

「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

異物排出に関与するトランスポーターについて、一次性能動輸送担体 MRP2、MRP3 の生理機能を明らかとするとともに、P-糖蛋白の *in vivo* 機能を *in vitro* 実験から予測する評価法を構築した。また、MRP3、P-糖蛋白の発現誘導機構を解明するとともに、MRP2 変異が Dubin-Johnson 症候群発症につながる機構を明らかとした。また、二次性能動輸送担体については、ヒトおよびマウス有機カチオン/カルニチントランスポーターOCTN ファミリーの分子同定と、それらトランスポーターの種々有機カチオン化合物に対する基質認識特性や輸送駆動力などの輸送機能特性の解明と、各臓器における発現分布を検討した。細菌の異物排出蛋白に関しては、X 線結晶構造を決定することができた。また細菌の異物排出蛋白遺伝子ならびにそれを制御する二成分情報伝達系ライブラリ構築と解析を行い、新規排出蛋白および制御因子を同定することができた。

## 2. 研究実施内容

### 一次性能動輸送グループ

薬物の体内動態に影響を与える一次性能動輸送担体としては、MDR1 P-糖蛋白があげられる。P-糖蛋白は血液脳関門および小腸上皮細胞などに発現され、薬物の脳移行、消化管吸収を阻害している。P-糖蛋白の *in vivo* における機能を *in vitro* 輸送系から評価する方法論を確立した。すなわち、P-糖蛋白を発現する LLC-PK1 細胞を介した basal-to-apical flux を逆向きのフラックスで除した値を、ベクター導入細胞における同様な値でさらに除することにより、*in vitro* 評価パラメータを得た。さらに、mdr1 ノックアウトマウスにおける脳対血中濃度比を正常マウスにおける比で除した値を *in vivo* 評価パラメータとした。種々の化合物について検討を加えたところ、*in vitro* および *in vivo* の評価パラメータの間には良好な相関があり、P-糖蛋白機能を *in vitro* 実験系から予測しうることが示された。さらに小腸からの基質薬物吸収についても同様な考え方を適応可能であることが示すことができた。また、薬物肝輸送に関与する一次性能動輸送担体としては、MRP2 および MRP3 があげられる。MRP2 は葉酸拮抗剤の胆汁排泄に関与することを示すことができた。MRP3 は胆汁うっ滞時に血管側膜上に発現誘導されるが、灌流肝を用いた実験により、胆汁酸の血管側への排出に関与することが示された。

## 二次性能動輸送グループ

二次性能動輸送トランスポーターとして、既に機能解析を進めてきたヒト有機カチオン／カルニチントランスポーターOCTN 群に加えて、新たにマウス OCTN の分子同定と機能特性の解析を行った。その結果、マウスにはヒトにおいては見いだされていない新たな分子種としてOCTN3の存在が明らかになった。マウス OCTN1 ならびに OCTN2 それぞれヒトのオルトログと推定されたが、OCTN3 のヒトオルトログは不明であり、種差あるいは分子未同定かについてさらなる解析の必要性が示された。

OCTN3 の機能解析を進めたところ、OCTN2 に見られる典型的な二次性能動輸送の特徴であるナトリウムイオン依存性は明確ではなく、トランスポーター活性発現には他の駆動力の必要性が示唆された。一方、OCTN3 には OCTN1 で特に高く見られた有機カチオン輸送活性は極めて低く、カルニチン特性の高いトランスポーターとして位置づけられた。また、長鎖脂肪酸よりも短鎖脂肪酸とのアシルカルニチンに対する親和性が高い傾向にあり、この結果も OCTN2 の親和性のパターンと異なるものであった。さらに、組織分布性も OCTN3 は腎臓と精巣のみに発現が見られ、極めて限られた組織分布という点も OCTN1 や OCTN2 と対照的であり、本トランスポーターのヒト組織における発現の有無はカルニチンやアシルカルニチンの生理的意義を考察する上で興味深い点であることを示すことができた。

