

特別講演

組織細胞膜トランスポーター一群の分子認識輸送の多様性

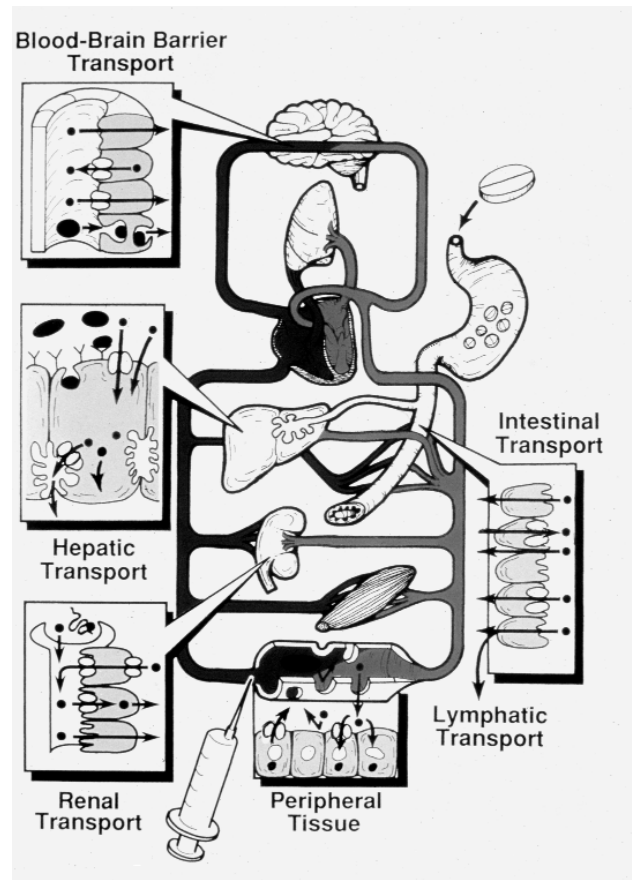
金沢大学薬学部薬学科薬効動態学講座

教授(薬学部長) 辻 彰

生体組織の細胞に備わる輸送担体(トランスポーター)は、生体にとって「必要なもの」を積極的に取り込み、「不要なもの」を細胞外へ排出する機能を担っています。治療のために投与された薬剤は、目標とする病巣部位にのみ移行し、副作用が懸念される組織への移行がないことが望ましく、かつ最終的には「不要なもの」として腎臓・肝臓などの組織から適度の消失半減期で排出輸送される特性を有していなければなりません。私たちの研究目的は、各組織細胞に発現しているトランスポーター群が取り込みあるいは排出によって、「必要なもの」と「不要なもの」を巧妙に選別輸送する分子機構を解明することにあります。この解明によって、「組織選択的なデリバリー」特性を示す理想的な治療薬の創薬戦略が確立できます。

1 薬物の体内動態 (スライド1)

薬の体内動態において、薬が生体内においてどのような挙動をとり体内から排出されていくのか、あるいは特定の組織に移行するのか、ということを漫画(スライド)で示します。薬剤が消化管から吸収される場合には、消化管上皮細胞から何らかの輸送機構によって吸収されます。油に溶けやすい構造のものですと、吸収されて肝臓に入って、肝臓内で代謝され解毒される。つまり、未変化体のものが血液中を移行するという事は極めて難しくなってくるわけです。これは一つの体内解毒機構です。一方、何らかの形で代謝を逃れたとしても胆汁中に排泄され、また消化管に戻るという腸管循環を繰り返すことによって、薬はまったく作用せずにどぶに流すようなことになってしまいます。一方、それをまぬがれた薬剤が血液中を流れていった場合に、不特定多数の臓器に移行することによって、中枢性の副作用あるいはその他の毒性が現れてまいります。こういう体の中の動きに対して、従来私たち薬学で学ぶあるいは教えられた者は、薬は生体異物であるので生体膜を単純拡散、すなわち、油に溶けやすい化合物が生体膜を

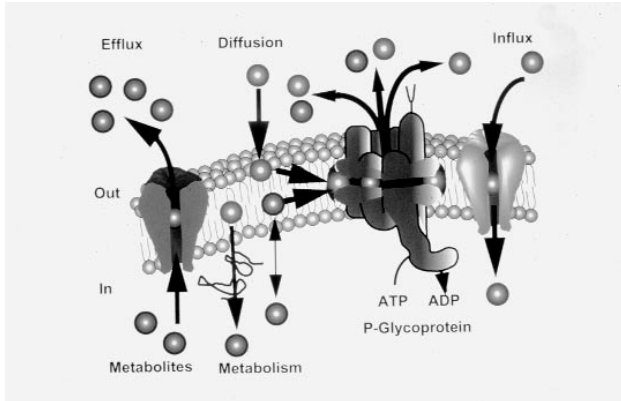


スライド1

単純拡散の機構で移行するという事を広く信じてまいりました。今日お話をさせていただきたいのは、生体はそんなに単純なものではないということです。

2 がん細胞におけるP-糖タンパクによる薬剤排除機構 (スライド2)

がん細胞で言いますと、抗がん剤が脂質二重層を介して入ってまいりますと、この薬剤に対してがん細胞は耐性化いたします。その機構に対しまして1980年ごろに、「何らかの排出ポンプが関与していて、その薬剤を排出することによって耐性化をしている」という多剤耐性(MDR)機構が提出されました。



スライド2

1987年に京大農学部の植田助教授がアメリカ留学中に、ヒト遺伝子から P-glycoprotein (P というのは、permeability の略) という P-糖タンパクの遺伝子を解析し、その遺伝子を *MDR1* と名付けました。このトランスポーターが、細胞内に侵入してくる薬剤を排出することによって、多剤耐性を獲得するわけです。この機構は現在では、ATP を使ったバキュームクリーナー、つまり掃除機が異物を排除するような機構と考えられています。「がん細胞では必要なものを取り入れ、不必要なものを排除するという機構が巧妙に働いている」ということは現在広く知られているところです。しかし、正常細胞におきましても同じことが言えるわけです。私たちが興味をもっているのは、生体が必要なものと不要なものをどのような機構で分子認識し、取り込みや排出をして生体の生命維持を行っているのか、ということです。このメカニズムが解明されれば、生体にとって必要なものとして取り込まれ、不要なものとして適当な時間で体内から排出されるという薬の開発が可能になってくるであろうということ、あるいは医薬品の適正使用に使えるのではないかとということで、夢をもってこの研究をしています。

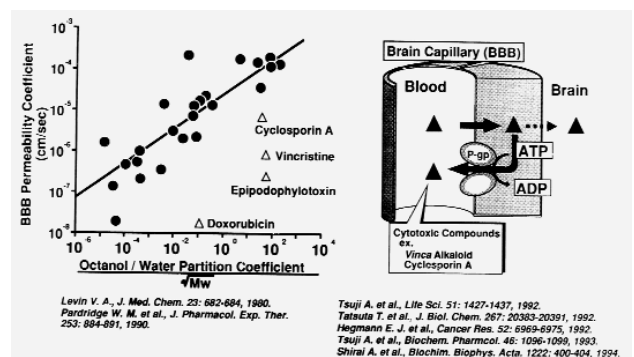
3 正常細胞・組織における P-糖タンパクの役割

まず最初に、P-糖タンパクが正常な組織においてどのような役割を果たしているかをお話させていただきます。私のところで現在助教授をしております玉井郁巳君が、がん細胞が耐性化に係わる P-糖タンパクを発現するのであれば、正常な組織細胞においても P-糖タンパクのような排除機構が働き、耐性化するのではないかと興味から、シカゴ大学に留学いたしました。そして P-糖タンパク研究の一人者であるサーファー博士との研究を展開したのが1989年～90年にかけてでございます。

3.1 血液脳関門における P-糖タンパクの存在とその役割

(スライド3)

まず私たちが最初に取り組みましたのは、血液脳関門の透過性です。スライドは薬剤の脂溶性と脳移行性の関係を示したグラフです。縦軸がラットの脳に移行する速度、横軸が水とオクタノール分配係数を分子量で補正した値で脂溶性(油への溶けやすさ)の尺度であります。多くの薬剤は脂溶性が上がれば脳に移行しやすいということですが、シクロスポリン A (cyclosporin A)、ビンクリスチン (vincristine)、エピポドフィロトキシン (epidodophylootoxin)、ドキソルビシン (doxorubicin) は透過性が低いという結果が1980年と1990年に発表されました。1980年には Levin は *J. Med. Chem.* で「分子量が500を超えると脳に入らない」というメカニズムを提唱しました。この分子量が大きくなれば脳に入らないという、いわゆる「分子ふるい説」は広く信じられておりました。1990年に発表されたシクロスポリン A が透過性が低いという結果に対して、玉井君の方から「シクロスポリン A は P-糖タンパクの基質ですよ」と彼の最新の研究成果が私たちに伝達されました。一方、ビンクリスチン、エピポドフィロトキシン、ドキソルビシンも同じように P-糖タンパクの基質であります。また、1989年～90年にかけて、P-糖タンパクが血液脳関門を構成する内皮細胞に存在するという報告がでてまいりました。これらの情報を得て私たちは、「P-糖タンパクを介した ATP 依存性の薬物排出が起こり、その結果、薬物の脳透過性が低くなる」という仮説を立てました。そこで医学部脳神経外科の山下純宏教授、山嶋哲盛助教授の協力を得ましてこの研究に取りかかったわけです。



