により、結合部位が 3'UTR の中央部位より末端部位の方が miRNA の作用が強く、結合部位付近の AU 含有量が多いほど miRNA による作用が強いと報告されている [106]。そのため、これらの基準値として、OATP2B1-3'UTR に作用する human miR-24 の値を参考に、relative position : 0.4>、0.6、local AU

contents : 0.3 ≤ に設定した。以上の条件を満たした 7 種の miRNA を候補 miRNA として、以降の検討に進んだ (Table 4-3-1)。

Table 4-3-1 Predicted miRNAs which bind to OATP2B1-3'UTR.

	Mfe (kcal/mol)	Position	Relative position	Local AU content
Human miR-24	-28.1	336	0.183	0.309
	-25.9	542	0.295	0.367
miR-160a-e	-29.6	256	0.139	0.411
	-26.0	353	0.192	0.357
miR-390a-f	-28.7	535	0.291	0.377
miR-391	-26.9	74	0.040	0.361
miR-395a-i	-26.1	101	0.055	0.465
miR-477b	-26.4	650	0.354	0.423
miR-7121a-c	-28.9	628	0.342	0.420
miR-7121d-h	-29.4	628	0.342	0.420

4-3-7 APNP 画分中の候補 miRNA の検出

予測した候補 miRNA が APNP 画分中に存在するかを調べるため、APNP 画分中から抽出した RNA を用いて、RT-PCR を行った。候補 miRNA 7 種全てにおいて、目的の PCR 段物のサイズである 80 から 90 塩基のサイズにバンドが確認された。一方で、negative control として使用した、human miRNA-1 及び human snRNA U6 のバンドは確認されなかった。よって、実験に使用している APNP 画分中に、候補 miRNA が存在していることが示唆された。

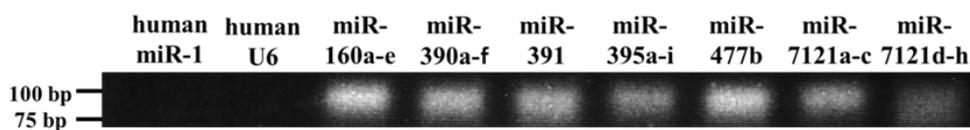


Figure 4-3-6 Detection of candidate miRNAs in APNP by RT-PCR.

Expressions of miR-160a-e, miR-390a-f, miR-391, miR-395a-i, miR-477b, miR-7121a-c, miR-7121d-h, human miR-1 and human U6 in APNP fraction were detected by RT-PCR.

4-3-8 APNP 画分中の候補 miRNA の検出

続いて、APNP 画分処置によって、候補 miRNA が細胞内に取り込まれるか検討した。APNP 画分を 40、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 6 時間処置した Caco-2 細胞から、RNA を抽出し RT-PCR を行った。miR390a-f を除く 6 種の候補 miRNA において、両濃度条件において、目的の PCR 産物のバンドが確認された (Figure 4-3-7)。しかし、miR-391、miR-395a-i、miR-7121d-h については、Apple-NP 画分非曝露群でも約 80-90 塩基のバンドが確認された。また miR-391、miR-395a-i については目的サイズ以外にもバンドが確認された。しかし、APNP 処置濃度の増加によって、目的サイズのバンドが濃くなること及び非特異的増幅産物と考えられる目的サイズ以外のバンドが薄くなることから、これらの miRNA についても、Caco-2 細胞内に取り込まれていることが示唆された。

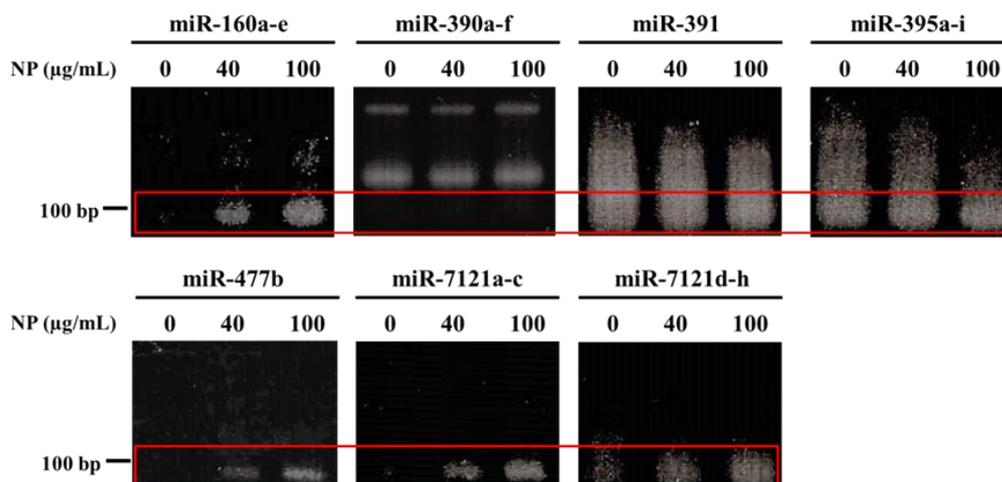


Figure 4-3-7 Detection of miRNAs in APNP fraction exposed Caco-2 cells.

Caco-2 cells were exposed to 40 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APNP fraction for 6 h. Expressions of miR-160a-e, miR-390a-f, miR-391, miR-395a-i, miR-477b, miR-7121a-c and miR-7121d-h in the Caco-2 cells were detected by RT-PCR.