## 異物排出蛋白分子構造解析グループ

- (1) 異物排出タンパクの X 線結晶構造解析:異物排出タンパクの結晶構造を 3.2Å 解像度で解くことに成功した。投稿論文作成中。
- (2) 大腸菌異物排出タンパク遺伝子ライブラリ構築と解析:大腸菌の推定異物排出タンパク遺伝子 37 個すべての発現ライブラリを作成し、異物排出タンパクとしての性質を解析した。そのうち実際に 20 個が何らかの既知の薬剤・毒物の排出タンパクであることが判明した。また、これらの異物排出タンパクが細菌の環境感知応答システムである二成分情報伝達系によりコントロールされることにより多剤耐性化する新しい機構を発見した。
- (3) 大腸菌二成分情報伝達系ライブラリ構築と解析:大腸菌の推定 32 個の二成分情報伝達系のレスポンスレギュレーターを強制発現するライブラリを構築し、その高発現による抗菌剤耐性化の有無、異物排出遺伝子の制御の有無を調べた。その結果、15 個のレスポンスレギュレーターが薬剤耐性をコントロールしていること、うち5個は複数の異物排出タンパク遺伝子発現を制御していることが明らかになった。
- (4) 動物細胞の新規排出タンパク遺伝子の検索とノックアウトマウスの作成:ラット血小板および脳にそれぞれ特異的に発現する ABC 型排出輸送体遺伝子を同定し、完全長 cDNA をクローニングして細胞で発現させ、血小板由来のものについてはスフィンゴシン-1-リン酸排出輸送能を測定した。脳由来のものは、その生理的役割を解析するためにノックアウトマウスを作成した。

## 薬剤耐性機構解析グループ

- (1) ヒト cMOAT/MRP2 や MRP3 について

脳血管内皮細胞では P-gp, MRP1 の発現が認められ、内皮細胞のネットワーク形成により発現

が形質膜上に移行し、活性を示すことを明らかにした。MRP2 は肝臓において高発現しているがC型肝炎ウイルスの感染により、MRP2 の発現レベルが著しく低下する事を見いだした。MRP2,MRP3 のプロモーター領域を単離し、種々のシスエレメントを同定した。腸肝循環におけるABCトランスポーターの役割として胆汁酸付加により MRP3 の mRNA の上昇を観察した。この発現制御には orphan receptor の FTF が関与する事を見いだした。

#### (2) MDR1, MRP3 遺伝子の発現の分子機序

ヒト MDR1 遺伝子のがん細胞における発現上昇にプロモーター領域での Alu 配列や他遺伝子の挿入などによる再配列が観察された。膀胱腫瘍において再発症例での MDR1 発現上昇にはプロモーター領域の CpG の脱メチル化が関与していることを明らかにした。MDR1 遺伝子の発現誘導に関与するプロモーター上の Y-box と結合する YB-1 の核移行が肺ガンにおいて高率に観察された。

(3) すでに MRP2 遺伝子の関与をあきらかにした Dubin-Johnson 症候群について、R768W の変異が maturation の異常により、また、Q1382R の変異は ATP 加水分解能低下によりトランスポート活性に影響をあたえていることを明らかにした。

### 3. 研究実施体制

#### 一次性能動輸送グループ

①杉山雄一(東京大学大学院薬学系研究科・教授)

②排出輸送担体による異物排出機構の解明

#### 二次性能動輸送グループ

①辻彰(金沢大学薬学部・教授)

②ヒトおよびマウス OCTN の分子同定と機能特性の解析  
マウス OCTN3 の輸送駆動力、基質選択性および発現分布の解明

#### 異物排出蛋白分子構造解析グループ

①山口明人(大阪大学産業科学研究所・教授)

②排出輸送担体の構造と機能

#### 薬剤耐性機構解析グループ

①桑野信彦(九州大学医学研究院・教授)

②薬剤排出ポンプによる耐性獲得機構解明

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文発表

#### 一次性能動輸送グループ

○ Y.Gotoh, Y.Kato, B.Stieger, P.J.Meier and Y.Sugiyama: Gender difference in the Oatp1-mediated tubular reabsorption of estradiol 17  $\beta$  -D-glucuronide in rats. Am. J. Physiol. 282:E1245-E1254(2002).