スライド3

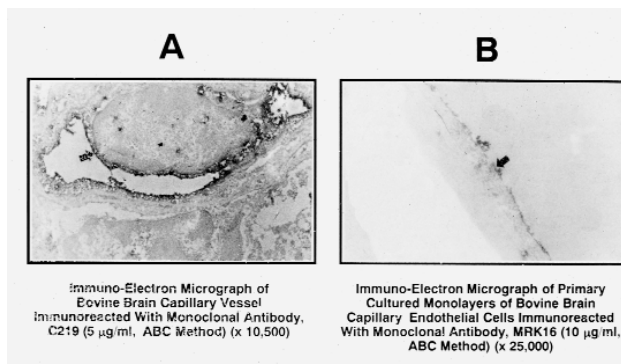
3.1.1 *in vitro*でのP-糖タンパクの血液脳関門機能の証明

(スライド4)

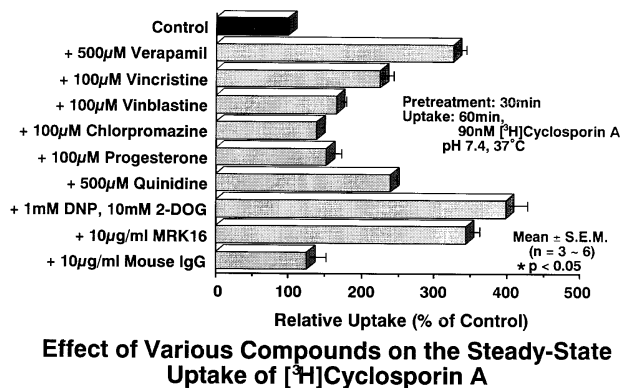
まず、ウシ脳毛細血管を使いまして、血液脳関門にP-糖タンパクが発現していることを免疫電子顕微鏡法で確認いたしました(スライド左図)。これを見ると明らかに血液側にP-糖タンパクが発現しています。一方、ウシ脳毛細血管内皮細胞の初代培養細胞を使ってもやはりP-糖タンパクは血液側に発現していることを確認することができます(スライド右図)。従いまして、阻害剤を入れることによって、P-糖タンパクによる薬剤の排出を抑えれば、例えばシクロスポリンAのようなP-糖タンパクの基質は、内皮細胞に蓄積されるであろうという仮説を立てて実験をやりました。

(スライド5)

初代培養細胞への³H-シクロスポリンAの取り込みは、スライド5に示すようにコントロールの場合の取り込みを100といたしますと、P-糖タンパクの阻害剤を加えることによって取り込みが2倍から3倍上がります。また、MRK16はP-糖タンパクの



スライド4



スライド5

外部エピトープを認識する抗体ではありますが取り込みが3倍上がっています。しかし、マウスIgGそれ自身ではまったく変化しないことから、1992年に世界で最初にP-糖タンパクが血液脳関門の機能を持っているという論文の発表となったわけです。しかし、この結果は残念ながら2倍から3倍の*in vitro*の結果であり、*in vivo*において本当にP-糖タンパクが関与しているかは定かではないということで、1992年~94年まで私たちの仮説は信じてもらえませんでした。

3.1.2 *in vivo*でのP-糖タンパクの血液脳関門機能の証明

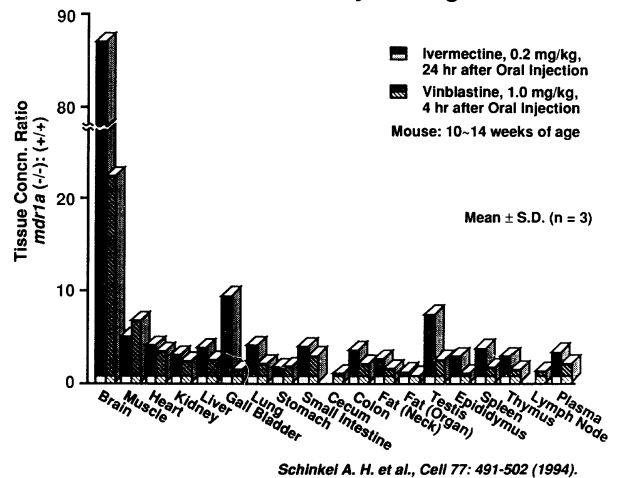
(スライド6)

ところが、1994年にオランダのSchinkelのグループが*mdr1a*をノックアウトしたマウスを開発いたしまして、イベルメクチン(ivermectine)という殺虫剤、あるいはビンブラスチン(vinblastine)を投与いたしますと、ノックアウトマウスの脳内の濃度がイベルメクチンで80倍、ビンブラスチンでは30倍も脳に移行しているという発見をしました。この結果を基に、P-糖タンパクがこれらの毒性物質を排除する血液脳関門機能を持っているということが雑誌Cellに発表されました。それ以来、P-糖タンパク機能が血液脳関門の役割を果たしているのだということが広く信じられるに至ったわけです。

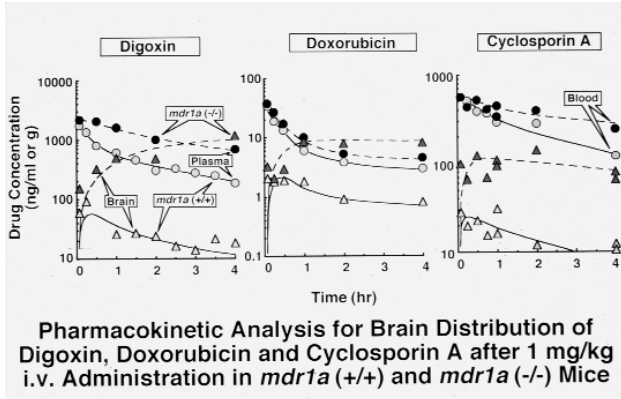
(スライド7)

私たちも*mdr1a*ノックアウトマウスを使いまして、ジゴキシシン(digoxin)、ドキシソルピシン、シクロスポリンAの脳内移行性を調べました。スライド

Disruption of the Mouse *mdr1a* Gene Leads to a Deficiency in the Blood-Brain Barrier and to Increased Sensitivity to Drugs



スライド6



スライド7

に示すように、正常マウスでの脳内の移行が非常に低いにも関わらず、ノックアウトマウスは脳内に蓄積していくというタイムコースを得ることができました。この結果は、ジゴキシン、ドキシソルビシン、シクロスポリンAの脳内移行がP-糖タンパクによって制限されることによって、脳内で毒性が発現しないよう守られているということを示す結果でございます。

(スライド8)

スライドはジゴキシン、ドキシソルビシン、シクロスポリンAのトリチウム標識体をマウスに投与して、脳と血液の濃度比をとったものです。正常マウスでは³H-ジゴキシンが0.04、それにシクロスポリンAのコールド体を投与したものは約0.24となります。ノックアウトマウスの0.46に近づいてくるということは、ジゴキシンの脳内の移行をP-糖タンパクが排除しているけれども、シクロスポリンAによって阻害されることによって、脳内に蓄積が起こることです。同じことが³H-ドキシソルビシンでも見られ、シクロスポリンA投与時で1.17とノックアウトマウスの2.13に近い値でした。³H-シクロスポリンAについてもそれ自身のコールド体投与でノックアウトマウスと同じ値に近づいてくる結果になっています。抗がん剤や他剤との併用によってP-糖タンパクが阻害され、抗がん剤などが脳内に移行しやすくなる。これは、脳に移行しにくい抗がん剤を脳に移行させるという方法にも使えますし、一方では薬物間相互作用によって中枢効果に副作用がでてくるという原因にもなるわけです。

3.2 小腸におけるP-糖タンパクの役割

(スライド1参照)

P-糖タンパクは、血液脳関門を形成する内皮細胞の血液側、それから胆汁の胆管側、小腸の管腔側、

Effect of Multiple Dosing of Cyclosporin A on Brain Distribution of Various Drugs after i.v. Administration in Mice

Drug	Dose	Mouse	Cyclosporin A	Brain-to-Plasma Concn. Ratio ^{a)}
Digoxin	3.4 µg/kg	(+/+)	-	0.0443 ± 0.0040
		(+/+)	+	0.245 ± 0.035
		(-/-)	-	0.465 ± 0.095
	1 mg/kg	(+/+)	-	0.0678 ± 0.0065
		(+/+)	+	0.147 ± 0.014
		(-/-)	-	0.530 ± 0.10
Doxorubicin	1 mg/kg	(+/+)	-	0.371 ± 0.076
		(+/+)	+	1.17 ± 0.17
		(-/-)	-	2.13 ± 0.38
Cyclosporin A	1 mg/kg	(+/+)	-	0.0500 ± 0.021 ^{b)}
		(+/+)	+	0.404 ± 0.067 ^{b)}
		(-/-)	-	0.437 ± 0.046 ^{b)}

a) Mean ± S.E.M., n = 3 - 8

b) Brain-to-Blood Concentration Ratio

スライド8

腎臓の尿側に発現していることが知られています。小腸におけるP-糖タンパクの役割につきましても私たちは検討いたしました。その中で興味ある結果を紹介させていただきます。

