

「生体防御のメカニズム」

平成9年度採択研究代表者

杉山 雄一

(東京大学大学院薬学系研究科 教授)

「異物排除システムの分子基盤」

1. 研究実施の概要

生体は、細菌感染などに対しては免疫系を備えることにより防御を行っているが、医薬品を含む広範な低分子異物に対しては、分子変換および分子移送による排除という2つの防御機構を備えている。このうち、分子変換による排除に関しては分子レベルでの知見が集積されてきたものの、分子移送による排除に関する研究は最近開始されたに過ぎない。本研究では生体が備えている異物排除機構について、分子輸送による排除機構の解析、その分子変換による排除との関連、異物排除系の臓器相関と体内動態の解明とその制御という観点から検討を加えた。具体的には、(1) 単離細胞膜および生細胞を用いた輸送実験に基づく分子移送機能の characterization、さらにその機能を担う遺伝子の cDNA クローニングおよび機能解析、(2) 異物排出蛋白に関与する膜蛋白の分子構造解析、(3) 異物排出蛋白の異常および過剰発現により惹起される病態解析 (特に Dubin-Johnson 症候群発症機序、および抗癌剤に対する多剤耐性獲得機構の解析) を行った。更に最終的にこれらのプロセスを生理的薬物速度論に基づき、in vivo における低分子異物排除機構を統合的に解析した。

2. 研究実施内容

(1) in vitro 系 (単離細胞膜、生細胞) を用いた輸送研究

薬物の肝臓、小腸、血液脳関門・血液脳脊髄液関門透過を評価する実験系の確立を目指す検討を進めた。肝臓に関しては、既にクローン化された Ntcp, oatp-1 等のトランスポーター発現系による輸送と、肝細胞における輸送を比較検討することにより、これらトランスポーターの寄与を決定した。また、消化管吸収を予測しうる Caco-2 細胞を用いた検討を進め、MRP2, MRP3 等の排出輸送系が存在することを、機能面および分子レベルで明らかとした。血液脳関門に関しては、モデル細胞 MBEC4 細胞に MRP1 が存在すること、また MRP 活性は血管側膜に発現されることを示した。血液脳脊髄液関門に関しては、MRP1 が血管側膜上に発現されることを、機能面および分子レベルで示した。

(2) トランスポーターの同定、遺伝子のクローニング、およびトランスフェクタントの作成

肝臓からの異物排出に関与するトランスポーターとして、ヒト MRP3 のクローニングを行った。更に、ラット MRP3 のトランスフェクタントを作成し機能を解析したところ、MRP1/2 とは異なる基質特異性が示された。MRP ファミリー間で基質特異性の異なることが示された初めての例である。

更に二次性能動輸送担体に関する検討も進めた。新たにクローニングした OCTN トランスポーターファミリーのほか、 H^+ /オリゴペプチドトランスポーター pepT1、 HCO_3^- /モノカルボン酸交換トランスポーター AE2、 Na^+ /リン酸トランスポーター Npt1 が、それぞれテトラエチルアンモニウムなどの有機カチオン性物質、抗ウイルス薬 acyclovir の L-valine エステルなどペプチド構造を有しない薬物、ベンジルペニシリン やファロペネムに代表される β -ラクタム抗生物質などの有機アニオン性物質およびモノカルボン酸系薬物の組織細胞内動態制御に関与することを示した。

(3) 異物排出蛋白分子の分子構造解析

異物排出蛋白のモデルとしての細菌のテトラサイクリン排出蛋白の Cys 走査変異体の構築を進めていたが、ついに全アミノ酸残基の Cys 走査変異体構築を完成した。分子全体に渡って Cys 走査変異体を完全に構築したのは、全ての蛋白質の中でもこれが最初の例であると思われる。この結果、SH 試薬との反応性、基質によるコンホメーション変化、S-S 架橋による構造決定などを分子全体に渡って行うことが可能になった。その結果、これまで2回対称性だけが強調されていた排出蛋白に、はっきりとした4回対称性のあることが示されるなど、新しい地平線が開けてきている。多くの膜蛋白質では、結晶化が難航しており、立体構造が決められていないが、蛋白質工学的手法と超低温電顕によるヘリックス配置の観察をもとにして、コンピュータによるエネルギー計算で、X線結晶解析で得られる構造とほとんど変わらない膜蛋白質立体構造構築の可能になる時代がまもなく到来する。本研究プロジェクト実施期間内にそのような段階まで到達したいものと考えているが、10年度はそのための強固な基盤が構築された。また、①3次元結晶化、②低温電子顕微鏡による排出蛋白の分子観察、③動物細胞での排出蛋白の解析、④細菌異物排出蛋白遺伝子ライブラリの構築、等においても体制の確立と研究の前進があった。さらに、阻害剤の検索も行った。

(4) 異物輸送システムと薬剤耐性・疾病

遺伝的にカルニチン欠乏症を示す症例が世界各国で報告されているが、特に体内カルニチン量が極度に低下する一次性カルニチン欠乏症の主因は、腎において再吸収に寄与するカルニチントランスポーター異常であることが示唆されていた。