4-3-9 APNP による OAPT2B1 発現低下に対する miRNA inhibitor の抑制作用

APNP 画分による OAPT2B1 の発現低下における miRNA の関与を示すために、miRNA

inhibitor による作用を luciferase assay によって評価した。pGL3-p/OATP2B1-3'UTR 及び 7 種の候補 miRNA に対応する各 miRNA inhibitor をトランスフェクションした HEK293 細胞に APNP 画分を処置し、ルシフェラーゼ活性の変動を評価した。Negative control のトランスフェクション条件では APNP 画分処置でルシフェラーゼ活性が低下したのに対し、miR-160a-e, miR-7121a-c 並びに miR-7121d-h に対する inhibitor トランスフェクション条件では、ではそれぞれ APNP 画分処置によるルシフェラーゼ活性の低下が有意に抑制された。

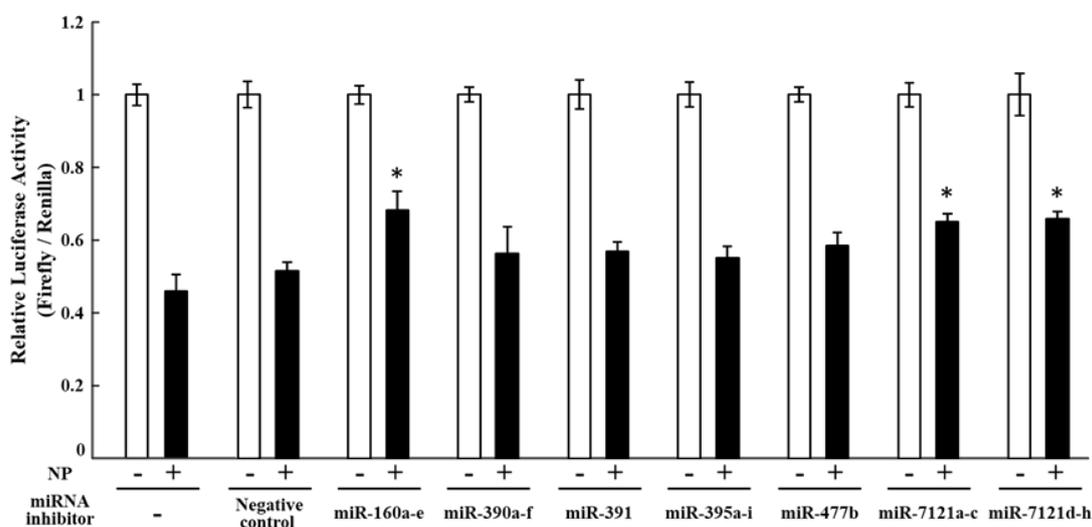


Figure 4-3-8 Inhibition of effect of APNP on OATP2B1-3'UTR luciferase activity by miRNA inhibitor

HEK293 cells were co-transfected with pGL-3p-OATP2B1-3'UTR, and negative control, miR-160a-e inhibitor, miR-390a-f inhibitor, miR-391 inhibitor, miR-395a-i inhibitor, miR-477b inhibitor, miR-7121a-c inhibitor or miR-7121d-h inhibitor. After 6 h from transfection, HEK293 cells were exposed to 40 μ g/mL APNP fraction for 6 h. Luciferase activity was measured by a luminometer. * indicates a significant difference from the control by Student's t test ($p < 0.05$). Data were shown as means \pm S.E.M. (n=6).

4-3-10 候補 miRNA mimic による OATP2B1 発現低下作用

4-3-9 より、候補 miRNA inhibitor による APNP 由来のルシフェラーゼ活性の低下抑制を示した miR160a-e, miR7121a-c 及び miR7121d-h の 3 種が、APNP 中で OATP2B1 の発現抑制に寄与していると考えられる。そこで、この 3 種の miRNA について、APNP と同

様に Caco-2 細胞における OATP2B1 の発現低下を示すかを明らかにするため、miRNA mimic を用いて OATP2B1 発現変動を評価した。

Caco-2 細胞に negative control、miRNA160a-e mimic、miR7121a-c mimic、miR7121d-h mimic をトランスフェクション後、24 時間時点における OATP2B1 mRNA 発現量を評価した。Negative control 処置条件と比較して、miR160a-e、miR7121a-c、miR7121d-h mimic によって OATP2B1 mRNA の低下が示されたため、これら miRNA が APNP による OATP2B1 の発現抑制に寄与していると考えられる。

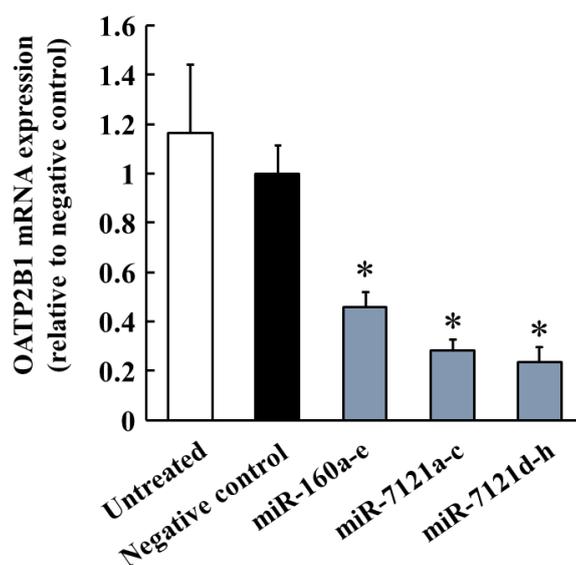


Figure 4-3-9 Effect of miRNA mimic on OATP2B1 mRNA expression in Caco-2 cells.

Caco-2 cells were transfected with negative control, miR-160a-e mimic, miR7121a-c mimic, or miR7121d-h mimic. After 24 h from transfection, OATP2B1 mRNA was measured by qRT-PCR. Data were shown as means \pm S.E.M. (n=4).

4-3-11 Ago2 複合体を形成する候補 miRNA の検出

miRNA が標的遺伝子に対して機能を示すためには、RISC の主要構成因子 Ago2 との結合が必要となる。そのため、APNP による OATP2B1 発現抑制が、miRNA がそのため、Caco-2 細胞における APNP による OATP2B1 発現抑制において、miRNA が関与しているならば細胞質中で human Ago2 と複合体を形成していると考えられる。そこで、4-3-9 より、機能している可能性の高い miRNA-160a-e、miR-7121a-c、miR-7121d-h について、Caco-2 細胞内で Ago2 と複合体を形成しているかを明らかにするために、APNP 処置後

の Caco-2 細胞を用いて Ago2 免疫沈降を行い、回収した Ago2 タンパク質サンプル中に miRNA が存在するかを RT-PCR で評価した。

その結果、APNP 画分処置条件において、目的産物サイズ 100 bp 程度に、miR-7121a-c 及び miR-7121d-h の存在を示すバンドが確認された。したがって、各 miRNA が Caco-2 細胞内で複合体を形成しており、機能的な状態であることが示唆された。

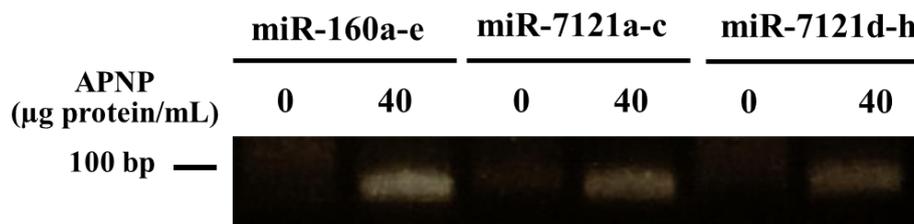


Figure 4-3-10 Detection of miRNA in Caco-2 cell derived Ago2.