(スライド9)

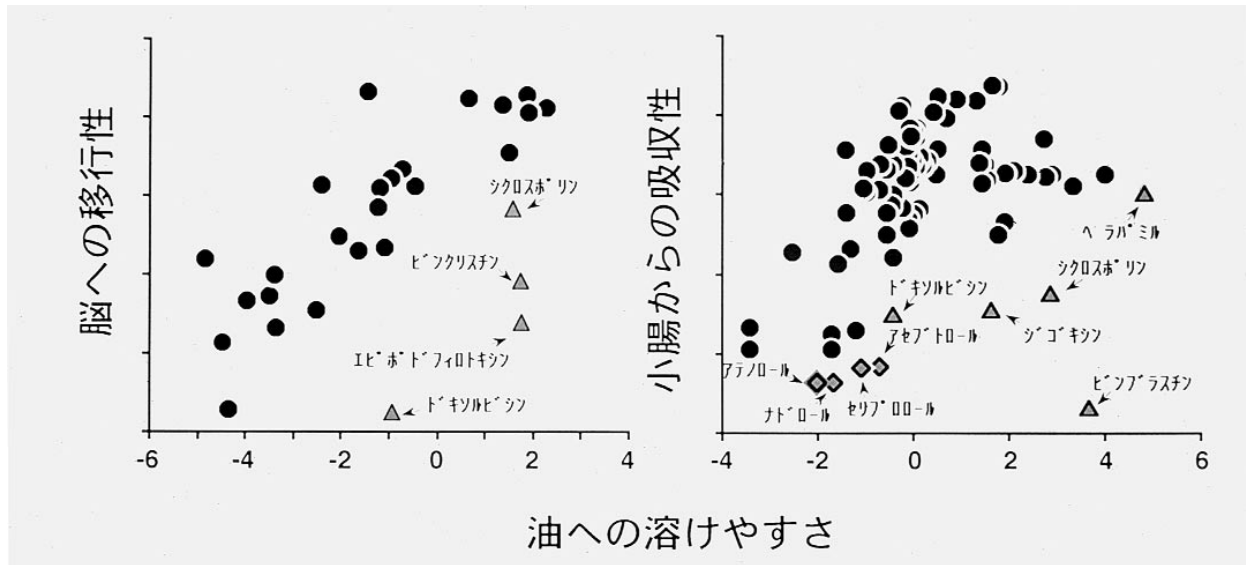
スライドは、横軸に脂溶性(油への溶けやすさ)、縦軸に小腸からの吸収性をとったグラフですが、P-糖タンパクの基質だけが消化管吸収性が落ちております。このことから多くの抗がん剤が経口剤として投与できないことがご理解いただけると思います。小腸において、P-糖タンパクが異物の進入に対してバリアとして働いているものと考えられます。

(スライド2参照)

P-糖タンパクと取り込みに働くトランスポーターが小腸に同時に発現し、P-糖タンパクの基質でもある薬剤で、取り込みにトランスポーターが関与している場合には、P-糖タンパクの阻害によって取り込みトランスポーターの機能が拡大し吸収率が增大する。一方、取り込みトランスポーターとP-糖タンパクの両方の機能を阻害すれば吸収率が落ちてくる、という例の一つをご紹介します。

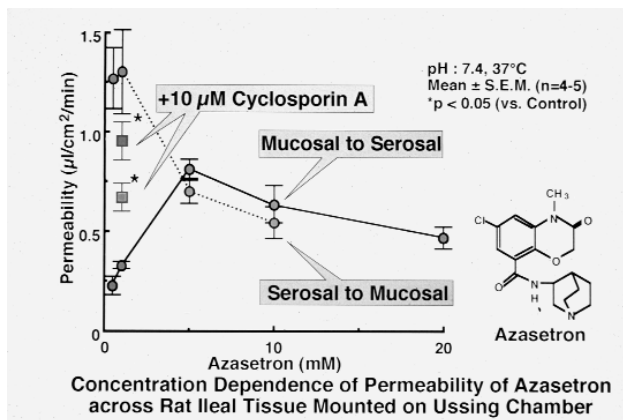
(スライド10)

アザセトロン (azasetron) は5-HT₃ レセプターのアнтаゴニストであります。抗がん剤による嘔吐の抑制に使います。スライドのグラフは、この薬剤のラット小腸の組織切片における血液側から管腔への移行(吸収)を実線で、管腔側から血液側の移行(分泌)を点線で示しておりますが、濃度の低いところでは分泌が主として起こります。シクロスポリンAで阻害することによって吸収が増大し分泌が減少するという結果から、P-糖タンパクが関与していることが分かります。アザセトロンの濃度を上げていきますと、吸収が増大し分泌が減少していきます。さ



薬物の血液脳関門透過性および
消化管吸収係数と脂溶性の相関

スライド 9



スライド 10

らに、濃度を上げていきますと、吸収が減少するという結果からP-糖タンパクによる排出とトランスポーターによる取り込みが起こっていることがわかります。このようにラットではP-糖タンパクによる排出とトランスポーターによる取り込みの両方が認められたわけです。一方、アザセトロンは経口剤として、最近JT(日本たばこ)から発売されました。ヒトでは90%以上の吸収率であります。恐らくヒトの小腸においてはアザセトロンを認識し輸送するトランスポーターが活発に働き、それらが主として機能するために、生物学的利用能(bioavailability)、すなわち吸収率が90%になったものと思われま。代謝されることなく尿中にほとんど未変化体として排出されます。

4 トランスポーターの生理機能と薬物動態
(スライド 11)

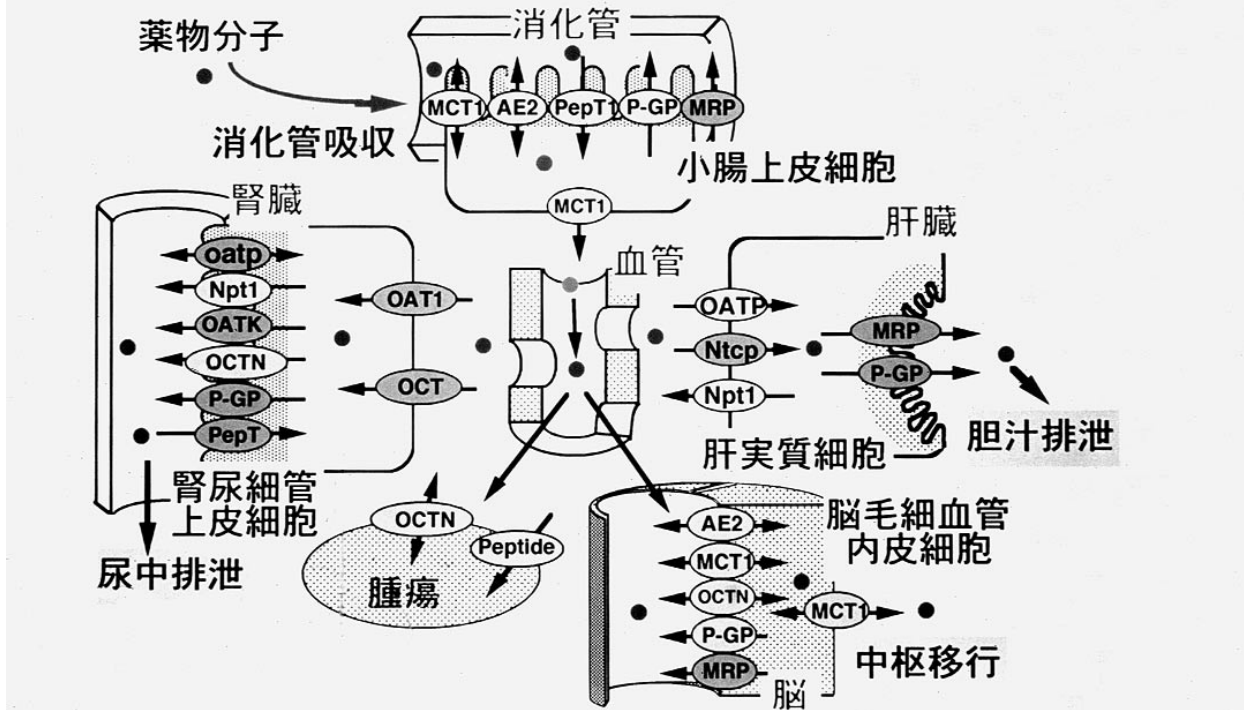
スライドは、2000年の今日まで世界中のトランスポーター研究者により明らかになったトランスポーターの臓器別の分布及び生体異物である薬物を運ぶトランスポーターの遺伝子がクローニングされたものを示しております。この中の一部は、私たちがクローニングと機能解析したものでございます。この中で、今日ご紹介いたしますのは、モノカルボン酸トランスポーター(MCT1とAE2)、ペプチドトランスポーター(PepT1)と有機カチオントランスポーター(OCTN)であり、OCTNは後程お話ししますがカルニチントランスポーターです。これらの機能についてご紹介させていただきます。