○ D.Sugiyama, H.Kusuhara, Y.Shitara, T.Abe and Y.Sugiyama: Effect of 17  $\beta$  estradiol-D-17

$\beta$ -glucuronide (E217  $\beta$  G) on the rat organic anion transporting polypeptide 2 (rOatp2)-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab Dispos.* 30: 220–223 (2002).

- M.Hasegawa, H.Kusuhara, D.Sugiyama, K.Ito, S.Ueda, H.Endou and Y.Sugiyama: Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 746–753 (2002).
- N.Morita, H.Kusuhara, T.Sekine, H.Endou and Y.Sugiyama: Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1179–1184 (2001).
- H.Kusuhara and Y.Sugiyama: Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Cont Rel.* 78:43–54 (2002)
- Y.Adachi, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res* 18: 1660–1668 (2001).
- H.Akita, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Sinusoidal efflux of taurocholate is enhanced in Mrp2-deficient rat liver. *Pharm Res* 18: 1119–1125 (2001).
- H.Kusuhara and Y.Sugiyama: Drug-drug interactions involving the membrane transport process. In: *Drug-drug interactions* ed. by Rodrigues, A.D. Marcel Dekker, pp123–188, Basel (2001).
- Y.H.Han, Y.Kato, Y.Watanabe, K.Terao, Y.Asoh and Y.Sugiyama: Carrier-mediated hepatobiliary transport of a novel antifolate, N-[4-[(2,4-dianninopteridine-6-yl)methyl]-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-7-yl]carbonyl-L-homoglutamic acid, in rats. *Drug Metab Dispos* 29:394–400 (2001).

#### 二次性能動輸送グループ

- K.Naruhashi, I.Tamai, N.Inoue, H.Muraoka, Y.Sai, N.Suzuki, and A.Tsuji; Improvement of multidrug resistance-associated protein 2 in intestinal secretion of grepafloxacin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother* 46, 344–349 (2002).
- I.Tamai, T.Nozawa, M.Koshida, J.Nezu, Y.Sai, and A.Tsuji; Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide OATP-B in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm. Res.* 18, 1262–1269 (2001).
- F.Ishikawa, M.Katsura, I.Tamai, And A.Tsuji; Improved nasal bioavailability of elcatonin by insoluble power formulation. *Int. J. Pharm.* 224, 105–114 (2001).
- I.Tamai, K.China, S.Sai, D.Kobayashi, J. Nezu, E.Kawahara, and A.Tsuji; Na<sup>+</sup>-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 273–284 (2001).
- K.Naruhashi, I.Tamai, N.Inoue, H.Muraoka, Y.Sai, N.Suzuki and A.Tsuji; Active intestinal

secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. J. Pharm. Pharmacol. 53, 699-709 (2001).

- Y.Higashi, K.Yokogawa, N.Takeuchi, I.Tamai, M.Nomura, N.Hashimoto, J.Hayakawa, K.Miyamoto and A.Tsuji; Effect of gamma-butyrobetaine on fatty liver in juvenile visceral steatosis in mice. J. Pharm. Pharmacol. 53, 527-533 (2001).
- R.Ohashi, I.Tamai, J.Nezu, H.Nikaido, N.Hashimoto, A.Oku, Y.Sai, M. Shimane and A.Tsuji; Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2. Mol. Pharmacol. 59, 358-366 (2001).
- K.Naruhashi, I.Tamai, Y.Sai, N.Suzuki and A.Tsuji; Secretory-transport of p-aminohippuric acid across intestinal epithelial cells in Caco-2 cells and isolated intestinal tissue. J. Pharm. Pharmacol. 53, 73-81 (2001).