Caco-2 cells were exposed to 40 $\mu\text{g/mL}$ APNP fraction for 24 h. Expressions of miR-160a-e, miR-7121a-c and miR-7121d-h in Ago2 specific immunoprecipitation sample were detected by RT-PCR.

第四節 考察

第四章では、APNP による OATP2B1 発現抑制における原因成分の同定を目指し、NP 中に含まれる miRNA に着目し、APNP 中の apple miRNA の関与を示すことを目的として検討を行った。

まず、第三章で示された OATP2B1 mRNA 発現低下における、APNP の作用部位の探索のため、deletion assay を行った。qRT-PCR 及び RT-PCR のどちらにおいても、mRNA の発現低下を示したのは、OATP2B1 mRNA の 3'側から 2134 bp の領域であった。したがって、APNP 画分による OATP2B1 mRNA 発現低下は 3'UTR を介していることが示唆された。miRNA が遺伝子発現制御を行う際に、主に対象 mRNA の 3'UTR に結合することから、miRNA の関与を示唆する結果である。一方で、miRNA の作用機序は mRNA の分解及び翻訳抑制で説明されており、動物 miRNA においては、主要な作用機序は翻訳抑制であると考えられている。そのため、qRT-PCR では、APNP による mRNA の分解作用しか評価できていない。そこで、mRNA の分解と翻訳抑制の両者を評価できる luciferase assay で APNP の作用を評価することとした。Deletion assay の結果から、APNP の作用部位が OATP2B1 3'UTR と推測されたので、pGL3-p/OATP2B1-3'UTR プラスミドを用いて luciferase assay を行った。まず、APNP 1.2、4、40 µg/mL 条件下で luciferase assay を行ったところ、40 µg/mL 条件下でルシフェラーゼ活性の低下が観察された。この条件下で、熱処理あるいは超音波処理した APNP 画分を用いると、ルシフェラーゼ活性の低下は抑制されたことから、APNP 画分中の粒子数の減少が作用抑制につながったと考えられる。しかし、熱処理及び超音波処理による miRNA への影響は評価しておらず、これら処理によって miRNA が分解している可能性は否定できない。

Deletion assay と luciferase assay によって、APNP が OATP2B1 3'UTR 部位に作用する結果から miRNA の関与が示唆されたため、次に、作用しうる miRNA の特定を目指した。まず、APNP 画分中に miRNA が存在する事を示唆するために、バイオアナライザを用いた電気泳動と核酸標識 APNP 画分の Caco-2 細胞への移行の評価を行った。APNP 画分から抽出された RNA の電気泳動の結果から、miRNA のサイズである 20-30 塩基の核酸の存在が確認できた。さらに、70 から 90 塩基の核酸も検出されたことから、APNP には miRNA に限らず、precursor miRNA や tRNA が含まれている可能性がある。ヒト血漿由来エクソソームにおいて、rRNA や tRNA、snRNA 等、多様な RNA が検出されていることから[107]、APNP も同様に miRNA 以外の RNA を含むと考察される。

また、核酸を蛍光標識した APNP を Caco-2 細胞に処置することで、細胞内に核酸由来の蛍光が観察された。これにより、APNP の脂質膜同様、APNP 中の核酸が細胞内に

移行していることから、APNP を介して miRNA が際母内に移行している可能性が示された。また、顕微鏡観察の結果から miRNA が細胞膜内に存在し、核の場所とは一致しないことから、miRNA が機能しうる細胞質中に存在すると考えられる。しかし、細胞内における miRNA が APNP から放出されたのか、APNP 内に留まっている状態なのかは区別できない。

RNAhybrid によって、予測した OATP2B1 3'UTR に結合する可能性のある mdm-miRNA 7 種全てが APNP 画分から検出された。さらに、APNP を処置した Caco-2 細胞からは、候補 miRNA 7 種類の内、mdm-miR390a-f を除く 6 種が APNP 中から検出された。mdm-miR-390a-f が検出されなかった原因として、APNP 中の含有量が少ないため、細胞への移行量が検出限界を下回ったと考えられる。

続いて、APNP による OATP2B1 発現抑制に候補 miRNA の関与を示すため検討を行った。各候補 miRNA の inhibitor を用いて、APNP によるルシフェラーゼ活性に及ぼす効果を評価したところ、miR-160a-e、miR-7121a-c、miR-7121d-h に対する inhibitor によって、APNP によるルシフェラーゼ活性の低下が有意に抑制された。APNP 中に存在する miR160a-e、miR-7121a-c、miR-7121d-h が OATP2B1 発現抑制に関与することが示唆された。しかし、3 種の miRNA inhibitor の効果を加算しても、100%に届かない点は、これら 3 種の miRNA が存在する事で相乗的に効果を発揮する可能性や、候補 miRNA 以外の miRNA の関与が考えられる。miRNA inhibitor によって、APNP の発現抑制に関与する可能性が考えられる 3 種の miRNA について、実際に OATP2B1 発現低下作用を示すのかを調べるため、Caco-2 細胞の OATP2B1 発現に与える、miRNA の作用を、miRNA mimic を用いて評価した。有意な変化ではないが、miR-7121a-c mimic あるいは miR-7121d-h mimic による OATP2B1 mRNA 発現低下の結果が得られ、miR-7121a-c 及び miR-7121d-h の関与が支持された。一方で、miR-160a-e mimic による OATP2B1 mRNA 低下は認められなかった。しかし、Caco-2 細胞における内因的な OATP2B1 発現の評価では、miRNA が直接的に OATP2B1 に作用しているか、あるいは miRNA が OATP2B1 発現調節因子に作用した結果生じている間接的な影響なのか判断はできない。そのため、候補 miRNA が OATP2B1 を直接的に制御しているかどうかを調べるために、pGL-3p/OATP2B1-3'UTR プラスミド並びに予測結合部位の変異体プラスミドにおける、miRNA mimic の影響を評価しようと試みている段階である。一方で、miRNA は、RISC の主要構成因子である Ago2 との複合体を形成し、標的 mRNA と miRNA が結合した後、作用を発揮する。miR-160a-e、miR-7121a-c、miR-7121d-h の中で、miR-7121a-c 及び miR-7121d-h は Caco-2 細胞由来 Ago2 と複合体を形成している可能性が示され、miR-