4.1 モノカルボン酸トランスポーターの発見及び機能

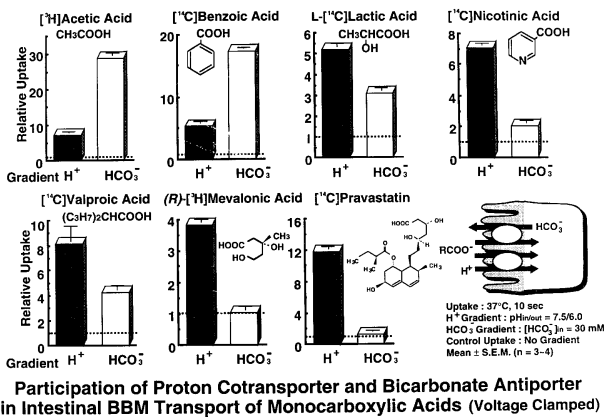
(スライド 12)

私たちは、薬物の吸収においてもトランスポーターが関与しているということから研究してまいりました。小腸の刷子縁膜(brush-border membrane)をとってまいりまして、小胞としてモノカルボン酸構造をもった化合物の取り込みを調べてみたわけです。そのときに、プロトン勾配を外から内側につけたときと、重炭酸イオンの勾配を膜の内側から外側に向けてつけたときに、モノカルボン酸類がどのように取り込まれるかを検討いたしました。ス

トランスポーターの生理機能と薬物動態



スライド 11



スライド 12

ライドにおける各グラフ上の点線は、いずれの勾配もつけないときの取り込みであります。左側の棒グラフはプロトン勾配のみをつけたときの取り込みであります。酢酸や安息香酸、ラク酸、ニコチン酸、バルプロ酸、メバロン酸、プラバスタチンを見ますと、プロトン勾配をつけたときにすべてのモノカルボン酸で取り込みが増大しております。一方、重炭酸イオンの逆勾配をつけた場合(スライド右側の棒グラフ)においても、この取り込みの増大が見られますが、メバロン酸、プラバスタチンにはその効果

は見られません。恐らく、プロトン勾配を駆動力とするトランスポーターと、重炭酸イオンとの交換輸送系のトランスポーターが別のものであるということの意味しているものと考え、私たちはこれらの結果を学会で発表してまいりました。

(スライド 13)

しかし、1950年代から広く認められています pH 分配仮説による吸収機構が主ではないかという反論もあり、私たちはトランスポーターをクローニングすることを目指し、医学部生化学講座の山本博教授の協力をいただきました。その結果、1995年に大学院の学生でありました高長ひとみ君がラットの小腸から、モノカルボン酸トランスポーター(MCT1)をクローニングすることができました。トランスポーターは、1994年前後からクローニングが始まりまして、スライドに示すように例外なく11回から12回貫通型、主として12回貫通型です。このトランスポーターMCT1が本当に外因性のモノカルボン酸を運ぶのかどうかに興味があるわけです。

(スライド 14)

そこで、ラットのMCT1トランスポーターをベクターに組み込み、細胞に発現させ、モノカルボン酸類の取り込みを調べました。MCT1を発現させない

Comparison of Amino Acid Sequence of Rat, Hamster and Human MCT1

Rat	1:MPPAIGPVGITPPDGGWGMVUVGAFISIGFSYAFPKSITVFFKELEIIFSATTSEVSW
Hamster	1:.....G..N.....
Human	1:.....V.....I.....G..H.....

Rat	61:ISSIMLAVMYAGGPISLILVNYKYSRPMIAGGCLSGCLIAAFCNTVQELYFCIGVIG
Hamster	61:.....V.....L.....
Human	61:.....G.....I..V.....Q..V.....

Rat	121:GLGLAFNLPALTMIGKYFYKRPVLANGLAMAGSPVFLSTLAPLNQAFGIFGWRGSFLI
Hamster	121:.....
Human	121:.....R.....C.....V.....

Rat	181:LGGLLNCCVAGSLMRPIGPQQKVEKLSKESLQEAGKS-----DANTDLIGGSPKG
Hamster	181:.....KP..I.....E.....M.....
Human	181:.....A.....KPT.AG.D..A..EK...GVKKDLH.....RH..Q

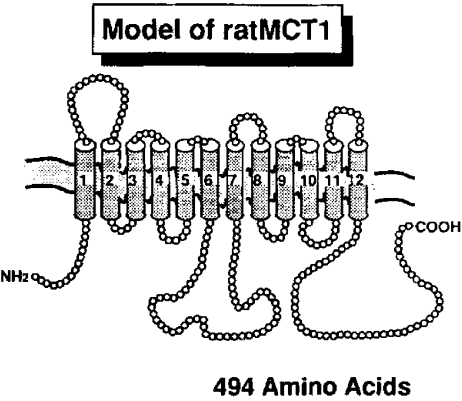
Rat	234:EKLSVFPQVNVKFLDLSLFTHRGFLLYLGSNVVVFGLFTPLVFLSNYGKSKHFSEKSAF
Hamster	234:..R..L..I.....A.....Q..Y.....
Human	241:..R...I..Q...T.....I.....A.....S...Q..Y.....

Rat	294:LLSILAFVDMVARPSHGLAANTRWIRPVQYFFAASVAVANGVCHLLAPLSTVYGFCIYA
Hamster	294:.....K.....I.....S..I.....
Human	301:.....V...KP.....M.....V.....

Rat	354:GVFGFAFGWLSVLFETLMDLVGPQRFSSAVGLVTIVECCPVLGPPLLGRLNDMYGDK
Hamster	354:.....
Human	361:..F.....

Rat	414:YTYMACGVILIIAGLYLFIGMGINYRLVAKEQKAE--KRRDGKEDTSTDVDEKPKKTM
Hamster	414:.....I.....KQ.QEE...D.....ELT
Human	421:.....V...S..I.....L.....N..Q--.KES..E...I..AG..NEVT

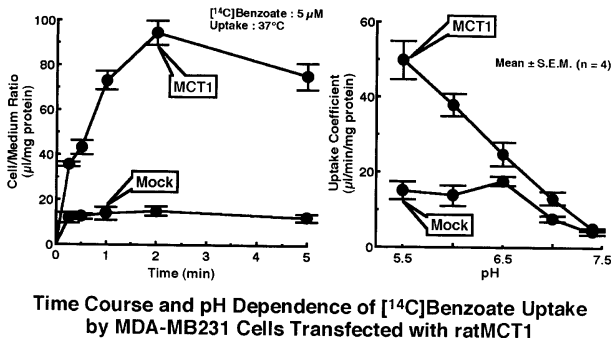
Identity of Amino Acid Sequences
 Rat vs. Hamster : 93.1 %
 Rat vs. Human : 84.6 %



Rat : 472:KETQSPAPLQNSGDPAAEEESPV*
 Hamster 474:..A.E...Q.....
 Human 479:..TAE..DQ-KDTE..G.K.....

Rat : Takanaga et al., Biochem.Biophys.Res.Comm., 217, 370-377 (1995)
 Hamster : Garcia et al., Cell, 75, 865-873 (1994)
 Human : Garcia et al., Genomics, 23, 500-503 (1994)

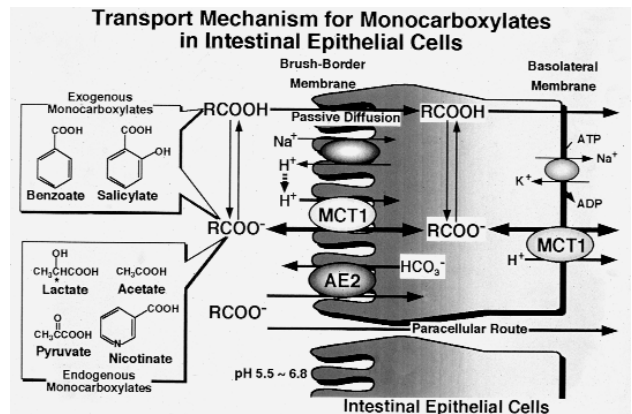
スライド 13



スライド 14

ベクターのみの系に比べて、MCT1を発現させた系では安息香酸という脂溶性モノカルボン酸の取り込みが高いことから、トランスポーターにより取り込まれることがわかります(スライド左図)。pHを酸性にもっていけば、極めて効率の良い取り込みが起こり、トランスポーターが発現していない細胞ではpH依存性が見られません(スライド右図)。(スライド 15)

このことから私たちは、従来から言われていた「受動輸送(passive diffusion)によって脂溶性の非イ



スライド 15

オン形のモノカルボン酸は膜を透過するけれども、アニオンは透過できない」という説に対して、プロトンとカップルしたトランスポーター(MCT1)がこれらの薬剤を認識し輸送するという事を見つけたわけです。また、重炭酸イオンとカップルしたトランスポーターについては、有機イオンのトランスポーター(AE2)を使いまして、このトランスポーターの活性を調べました。