本研究でクローニングしたヒト OCTN2 が塩基性薬物を輸送するばかりでなく、L-カルニチンを Na^+ 依存的に効率よく輸送することを発見し、一次性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることを示す結果が得られた。更に、カルニチン欠乏症モデルマウス *jvs* および我が国の 3 家系患者における OCTN2 遺伝子変異の有無を測定した結果、*jvs* マウスおよび患者において本遺伝子に数種の変異が見いだされた。また、*jvs* からクローニングした OCTN2 遺伝子変異はカルニチンを全く輸送しないばかりでなく、ヒトカルニチン欠乏患者においては正常な OCTN2 タンパク生成が期待できないものであることが分かった。本カルニチン欠乏症を示す *jvs* マウスおよび患者における遺伝子変異の発見は、その発現系を用いた機能解析成果と合わせて、ヒト OCTN2 がカルニチンの体内保持ならびに組織分布に極めて重要な役割を果たしていることを世界で初めて示すものであり、今後のカルニチン欠乏症の診断ならびに治療に多大な貢献をするものと期待される。

また、ABC トランスポーターと疾病との関連については、以下の検討を行った。すなわち、MDR1 プロモーターの-100bp 付近の CpG サイトのメチル化の有無が同遺伝子の発現上昇に必要であること、また 42 症例の骨髄性白血病患者において、この CpG サイトのメチル化の有無が骨髄細胞の P-糖蛋白質の発現と相関を示すとともに、寛解率とともに関連することを示した。また cMOAT/MRP2 に関しては、ヒトゲノム DNA を単離し、幾つかの Dubin-Johnson の家系も含めた患者末梢血で変異が第 1 と第 2 の ATP 結合領域に集中していることを示した。更に cMOAT・cDNA の CHO や LLCK-PK 細胞への導入株を用いてピンクリスチンやシスプラチンに対して耐性を示すことを観察した。

(5) 生理的薬物速度論に基づく *in vitro* から *in vivo* への構築

生理学的薬物速度論モデルによる *in vitro* から *in vivo* への予測を試みた。代謝酵素、輸送担体を発現させた遺伝子導入細胞を用いることにより得られた結果を、単離肝細胞における動態に外挿し、臨床上問題となっている薬物間相互作用の予測をしようことを示した。また、mechanism-based inhibition の速度論モデル解析、誘導現象の速度論モデル解析を行った。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

- T. Hirohashi, H. Suzuki, K. Ito, K. Ogawa, K. Kume, T. Shimizu and Y. Sugiyama: Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein (MRP)-like proteins maintained in Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR). *Mol. Pharmacol.* 53, 1068-1075 (1998)
- H. Kusuhara, H. Suzuki, M. Naito, T. Tsuruo and Y. Sugiyama :

- Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line(MBED4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 1260-1265 (1998)
- T. Yamada, Y. Kato, H. Kusuhara, M. Lemaire, and Y.Sugiyama : Characterization of the transporter of a cationic octapeptide, octreotide, in rat bile canalicular membrane: Possible involvement of P-glycoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* 21(8) 874-878 (1998)
- H.Kusuhara, Y.-H. Han, M. Shimoda, E. Kokue, H. Suzuki and Y. Sugiyama: Reduced folate derivatives are endogenous substrates for cMOAT in rats. *Am. J. Physiol.* 275, G789-G796 (1998)
- Y. Kato, S. Akhteruzzaman, A. Hisaka, and Y. Sugiyama:Hepatobiliary transport governs the overall elimination of peptidic endothelin antagonists in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 568-574 (1999)
- X. Chu, Y. Kato, K. Ueda, H. Suzuki, K. Niinuma, C. A. Tyson, V. Weizer, J. E. Dabbs, R. Froelich, C. E. Green, and Y. Sugiyama:Biliary excretion mechanism of CPT-11 and its metabolites in humans: Involvement of primary active transporters. *Cancer Res.* 58, 5137-5743 (1998)
- S. Akhteruzzaman, Y. Kato, A. Hisaka, and Y. Sugiyama:Primary active transport of peptidic endothelin antagonists on bile canalicular membrane in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 575-581 (1999)
- H.Kouzuki, H.Suzuki, K.Ito, R. Ohashi and Y.Sugiyama:Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of Ligands into rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 1043-1050 (1998)
- H.Ishizuka, K.Konno, H.Naganuma, K.Nishimura, H.Kouzuki, H.Suzuki, B.Stieger, P.J.Meier and Y.Sugiyama:Transport of temocaprilat into rat hepatocytes: Role of organic anion transportin gpolypeptide (oatp1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 37-42 (1998)
- Y.Kiuchi, H.Suzuki, T.Hirohashi, C.A.Tyson and Y.Sugiyama:cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.* 433, 149-152 (1998)
- H.Kouzuki, H.Suzuki, R.Ohashi, K.Ito and Y.Sugiyama:Contribution of organic anion transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 627-634 (1999)
- S.Kinoshita, H.Suzuki, K.Ito, K.Kume, T.Shimizu and Y.Sugiyama : Transfected rat cMOAT is functionally expressed on the apical membrane in

- Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *Pharm. Res.* 15(12), 1851-1856 (1999)
- X.-Y. Chu, H. Suzuki, K. Ueda, Y. Kato, S. Akiyama and Y. Sugiyama: Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 735-741 (1999)
- M. Honma, H. Suzuki, H. Kusuhara, M. Naito, T. Tsuruo and Y. Sugiyama: High affinity efflux transport system for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line (MBEC4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 198-203 (1999)
- S. H. Song, H. Suzuki, T. Terasaki, M. Lemaire and Y. Sugiyama: Modulation of the tumor disposition of vinca alkaloids by PSC 833 in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 963-968 (1998)
- H. Kusuhara, H. Suzuki and Y. Sugiyama: The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) in the hepatobiliary excretion of drugs. *J. Pharm. Sci.* 87, 0125-1040 (1998)

他 14 件