7121a-c 及び miR-7121d-h について、APNP 画分処置後の Caco-2 細胞内で、miRNA が機能しうる状態であると考察される。

以上より、第四章では、APNP による OATP2B1 発現抑制における、apple miRNA の関与が示された。本章の成果は、食品由来 APNP に含まれる miRNA が消化管輸送体の遺伝子発現制御に関与することを初めて示され、輸送体を介した薬物動態の変動要因となる相互作用発現機序のひとつになりうると考えられる。直物 miRNA による遺伝子発現制御は輸送体に限らず、小腸が担うバリアー機能や免疫反応に関与する分子種にも影響が考えられ、その作用は薬物動態変動だけに留まらない。小腸機能の恒常性維持や機能調節を目指して、他の小腸機能への影響評価が望まれる。また、本検討では、miRNA の配列情報と対象遺伝子の mRNA との結合性から候補 miRNA を予測した。今後は、miRNA による相互作用発現の予測や回避、あらには応用のためにも、精度の高い miRNA の予測プログラムの開発が望まれる。

第五章 結論

食事は人が生きていく上で不可欠であるため、食事成分は生体内に影響を与え続けている。中でも栄養物や薬物の吸収を担う消化管は、食事成分が高濃度に暴露されるため食品の影響は大きく、その作用を最も評価しやすい組織である。一方、消化管に発現する輸送体は栄養物や薬物の吸収に関与する因子であり、食品の作用を受けることが知られている。そのため、消化管輸送体に対する食品作用機序の理解は、食品を利用した健康増進や医薬品の適正使用の観点から有益な知見となり得る。そこで、本研究では、小腸輸送体 OATP2B1 に対する食品の多様な作用機序の解明を目的とした。

これまで、薬物-食品間相互作用の回避のため、消化管輸送体に及ぼす食品の作用について研究されてきたが、いずれも食品中低分子による活性阻害によって説明されてきた。しかし、輸送体に対する阻害作用は、その輸送体の典型基質に対する阻害効果の有無で評価されることが多く、基質依存的な阻害作用は検討されていない。さらに、OATP2B1 上で薬物-食品間相互作用が生じる場合、基質薬物の吸収低下は一様ではなく、基質によって作用発現は異なる。そのため、OATP2B1 は、基質間で食品作用に対する感受性が異なる輸送特性を備えていると考えられる。また、食品中には高分子成分も含まれているが、消化管内の pH 条件や消化酵素による低安定性や、高分子量による低膜透過性のため、その作用は考慮されてこなかった。しかし、近年、高分子を内包する NP が食品中に存在し、小腸組織への作用が示唆されていることから、食品由来 NP に着目するここで既知の低分子とは異なる作用成分の解明につながると考えた。そこで、本研究では、輸送体の輸送特性の面と、食品中の多様な成分の中でも高分子成分が機能する可能性について着目し、小腸輸送体に及ぼす多様な食品作用の発現機序について検討した。

第二章では、食品作用の発現に関与する OATP2B1 の輸送特性の解明を目的として、OATP2B1 上における MBS の実証を目指した。OATP2B1 の輸送特性に対するアミノ酸残基の影響から、OATP2B1 構造上に基質結合部位が複数存在する可能性が考えられた。そのため、アミノ酸変異体を用いたキネティック解析によって、OATP2B1 上の H579 と H618 がそれぞれ E₁3S low affinity site 及び high affinity site に関与するアミノ酸として見出した。さらに、E₁3S 以外の fexofenadine、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazin 及び PGE₂ を加えて、上記アミノ酸変異体による輸送活性変動や阻害剤感受性を評価したところ fexofenadine と PGE₂ は E₁3S と異なる基質結合部位であり、pravastatin、rosuvastatin、sulfasalazin は E₁3S と近い輸送特性を示したことから、OATP2B1 上に MBS の存在が示

唆された。また、食品による阻害作用の感受性が異なることから、基質認識部位が食品作用発現の有無に関わる因子である可能性を見出すことができた。

第三章では、食品由来高分子成分を含む NP が小腸輸送体の機能調節に関与するかを明らかにすることを目的とした。りんごから回収した APNP 画分を用いて、Caco-2 細胞における OATP2B1 の発現抑制及び輸送活性の低下が示された。また、APNP 画分中の低分子濃度と OATP2B1 の IC₅₀ を比較したところ、既知の低分子による競合阻害が生じる濃度ではなく、既存の作用機序とは異なる可能性が示唆された。また、薬物-食品間相互作用において、高分子成分を内包する食品由来 NP による小腸輸送体の機能調節は新しい概念であり、食品由来 NP が薬物-食品間相互作用の発現要因である可能性が見出された。

第四章では、APNP による OATP2B1 発現抑制における、高分子の関与を示す事を目的とした。APNP による OATP2B1 発現抑制は OATP2B1 遺伝子の 3'UTR を必要と知ることから、miRNA を作用分子と想定し、APNP による OATP2B1 発現抑制における apple miRNA が関与するかどうかを検討した。APNP 画分中に、OATP2B1 3'UTR と結合する可能性のある miRNA の存在が示され、候補 miRNA の特異的 inhibitor を用いた検討では、miR-160a-e、miR7121a-c 及び miR7121d-h の inhibitor によって APNP の OATP2B1 発現低下が抑制された。さらに、miR-160a-e、miR-7121a-c 及び miR-7121-d-h の miRNA mimic によって、OATP2B1 発現抑制が示されたことから、apple miRNA の作用が裏付けられた。したがって、APNP による OATP2B1 発現抑制における mdm-miR-7121a-c 及び mdm-miR-721d-h の関与が示唆され、apple miRNA がヒト遺伝子発現制御に関与する可能性を見出した。