(スライド16)

その結果をスライドに示します。AE2をHEK293細胞に発現させたものを用いております。AE2を発現させたもの(右側の棒グラフ)はベクターのみ(左側の棒グラフ)より多くのモノカルボン酸系の薬剤の取り込みの増大が見られます。ということは、重炭酸イオンとの交換輸送系、あるいはアニオンとの交換輸送系はモノカルボン酸を認識していると言えます。しかし、メバロン酸、プラバスタチンはまったく認識されず、輸送されません。

(スライド11参照)

MCT1は刷子縁膜と側底膜(basolateral membrane)の両膜に発現し、AE2は刷子縁膜に発現しております。これらのトランスポーターがモノカルボン酸系の薬剤を取り込み、血液中に送っているのだということを私たちは主張しているわけです。

一方、摂取したタンパク質やペプチドがジペプチドまたはトリペプチドとして吸収されるためのトランスポーターの存在は、1970年代ぐらいから示唆されておりましたが、その実体は長い間わかりませんでした。

4.2 ペプチドトランスポーター

(スライド17)

私たちが興味を持ちましたのは、β-ラクタム系抗生物質はペプチド構造をもっていて、アミノ基を有した薬剤のみが経口吸収されますが、ペプチド構造をもっていない、セファゾリン(cefazolin)のようなものは注射剤としてしか開発できず、なぜ経口吸収されないのかという点であります。あるいはセフジニール(cefdinir)やセフィキシム(cefixime)やセフトピテン(ceftibuten)のような、カルボン酸構造を有し、

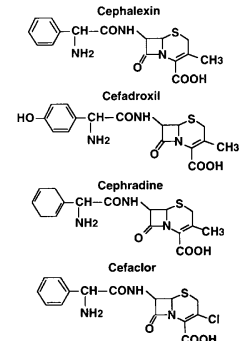
α-アミノ基を有しないタイプのペプチドであるβ-ラクタム系抗生物質が経口吸収されるのはなぜかということで、1975年以来この研究にとりかかってきました。

(スライド18)

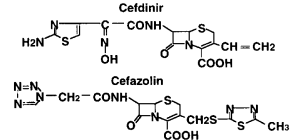
小腸刷子縁膜の小胞を使った研究によって、スライドに示すように内向きのプロトン勾配をつけたときに、つまり外側のpHを5.0、内側のpHを7.5としたときだけにオーバーシュート現象が出るということをも1987年に論文を出しました。ところが、ペプチドトランスポーターが本当に関与しているのか、という反論もでてまいりました。私たちは、1990年ごろから医学部の東田教授の協力を得まして、アフリカツメガエルの卵母細胞に遺伝子を導入して発現させるという研究をし、トランスポーター遺伝子を単離しようと努力いたしましたが、なかなかうまくいきませんでした。

Chemical Structure of β-Lactam Antibiotics

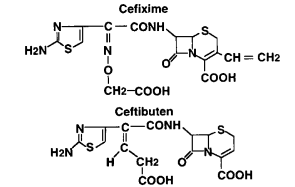
Amino-β-Lactam Antibiotics



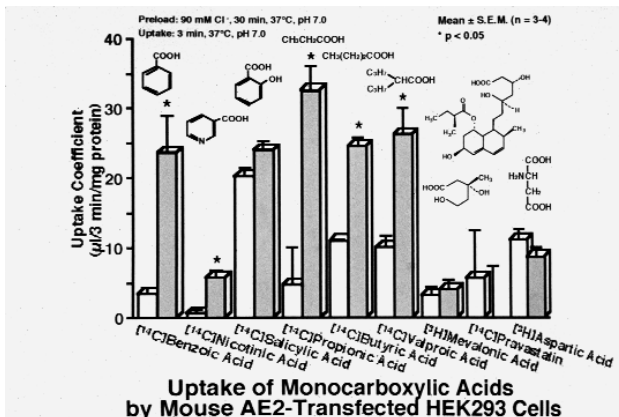
Monocarboxylic β-Lactam Antibiotics



Dicarboxylic β-Lactam Antibiotics

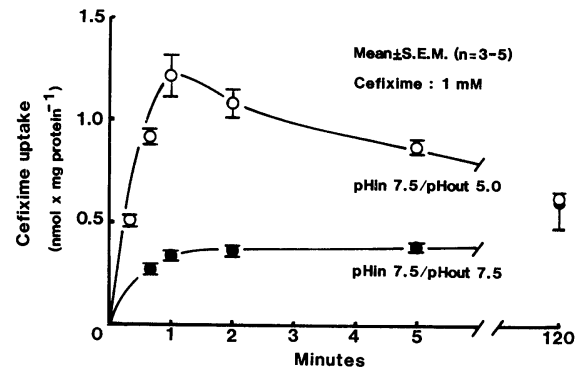


スライド17



スライド16

Uptake of Cefixime by Intestinal Brush Border Membrane Vesicles



スライド18

(スライド 19)

ところが、グルコースのトランスポーターをクローニングいたしました Hediger 博士と「ペプチドトランスポーターがプロトンとのカップル輸送である」ということを発見したアメリカジョージア医科大学の Leibach 教授とのグループが1994年に、ウサギの小腸から12回貫通型のペプチドトランスポーター PepT1 をクローニングいたしました。私たちは幸いラットでやっておりましたので、この情報を基にして、ラットのペプチドトランスポーター (PepT1) を単離いたしました。次にそれをアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて機能を調べてみたわけです。

(スライド 20)

まず、このトランスポーターが刷子縁膜のみに発現していることを医学部の井関教授の協力を得まして、確認いたしました。

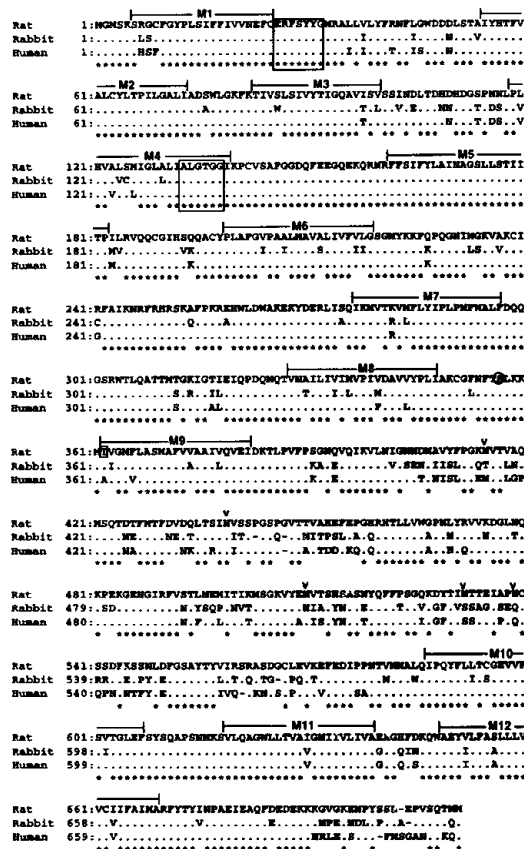
(スライド 21)

そして、ラットの PepT1 をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ実験しました。スライドは種々

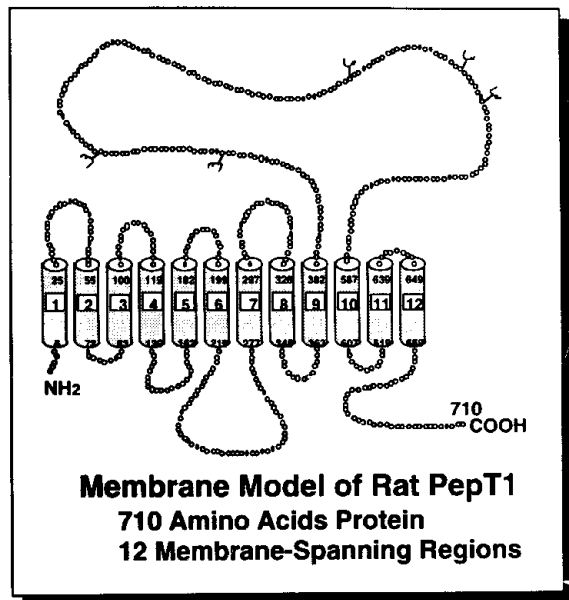
のβ-ラクタム抗生物質の卵母細胞による取り込みを示しています。コントロール(水を注入した系)は上段の棒グラフ、トランスポーターが発現した系は下段の棒グラフで示しました。セファゾリンは注射剤であります、まったく認識を受けません。しかし、経口性のセファロsporin (cephalosporin) 系のは吸収率に依存してトランスポート活性が見られました。セフチブテンは cis 体のみが高率に吸収されておりますが、trans 体はまったくヒトでは吸収されないということが報告されておりますので、その現象がうまく説明されております。

(スライド 22)

それでは、ヒトのペプチドトランスポーターはどういう機能を持っているかということで、PepT1 をクローニングすることに成功した Leibach 教授との共同研究によって得られた hPepT1 (ヒト PepT1) を発現させた系で調べてみました。スライドに示すように、β-ラクタム抗生物質で注射剤であるセフチゾキシムはまったく認識しません。一方、二つの陰イ