#### 異物排出蛋白分子構造解析グループ

##### 原著論文

- S.Nada, S.Murakami, S. Okamoto, Y.Kubo and A. Yamaguchi; Monoclonal Antibody That Binds to the Central Loop of the Tn10-Encoded Metal-Tetracycline/H<sup>+</sup> Antiporter of *Escherichia coli*. J. Biochem. 129 1, 87-91 (2001).
- K.Nishino and A.Yamaguchi; Overexpression of the Response Regulator *evgA* of the Two-Component Signal Transduction System Modulates Multidrug Resistance Conferred by Multidrug Resistance Transporters. J. Bacteriol. 183 4, 1455-1458 (2001).
- N.Tamura, S.Konishi, S.Iwaki, T.Kimura-Someya, S. Nada, and A. Yamaguchi; Complete Cysteine-Scanning Mutagenesis and Site-Directed Chemical Modification of the Tn10-Encoded Metal-Tetracycline/H<sup>+</sup> Antiporter. J. Biol. Chem. 276 23, 20330-20339 (2001).
- T.Akasaka, M.Tanaka, A.Yamaguchi and K.Sato; Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone-resistant Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in 1998 and 1999: Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolone Resistance Antimicrob. Agents Chemother. 45 8, 2263-2268 (2001).
- N.Kobayashi, K.Nishino and A.Yamaguchi; Novel Macrolide-specific ABC-type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183 19, 5639-5644 (2001).
- K. Nishino and A. Yamaguchi; Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183 20, 5803-5812 (2001).
- E.Fujihira, N.Tamura and A.Yamaguchi; Membrane Topology of a Multidrug Efflux Transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. J. Biochem. 131 1, 145-151 (2002).
- K.Nishino and A.Yamaguchi; EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriology. 184 8, 2319-2323 (2002).

## 総説

### (1) 西野邦彦、山口明人 「細菌ゲノムに潜む薬剤耐性因子」

日本細菌学雑誌 57, 461-472 (2002).

#### 薬剤耐性機構解析グループ

- J.Nagayama, M.Iino, Y.Tada, H.Kusaba, A.Kiue, K.Ohsima, M.Kuwano, and M.Wada; Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug resistance (mdrla) gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood* 97: 759-766 (2001).
- S.Haga, E.Hinoshita, K.Ikezaki, M. Fukui, G.L.Scheffer, T.Uchiumi and M.Kuwano; Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 211-219 (2001).
- S.Tasaka, H.Ohmori, N.Gomi, M.Iino, T.Machida, A.Kiue, S.Naito and M.Kuwano; Synthesis and structure--activity analysis of novel dihydropyridine derivatives to overcome multidrug resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11:275-277 (2001).
- E.Hinoshita, K.Taguchi, A.Inokuchi, T.Uchiumi, N.Kinukawa, M. Shimada, M.Tsuneyoshi, K.Sugimachi and M.Kuwano; Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 35: 765-773 (2001).
- M.J.Harris, M.Kuwano, M.Webb and P.G.Board; Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J.Biol. Chem.*, 276: 20876-20881 (2001).
- A Kawakami, M.Tomofumi, R.Higuchi, T.Uchiumi, M.Kuwano and R. W. N.Van Soest; Structure of a novel multidrug resistance modulator, irciniasulfonic acid, isolated from a marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 42: 3335-3337 (2001).
- K.Shibahara, K.Sugio, T.Osaki, T.Uchiumi, Y.Maehara, K.Kohno, K.Yasumoto, K.Sugimati and M.Kuwano; Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small-cell lung cancer. *Clinical Cancer Res.* 7: 3151-3155 (2001).
- A.Inokuchi, E.Hinoshita, Y.Iwamoto, K.Kohno, M.Kuwano and T.Uchiumi; Enhanced expression of human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes: a transcriptional control of plausible bile acid transporter. *J. Biol. Chem.*, 276: 46822-46829 (2001).
- Y.Tada, M.Wada, T.Migita, J.Nagayama, E.Hinoshita, Y.Mochida, Y.Maehara, M.Tsuneyoshi, M.Kuwano and S.Naito; Increased expression of multidrug resistance-associated proteins in bladder cancer during clinical course and drug resistance to doxorubicin. *Int J Cancer* 98: 630-635 (2002).
- K. Hashimoto, T. Uchiumi, T. Nakamura, T. Ebihara, T. Konno, M. Wada, S. Sakisaka, F. Maniwa, T. Amachi, K. Ueda and M. Kuwano; Trafficking-defect and functional-defect by mutations of the ATP-binding domains in multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCB2) in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*, 36: 1236-1245 (2002).

### (2) 特許出願

国内 1件