本研究は、小腸能に及ぼす食品作用において小腸輸送体を対象とした食品作用の発現要因として、基質認識部位の多様性と NP を介した miRNA の関与を見出した研究であり、小腸組織に及ぼす食品作用の一端を解明することができた(Figure 5-1)。今後、NP や他の高分子成分による作用の評価によって、更なる食品作用の理解が望まれる。また、得られた食品作用の機序に基づいた、健康増進あるいは疾患治療に応用されることが期待される。

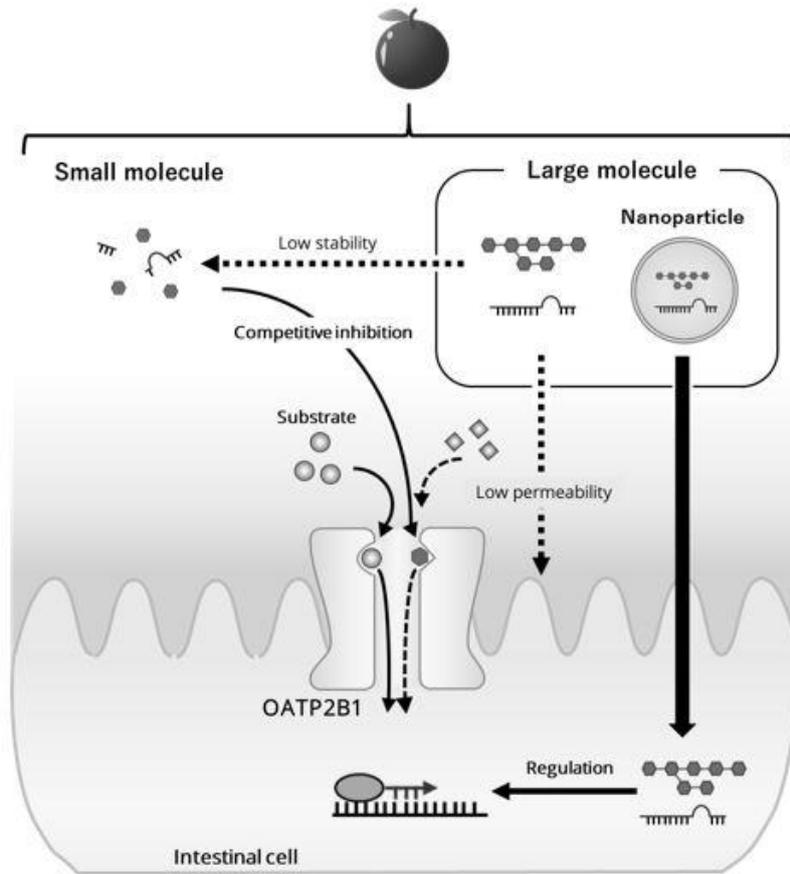


Figure 5-1 Novel mechanism for diverse of food effect.

引用文献

- [1] Paine, M. F., Criss, A. B., Watkins, P. B., Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties. *Drug Metab Dispos* 2004, 32, 1146-1153.
- [2] Paine, M. F., Oberlies, N. H., Clinical relevance of the small intestine as an organ of drug elimination: drug-fruit juice interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007, 3, 67-80.
- [3] Hanley, M. J., Cancalon, P., Widmer, W. W., Greenblatt, D. J., The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011, 7, 267-286.
- [4] Schwarz, U. I., Seemann, D., Oertel, R., Miehle, S., Kuhlisch, E., Fromm, M. F., Kim, R. B., Bailey, D. G., Kirch, W., Grapefruit juice ingestion significantly reduces talinolol bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 2005, 77, 291-301.
- [5] Spahn-Langguth, H., Langguth, P., Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol. *Eur J Pharm Sci* 2001, 12, 361-367.
- [6] Shirasaka, Y., Suzuki, K., Nakanishi, T., Tamai, I., Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin mediated by organic anion transporting polypeptide. *Pharm Res* 2010, 27, 2141-2149.
- [7] Nakanishi, T., Tamai, I., Genetic polymorphisms of OATP transporters and their impact on intestinal absorption and hepatic disposition of drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012, 27, 106-121.
- [8] Shirasaka, Y., Shichiri, M., Murata, Y., Mori, T., Nakanishi, T., Tamai, I., Long-lasting inhibitory effect of apple and orange juices, but not grapefruit juice, on OATP2B1-mediated drug absorption. *Drug Metab Dispos* 2013, 41, 615-621.
- [9] Nozawa, T., Nakajima, M., Tamai, I., Noda, K., Nezu, J., Sai, Y., Tsuji, A., Yokoi, T., Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 302, 804-813.
- [10] Imanaga, J., Kotegawa, T., Imai, H., Tsutsumi, K., Yoshizato, T., Ohyama, T., Shirasaka, Y., Tamai, I., Tateishi, T., Ohashi, K., The effects of the SLCO2B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. *Pharmacogenet Genomics* 2011, 21, 84-93.
- [11] Dolton, M. J., Roufogalis, B. D., McLachlan, A. J., Fruit juices as perpetrators of drug interactions: the role of organic anion-transporting polypeptides. *Clin Pharmacol Ther* 2012, 92, 622-630.
- [12] Shirasaka, Y., Mori, T., Shichiri, M., Nakanishi, T., Tamai, I., Functional pleiotropy of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 due to multiple binding sites. *Drug Metab*

Pharmacokinet 2012, 27, 360-364.