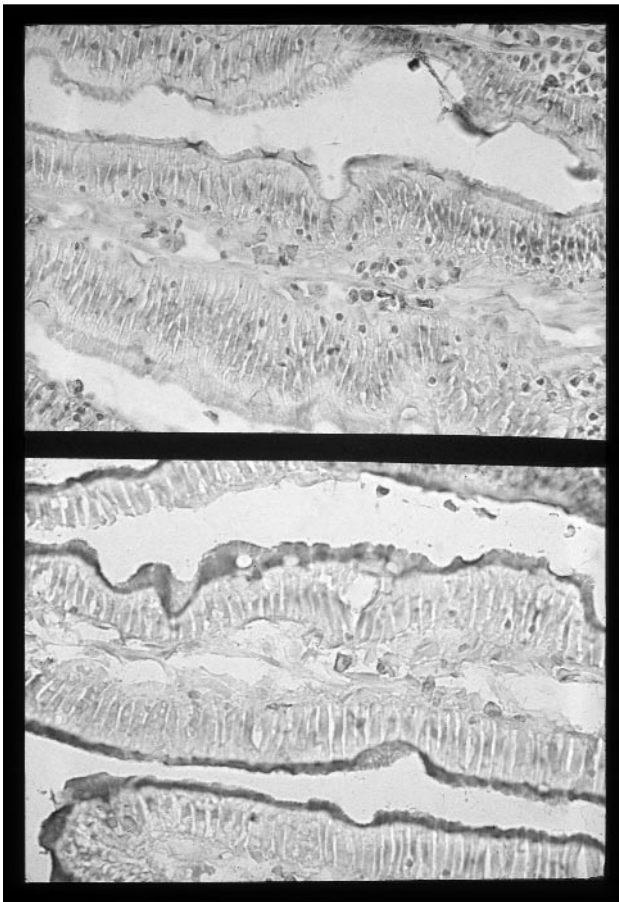
Rat: Miyamoto K. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1305, 34-38 (1996)
 Saito H. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 1631-1637 (1995)
 Rabbit: Fei Y.-J. *et al.*, *Nature*, 368, 563-566 (1994)
 Human: Liang R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270, 6456-6463 (1995)



Membrane Model of Rat PepT1
 710 Amino Acids Protein
 12 Membrane-Spanning Regions

Comparison of Amino Acid Sequences of Rat, Rabbit and Human PepT1

スライド 19

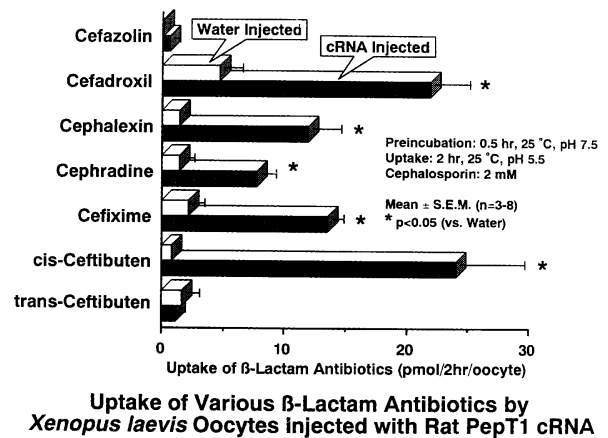


スライド 20

オン (dianionic) を持つ β -ラクタムであるセフィキシムやセフトチブテンを認識し輸送します。それから ACE 阻害剤であるテモカプリラート (temocaprilat) やエナラプリル (enalapril) のようなものを認識し輸送するというので、PepT1 はペプチド構造を持った医薬品を誤認識して、血液中に効率よく取り込む役割を果たしていることが分かります。経口性の β -ラクタム抗生物質や ACE 阻害剤の吸収性を決めている要因であることがはっきりしたわけです。

4.3 ペプチドトランスポーターを利用した創薬 (スライド 23)

それでは、このペプチドトランスポーター (PepT1) を使って、創薬ができないかということを考えてみます。L-DOPA はパーキンソン治療薬として使う薬ですが、これはアミノ酸輸送系を介して吸収されますが、脱炭酸を受けるためにドーパミンとなってしまいます。そのために、血液脳関門を透過できません。しかもアミノ酸輸送系に対する認識が低いために生物学的利用能 (bioavailability) が低いわけです。そこで私たちは、スライドに示すようにこの脱炭酸



スライド 21

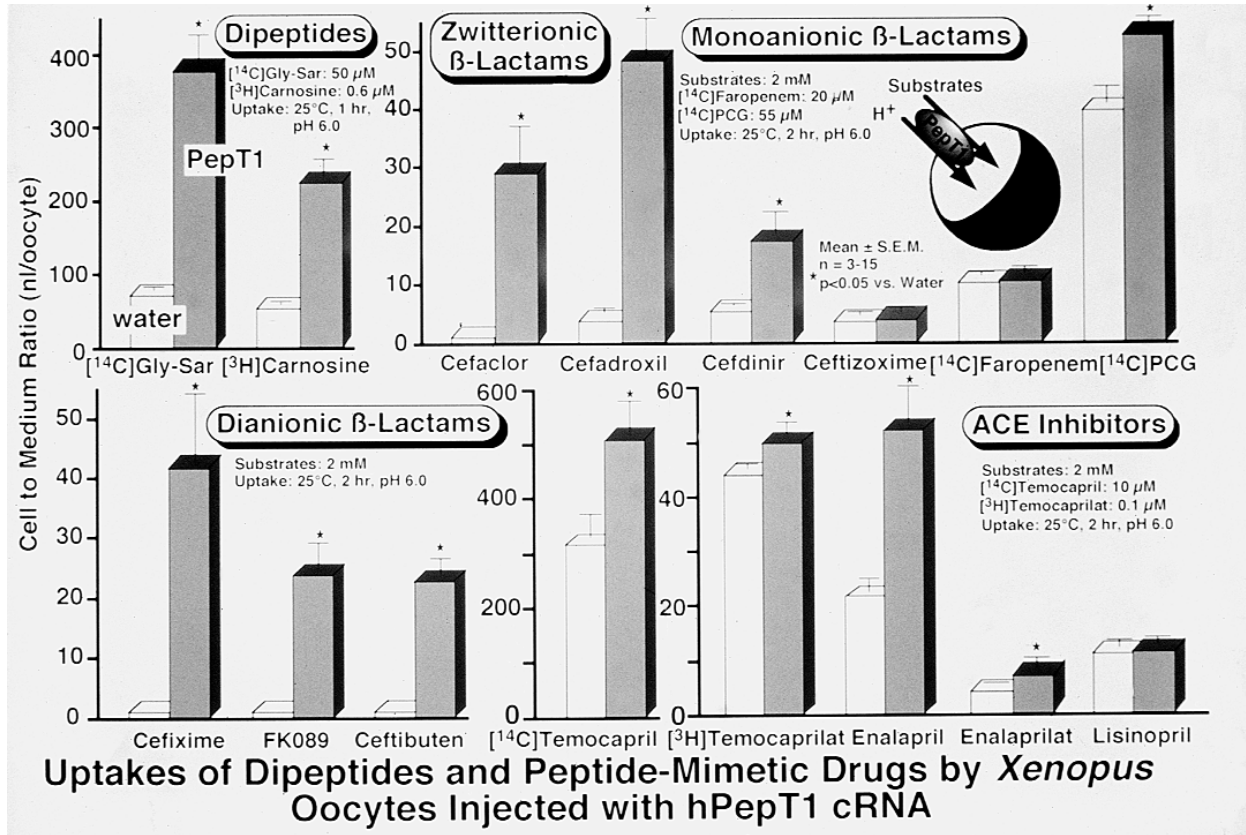
を防ぐためにフェニルアラニンをくっつけてジペプチド (dipeptide) とし、その新しく作った非天然のペプチド (L-DOPA-L-Phe) が PepT1 トランスポーターに認識され、輸送されるであろうという吸収経路の変換を考えてみました。

(スライド 24)

ヒトの PepT1 を発現させた系で見ると、アミノ酸自身はまったく認識を受けないけれども、新規合成ジペプチド (L-DOPA-L-Phe) はヒト PepT1 の認識を受けるということが分かりました。ペプチド化したプロドラッグによる創薬の可能性を示したわけです。ミシガン大学の Amidon 教授らとの共同研究で、L-DOPA の α 位にメチルが付いた α -メチル-L-DOPA、これは血圧降下剤であります。これにフェニルアラニンを付けてジペプチドとし、吸収率を 20% から 80% にあげることに成功いたしました。

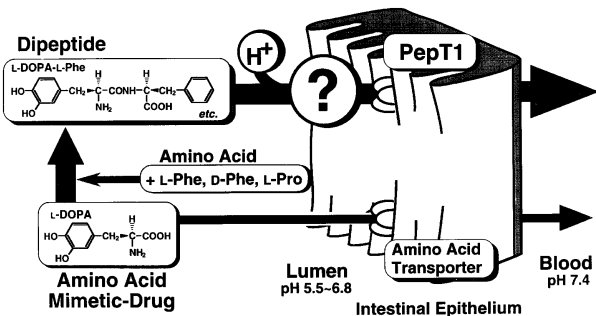
(スライド 11 参照)

スライドに示すように、ペプチドトランスポーターとして今日では PepT1 と PepT2 が知られていますが、その 1 つである PepT1 は小腸と腎臓のみに発現し、小腸の吸収に関わり、腎臓において再吸収に関わっています。その他の臓器では発現していません。しかし、面白いことにこのペプチドトランスポーターは、腫瘍細胞に高率に発現しております。つまり、生体内にあるアミノ酸源をとるために、眠っているトランスポーターが恐らく腫瘍細胞で発現したものと思われず。30 種類の腫瘍細胞について、がん研究所佐々木教授との共同研究で調べてみますと、ペプチドトランスポーターが腫瘍化することによって高度に発現することがわかりました。従って、経口によって腫瘍細胞にペプチド系抗がん剤をターゲティングできるということが可能になったわけです。

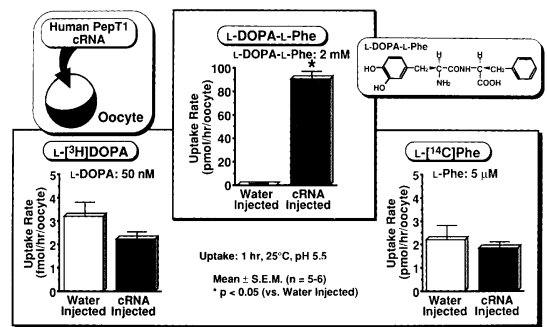


スライド 22

Strategy for Improving Oral Absorption – Peptide-Mimetic Drug –



スライド 23



スライド 24

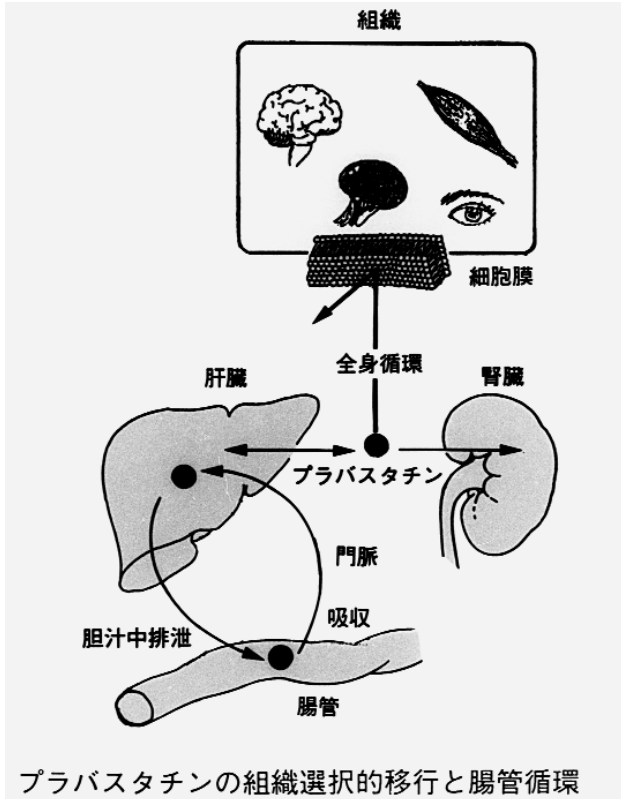
5 トランスポーター研究の重要性

薬物の膜輸送は、薬学的研究の中でも始まったばかりの研究領域でございます。つまり、トランスポーターの実体が分かったのは1994年からでありまして、最近の遺伝子研究で明らかにされたタンパク質の5～15%はトランスポーターです。今日临床上用いられている医薬品の約30%はトランスポーターあるいはチャンネルがターゲットとなっております。さらに、トランスポーターが薬物の吸収と体内動態において重要な役割を演じている事実が次々と明らか

にされ、全世界が今トランスポーター研究に熱くなっております。その例を紹介させていただきます。

5.1 プラバスタチン (高脂血症治療薬) の作用とトランスポーターの役割 (スライド 25)

例えば、経口高脂血症治療薬であるプラバスタチンは極めて親水性の高い薬剤であります。経口投与によって消化管から吸収され、プロトンカップルトランスポーターであるモノカルボン酸トランスポー

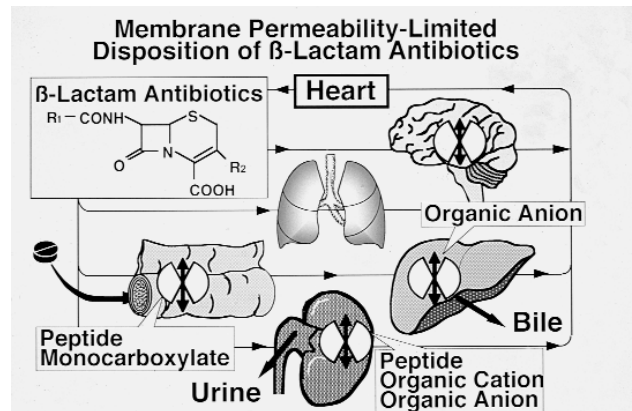


スライド 25

ターによって認識，吸収されます。このことは私たちの研究で明らかにしたものであります。それから，製薬会社の三共と東京大学の研究によってこのプラバスタチンは最近クローニングされた Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) によって認識され，肝臓に入り，HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (reductase inhibitor) として作用し，胆管膜中に存在する cMOAT という薬剤排出ポンプによって胆汁中に入り，腸管に排出されます。さらに腸管循環することによって，ターゲットである肝臓を攻撃するという高脂血症治療薬として作られており，その他の臓器には認識されずに体外に排出されていくという薬です。この薬 (プラバスタチン) はトランスポーター介在輸送を目的にして作られたわけではなくて，研究を進めているうちにトランスポーターがターゲティングをしているものであることが分かったのであります。

5.2 β-ラクタム抗生物質の作用とトランスポーターの役割 (スライド 26)

一方，今日感染症治療薬として極めて安全な薬として知られている β-ラクタム抗生物質ですが，このものは先程申しましたようにペプチドトランスポーターによって吸収されるか，あるいはモノカルボン



スライド 26

酸トランスポーターによって吸収され，尿中または胆汁中に排出されます。私たちはこれら抗生物質の輸送に係わるトランスポーターを特定し，その機能を明らかにすることができました。腎尿細管に発現するトランスポーターの分子認識によって多くのものが尿中へ，あるものは cMOAT の認識によって胆汁中に排泄される。つまり，トランスポーターを介して排泄経路の変換が行われます。一方，その他の臓器には β-ラクタム抗生物質を輸送するトランスポーターがないために，他の臓器の細胞内には入ることはできないけれども，細胞間液に入って体循環系をまわり細胞間隙中の感染症の原因となる細菌のみを攻撃するという選択毒性を持って体内から抜けていくわけです。一方，脳に入りますと痙攣を起こさせます。脳には β-ラクタム抗生物質を排除するトランスポーターがあることが見つかってまいりました。このトランスポーターの実体はまだ分かっておりませんが，脳に移行しないようになっていることが，この β-ラクタム抗生物質が安全な薬として今日も広く使われている由縁でございます。

5.3 カルニチン欠損症モデルマウス (JVS) とトランスポーター

5.3.1 カルニチン欠損症モデルマウスの特徴 (スライド 11 参照)

もう一つ興味あるトランスポーターは OCTN です。このトランスポーターは，私たちが中分子医学研究所との共同研究によってクローニングしたものです。OCTN トランスポーターの機能について少し紹介させていただきます。

(スライド 27)

金沢大学の動物実験施設において JVS (Juvenile Visceral Steatosis) マウスが発見されました。今から

10年前に二階堂博士らが見つけたものであります。このJVSマウスは、一次性的カルニチン欠損症のモデルとして脂肪肝が起こったり、心臓の肥大があったり、その他の現象がすべてヒトに起こっているカルニチン欠損症に似ているということが分かっております。今から3年前に、医学部附属動物実験施設の早川教授からこのカルニチン欠損症モデルのJVSマウスでは恐らくトランスポーターが欠損していると思われるので、そのトランスポーターを単離することをやってくれないだろうか、ということで研究を開始しました。

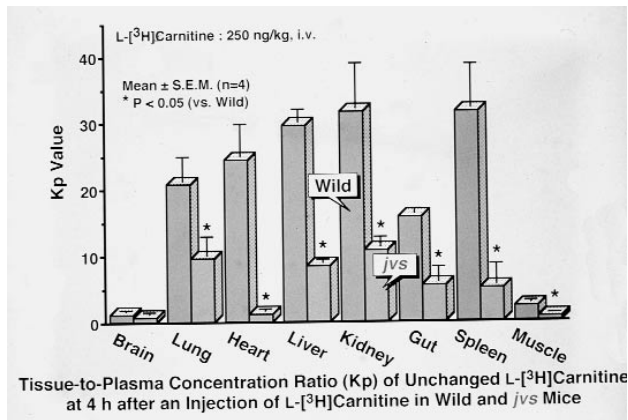
(スライド28)