- [13] Shirasaka, Y., Mori, T., Murata, Y., Nakanishi, T., Tamai, I., Substrate- and dose-dependent drug interactions with grapefruit juice caused by multiple binding sites on OATP2B1. *Pharm Res* 2014, 31, 2035-2043.
- [14] Fujita, D., Saito, Y., Nakanishi, T., Tamai, I., Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)2B1 Contributes to Gastrointestinal Toxicity of Anticancer Drug SN-38, Active Metabolite of Irinotecan Hydrochloride. *Drug Metab Dispos* 2016, 44, 1-7.
- [15] Kobayashi, K., [Chemotherapy-induced diarrhea]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2003, 30, 765-771.
- [16] Ikegami, T., Ha, L., Arimori, K., Latham, P., Kobayashi, K., Ceryak, S., Matsuzaki, Y., Bouscarel, B., Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res* 2002, 62, 179-187.
- [17] Furman, W. L., Crews, K. R., Billups, C., Wu, J., Gajjar, A. J., Daw, N. C., Patrick, C. C., Rodriguez-Galindo, C., Stewart, C. F., Dome, J. S., Panetta, J. C., Houghton, P. J., Santana, V. M., Cefixime allows greater dose escalation of oral irinotecan: a phase I study in pediatric patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2006, 24, 563-570.
- [18] McGregor, L. M., Stewart, C. F., Crews, K. R., Tagen, M., Wozniak, A., Wu, J., McCarville, M. B., Navid, F., Santana, V. M., Houghton, P. J., Furman, W. L., Rodriguez-Galindo, C., Dose escalation of intravenous irinotecan using oral cefpodoxime: a phase I study in pediatric patients with refractory solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012, 58, 372-379.
- [19] Gutmann, H., Poller, B., Buter, K. B., Pfrunder, A., Schaffner, W., Drewe, J., Hypericum perforatum: which constituents may induce intestinal MDR1 and CYP3A4 mRNA expression? *Planta Med* 2006, 72, 685-690.
- [20] Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, Z. B., Wang, B., Zhang, L., Kakar, S., Jun, Y., Miller, D., Zhang, H. G., Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Mol Nutr Food Res* 2014, 58, 1561-1573.
- [21] Xiao, J., Feng, S., Wang, X., Long, K., Luo, Y., Wang, Y., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Li, X., Li, M., Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *PeerJ* 2018, 6, e5186.
- [22] Keiser, M., Kalthener, L., Wildberg, C., Muller, J., Grube, M., Partecke, L. I., Heidecke, C. D., Oswald, S., The Organic Anion-Transporting Peptide 2B1 Is Localized in the Basolateral Membrane of the Human Jejunum and Caco-2 Monolayers. *J Pharm Sci* 2017, 106, 2657-2663.
- [23] Ieiri, I., Doi, Y., Maeda, K., Sasaki, T., Kimura, M., Hirota, T., Chiyoda, T., Miyagawa, M., Irie, S., Iwasaki, K., Sugiyama, Y., Microdosing clinical study: pharmacokinetic, pharmacogenomic (SLCO2B1), and interaction (grapefruit juice) profiles of celirolol

- following the oral microdose and therapeutic dose. *J Clin Pharmacol* 2012, *52*, 1078-1089.
- [24] Mougey, E. B., Lang, J. E., Wen, X., Lima, J. J., Effect of citrus juice and SLCO2B1 genotype on the pharmacokinetics of montelukast. *J Clin Pharmacol* 2011, *51*, 751-760.
- [25] Dresser, G. K., Bailey, D. G., Leake, B. F., Schwarz, U. I., Dawson, P. A., Freeman, D. J., Kim, R. B., Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2002, *71*, 11-20.
- [26] Tapaninen, T., Neuvonen, P. J., Niemi, M., Grapefruit juice greatly reduces the plasma concentrations of the OATP2B1 and CYP3A4 substrate aliskiren. *Clin Pharmacol Ther* 2010, *88*, 339-342.
- [27] Lilja, J. J., Kivisto, K. T., Neuvonen, P. J., Grapefruit juice increases serum concentrations of atorvastatin and has no effect on pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 1999, *66*, 118-127.
- [28] Lilja, J. J., Niemi, M., Fredrikson, H., Neuvonen, P. J., Effects of clarithromycin and grapefruit juice on the pharmacokinetics of glibenclamide. *Br J Clin Pharmacol* 2007, *63*, 732-740.
- [29] Koenen, A., Kock, K., Keiser, M., Siegmund, W., Kroemer, H. K., Grube, M., Steroid hormones specifically modify the activity of organic anion transporting polypeptides. *Eur J Pharm Sci* 2012, *47*, 774-780.
- [30] Shapiro, A. B., Ling, V., Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* 1997, *250*, 130-137.
- [31] Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V., Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, *94*, 10594-10599.
- [32] Loo, T. W., Bartlett, M. C., Clarke, D. M., Identification of residues in the drug translocation pathway of the human multidrug resistance P-glycoprotein by arginine mutagenesis. *J Biol Chem* 2009, *284*, 24074-24087.
- [33] Gui, C., Hagenbuch, B., Amino acid residues in transmembrane domain 10 of organic anion transporting polypeptide 1B3 are critical for cholecystokinin octapeptide transport. *Biochemistry* 2008, *47*, 9090-9097.
- [34] Gui, C., Hagenbuch, B., Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Protein Sci* 2009, *18*, 2298-2306.
- [35] Hanggi, E., Grundschober, A. F., Leuthold, S., Meier, P. J., St-Pierre, M. V., Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Mol Pharmacol* 2006, *70*, 806-817.
- [36] Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C. A., Meier, P. J., Stieger, B., Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, *296*, C570-582.

- [37] Takano, S., Zoriki, Y., Kano, K., Takeda, M., Umeyama, H., Itoh, T., OATP2B1 の estrone-3-sulfate の輸送におよぼす Arg607 の関与. *Abstract of the 131 Annual Meeting of the Pharmaceutical Society*, 2011, 214.
- [38] Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T., Uno, T., A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 1981, 4, 879-885.
- [39] Meier-Abt, F., Mokrab, Y., Mizuguchi, K., Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol* 2005, 208, 213-227.
- [40] Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N., Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 2003, 423, 949-955.
- [41] Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., Fujiyoshi, Y., Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000, 407, 599-605.
- [42] Shirasaka, Y., Kuraoka, E., Spahn-Langguth, H., Nakanishi, T., Langguth, P., Tamai, I., Species difference in the effect of grapefruit juice on intestinal absorption of talinolol between human and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 332, 181-189.
- [43] Shirasaka, Y., Suzuki, K., Nakanishi, T., Tamai, I., Differential effect of grapefruit juice on intestinal absorption of statins due to inhibition of organic anion transporting polypeptide and/or P-glycoprotein. *J Pharm Sci* 2011, 100, 3843-3853.
- [44] Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M. G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., Fattinger, K., Meier, P. J., Hagenbuch, B., Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001, 120, 525-533.
- [45] Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 273, 251-260.
- [46] Wang, B., Zhuang, X., Deng, Z. B., Jiang, H., Mu, J., Wang, Q., Xiang, X., Guo, H., Zhang, L., Dryden, G., Yan, J., Miller, D., Zhang, H. G., Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Mol Ther* 2014, 22, 522-534.
- [47] Zhang, N., Zhang, L., Tao, Y., Guo, L., Sun, J., Li, X., Zhao, N., Peng, J., Li, X., Zeng, L., Chen, J., Yang, G., Construction of a high density SNP linkage map of kelp (*Saccharina japonica*) by sequencing Taq I site associated DNA and mapping of a sex determining locus. *BMC Genomics* 2015, 16, 189.
- [48] Ju, S., Mu, J., Dokland, T., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Xiang, X., Deng, Z. B., Wang, B., Zhang, L., Roth, M., Welti, R., Mobley, J., Jun, Y., Miller, D., Zhang, H. G., Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced

- colitis. *Mol Ther* 2013, *21*, 1345-1357.
- [49] Soleti, R., Andriantsitohaina, R., Martinez, M. C., Impact of polyphenols on extracellular vesicle levels and effects and their properties as tools for drug delivery for nutrition and health. *Arch Biochem Biophys* 2018, *644*, 57-63.
- [50] Wang, Q., Ren, Y., Mu, J., Egilmez, N. K., Zhuang, X., Deng, Z., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Zhang, H. G., Grapefruit-Derived Nanovectors Use an Activated Leukocyte Trafficking Pathway to Deliver Therapeutic Agents to Inflammatory Tumor Sites. *Cancer Res* 2015, *75*, 2520-2529.
- [51] Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol* 2011, *81*, 1171-1182.
- [52] Schneider, A., Simons, M., Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res* 2013, *352*, 33-47.
- [53] Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., Lotvall, J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007, *9*, 654-659.
- [54] Perez-Bermudez, P., Blesa, J., Soriano, J. M., Marcilla, A., Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *Eur J Pharm Sci* 2017, *98*, 40-50.
- [55] Lukasik, A., Zielenkiewicz, P., Plant MicroRNAs-Novel Players in Natural Medicine? *Int J Mol Sci* 2016, *18*.
- [56] Paine, M. F., Widmer, W. W., Hart, H. L., Pusek, S. N., Beavers, K. L., Criss, A. B., Brown, S. S., Thomas, B. F., Watkins, P. B., A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr* 2006, *83*, 1097-1105.
- [57] Paine, M. F., Widmer, W. W., Pusek, S. N., Beavers, K. L., Criss, A. B., Snyder, J., Watkins, P. B., Further characterization of a furanocoumarin-free grapefruit juice on drug disposition: studies with cyclosporine. *Am J Clin Nutr* 2008, *87*, 863-871.
- [58] He, K., Iyer, K. R., Hayes, R. N., Sinz, M. W., Woolf, T. F., Hollenberg, P. F., Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol* 1998, *11*, 252-259.
- [59] Guo, L. Q., Fukuda, K., Ohta, T., Yamazoe, Y., Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab Dispos* 2000, *28*, 766-771.
- [60] de Castro, W. V., Mertens-Talcott, S., Derendorf, H., Butterweck, V., Grapefruit juice-drug interactions: Grapefruit juice and its components inhibit P-glycoprotein (ABCB1) mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* 2007, *96*, 2808-2817.
- [61] Shirasaka, Y., Shichiri, M., Mori, T., Nakanishi, T., Tamai, I., Major active components in

- grapefruit, orange, and apple juices responsible for OATP2B1-mediated drug interactions. *J Pharm Sci* 2013, *102*, 280-288.
- [62] Zhang, M., Wang, X., Han, M. K., Collins, J. F., Merlin, D., Oral administration of ginger-derived nanolipids loaded with siRNA as a novel approach for efficient siRNA drug delivery to treat ulcerative colitis. *Nanomedicine (Lond)* 2017, *12*, 1927-1943.
- [63] Zhang, M., Viennois, E., Xu, C., Merlin, D., Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases. *Tissue Barriers* 2016, *4*, e1134415.
- [64] Wolf, T., Baier, S. R., Zempleni, J., The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *J Nutr* 2015, *145*, 2201-2206.
- [65] Maas, S. L., De Vrij, J., Broekman, M. L., Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Vis Exp* 2014, e51623.
- [66] Laue, M., Bannert, N., Detection limit of negative staining electron microscopy for the diagnosis of bioterrorism-related micro-organisms. *J Appl Microbiol* 2010, *109*, 1159-1168.
- [67] Raimondo, S., Naselli, F., Fontana, S., Monteleone, F., Lo Dico, A., Saieva, L., Zito, G., Flugy, A., Manno, M., Di Bella, M. A., De Leo, G., Alessandro, R., Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget* 2015, *6*, 19514-19527.
- [68] Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., Olivier, M., Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Rep* 2015, *13*, 957-967.
- [69] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, *25*, 402-408.
- [70] Zhuang, X., Deng, Z. B., Mu, J., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., Feng, W., McClain, C. J., Zhang, H. G., Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J Extracell Vesicles* 2015, *4*, 28713.
- [71] Aguilar-Lozano, A., Baier, S., Grove, R., Shu, J., Giraud, D., Leiferman, A., Mercer, K. E., Cui, J., Badger, T. M., Adamec, J., Andres, A., Zempleni, J., Concentrations of Purine Metabolites Are Elevated in Fluids from Adults and Infants and in Livers from Mice Fed Diets Depleted of Bovine Milk Exosomes and their RNA Cargos. *J Nutr* 2018, *148*, 1886-1894.
- [72] Shimoda, A., Sawada, S.-i., Akiyoshi, K., *Characterization and Functional Modification of Extracellular Vesicles*, 2014.
- [73] Livshits, M. A., Khomyakova, E., Evtushenko, E. G., Lazarev, V. N., Kulemin, N. A., Semina, S. E., Generozov, E. V., Govorun, V. M., Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 2015, *5*, 17319.

- [74] Webber, J., Clayton, A., How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles* 2013, 2.
- [75] Witwer, K. W., Buzas, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lasser, C., Lotvall, J., Nolte-t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., They, C., Wauben, M. H., Hochberg, F., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013, 2.
- [76] Mo, Y., Barnett, M. E., Takemoto, D., Davidson, H., Kompella, U. B., Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *Mol Vis* 2007, 13, 746-757.
- [77] Alshehri, A., Grabowska, A., Stolnik, S., Pathways of cellular internalisation of liposomes delivered siRNA and effects on siRNA engagement with target mRNA and silencing in cancer cells. *Sci Rep* 2018, 8, 3748.
- [78] Wang, Q., Zhuang, X., Mu, J., Deng, Z. B., Jiang, H., Zhang, L., Xiang, X., Wang, B., Yan, J., Miller, D., Zhang, H. G., Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nat Commun* 2013, 4, 1867.
- [79] Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., Wexler, L. H., Narendran, A., Schwartz, G. K., Healey, J. H., Sandstrom, P., Labori, K. J., Kure, E. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Brady, M. S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A. J., Bissell, M. J., Garcia, B. A., Kang, Y., Rajasekhar, V. K., Ghajar, C. M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D., Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015, 527, 329-335.
- [80] Im, H., Shao, H., Park, Y. I., Peterson, V. M., Castro, C. M., Weissleder, R., Lee, H., Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol* 2014, 32, 490-495.
- [81] Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., Fais, S., High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009, 4, e5219.
- [82] Ueda, K., Ishikawa, N., Tatsuguchi, A., Saichi, N., Fujii, R., Nakagawa, H., Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 2014, 4, 6232.
- [83] Nakai, W., Yoshida, T., Diez, D., Miyatake, Y., Nishibu, T., Imawaka, N., Naruse, K., Sadamura, Y., Hanayama, R., A novel affinity-based method for the isolation of highly

- purified extracellular vesicles. *Sci Rep* 2016, 6, 33935.
- [84] Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., Gupta, R. C., Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett* 2016, 371, 48-61.
- [85] Agrawal, A. K., Aqil, F., Jeyabalan, J., Spencer, W. A., Beck, J., Gachuki, B. W., Alhakeem, S. S., Oben, K., Munagala, R., Bondada, S., Gupta, R. C., Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine* 2017, 13, 1627-1636.
- [86] Rani, P., Vashisht, M., Golla, N., Shandilya, S., Onteru, S. K., Singh, D., Milk miRNAs encapsulated in exosomes are stable to human digestion and permeable to intestinal barrier in vitro. *Journal of Functional Foods* 2017, 34, 431-439.
- [87] Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergeres, G., Portmann, R., Egger, L., Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *J Nutr* 2012, 142, 245-250.
- [88] Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., Pasquinelli, A. E., Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005, 122, 553-563.
- [89] Snow, J. W., Hale, A. E., Isaacs, S. K., Baggish, A. L., Chan, S. Y., Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol* 2013, 10, 1107-1116.
- [90] Dickinson, B., Zhang, Y., Petrick, J. S., Heck, G., Ivashuta, S., Marshall, W. S., Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat Biotechnol* 2013, 31, 965-967.
- [91] Witwer, K. W., Contamination or artifacts may explain reports of plant miRNAs in humans. *J Nutr Biochem* 2015, 26, 1685.
- [92] Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., Zempleni, J., MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J Nutr* 2014, 144, 1495-1500.
- [93] Ha, M., Kim, V. N., Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, 15, 509.
- [94] Matsui, M., Corey, D. R., Non-coding RNAs as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 167-179.
- [95] Jonas, S., Izaurralde, E., Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015, 16, 421-433.
- [96] Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J., Ford, L. P., Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005, 33, 1290-1297.
- [97] Li, X., Pan, Y. Z., Seigel, G. M., Hu, Z. H., Huang, M., Yu, A. M., Breast cancer resistance

- protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2011, *81*, 783-792.
- [98] Dalmaso, G., Nguyen, H. T., Yan, Y., Laroui, H., Charania, M. A., Obertone, T. S., Sitaraman, S. V., Merlin, D., MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011, *300*, G52-59.
- [99] Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017, *8*.
- [100] Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A., Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology* 2006, *289*, 3-16.
- [101] Carthew, R. W., Sontheimer, E. J., Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009, *136*, 642-655.
- [102] Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., Bartel, D. P., The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008, *455*, 64-71.
- [103] Bartel, D. P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, *136*, 215-233.
- [104] Zhang, H., Li, Y., Liu, Y., Liu, H., Wang, H., Jin, W., Zhang, Y., Zhang, C., Xu, D., Role of plant MicroRNA in cross-species regulatory networks of humans. *BMC Syst Biol* 2016, *10*, 60.
- [105] Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., Giegerich, R., Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna* 2004, *10*, 1507-1517.
- [106] Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., Bartel, D. P., MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007, *27*, 91-105.
- [107] Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R. L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S. N., Boardman, L., Wang, L., Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013, *14*, 319.

参考論文

1. Daichi Fujita, Toshiki Arai, Hisakazu Komori, Yuma Shirasaki, Tomohiko Wakayama, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai. Apple-Derived Nanoparticles Modulate Expression of Organic-Anion-Transporting Polypeptide (OATP) 2B1 in Caco-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics*. **15**:5772-5780, 2018

副論文

1. 藤田大地, 玉井郁巳. 消化管トランスポーター基質を利用した経口 DDS の現状と今後の展開. *Drug Delivery System*. **33**:377-389, 2018.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健学研究域・薬学系 玉井郁巳 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導とご助言をいただきました金沢大学医薬保健学研究域・薬学系 小森久和 助教に謹んで謝意を表します。

本研究の遂行に関して、ご指導とご助言をいただきました金沢大学医薬保健学研究域・薬学系 中西猛夫 准教授（現 高崎健康福祉大学薬学研究科 分子創剤制御学 教授）に謹んで感謝申しあげます。

本研究に遂行にあたり、ナノ粒子の電子顕微鏡観察にご協力くださった熊本大学生命科学研究部 生体微細構築学講座 若山友彦 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に関して、実験に関する種々のご協力とご進言をいただきました星野悠介 修士、荒井俊樹 学士、白崎佑磨 学士、実験グループとしてご協力いただきました、三木佑里佳 修士、岩井瑠佑 修士、岩本結 学士、青崎弘幸 学士、荒井まゆみ 学士、小西ゆう子さん、朱秋楠 学士、稲永上輝君に深く感謝いたします。

本研究だけではなく、共に過ごした六年間の研究室生活において良き友人として支えていただきました中村吉伸 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行をサポートしていただきました金沢大学薬物動態学研究室の皆様にご深く感謝申しあげます。

最後に、遠方となった金沢での学生生活の九年と半年間において精神的、経済的に支え続けていただいた両親、家族に深く感謝申しあげます。