このJVSマウスに $[^3\text{H}]$ -カルニチンを投与して組織中と血液中の比をとりますと(スライド右側の棒グラフ)組織には移行しないけれども、正常の野生型(wild-type)(スライド左側の棒グラフ)では極めて高い割合で組織に移行しております。このことからJVSマウスではカルニチンが全組織にわたって移行性が低いということが分かりました。つまり、カルニチントランスポーターがJVSマウスの全身において欠損していることが理解できたわけです。

JVS (juvenile visceral steatosis) マウスの病態

- ① 脂肪肝 (生後5日以内に出現)
- ② 心臓の肥大 (授乳期後半から出現)
- ③ 高アンモニア血症 (")
- ④ 低血糖 (")
- ⑤ 全身性のカルニチン欠乏
- ⑥ 繁殖障害
- ⑦ 成長障害
- ⑧ 低体温 (室温24°C)

スライド27



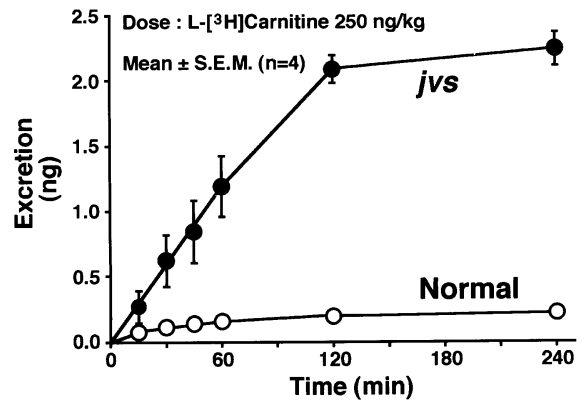
スライド28

(スライド29)

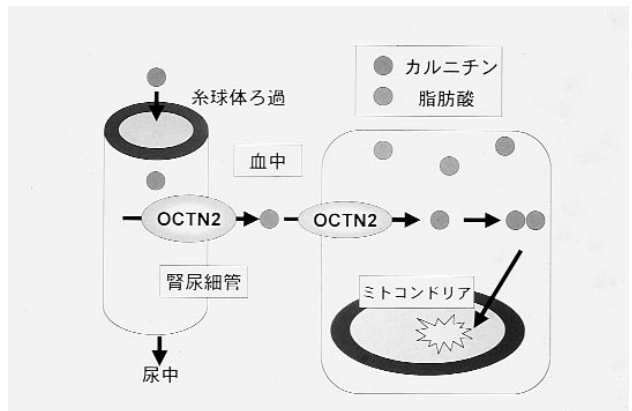
また尿中回収率におきまして、野生型では尿中にほとんどでてこないけども、JVSマウスでは尿中にほとんどでてしまう。つまり、再吸収されないために、血液中のカルニチンが保てないということでもあります。そういうことで、このトランスポーターを何とかクローニングしようとして努力したのですが残念ながらうまくいきませんでした。

(スライド30)

カルニチンの機能ですが、カルニチンは血中において、糸球体ろ過され、尿細管より再吸収され、組織の細胞内に入って脂肪酸の β -酸化に重要な役割を演じています。そういうことで、恐らくこのトランスポーターが何らかの形で欠損することによって、JVSマウスの病態を引き起こしている。このトランスポーターの実体をとりようと思ってやっていたのですが、偶然にもOCTN2というカルニチントランスポーターを私たちはクローニングすることができました。



スライド29



スライド30

5.3.2 OCTN2 トランスポーターとカルニチントランスポーター

(スライド 31)

私たちがクローニングした OCTN1, OCTN2 のそれぞれマウスとヒトの系統樹を調べてみますと、有機アニオントランスポーター (Organic Anion Transporter, OTA) と有機カチオントランスポーター (Organic Cation Transporter, OCT) の間にはいります。つまり、カチオンを認識し、アニオンも認識する何らかの特異的なトランスポーターでないだろうかということが推測されました。

(スライド 32)

OCTN1 と OCTN2 の組織分布を見ますと、OCTN2 は組織に広く分布しております。また、腫瘍細胞にも発現しておりますが、正常な組織にほとんど発現しております。

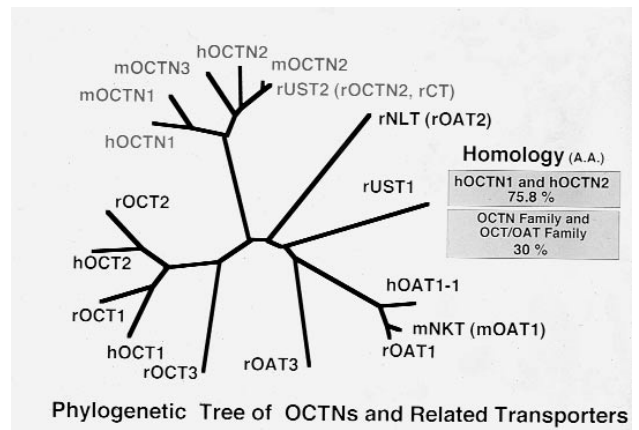
(スライド 33)

そこで私たちは、ひょっとしたら私たちがとった有機カチオントランスポーターである OCTN1 の相同体 (homologue) である OCTN2 は私たちが探し求めていたカルニチントランスポーターの実体ではないかと考え、調べてみました。その結果、OCTN1

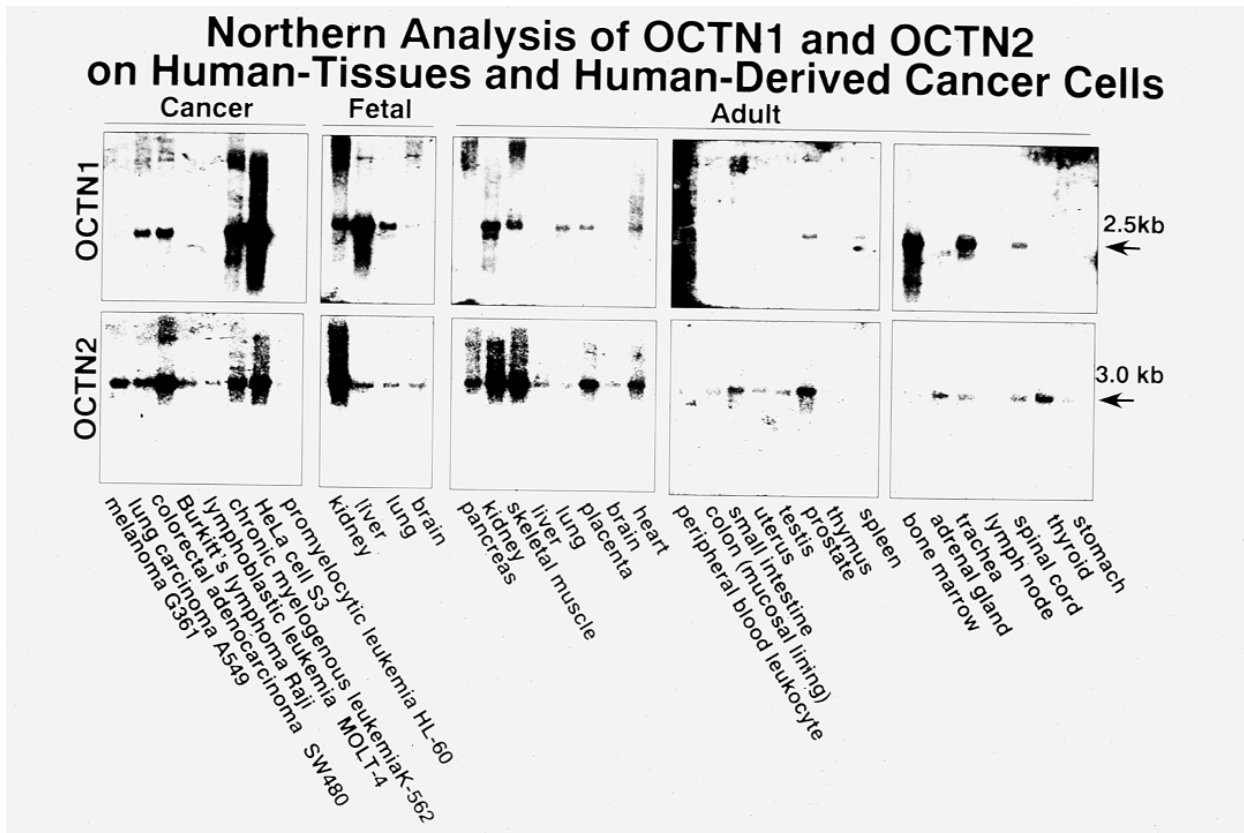
は有機カチオンを運ぶけれども、OCTN2 は有機カチオンを運びにくい。しかし、OCTN2 は極めて効率よくカルニチンを輸送しました。そこで、*JVS* マウスにおいてカルニチンを輸送する hOCTN2 (ヒト OCTN2) のカウンターパートをとっていろいろということになったわけです。

(スライド 34)

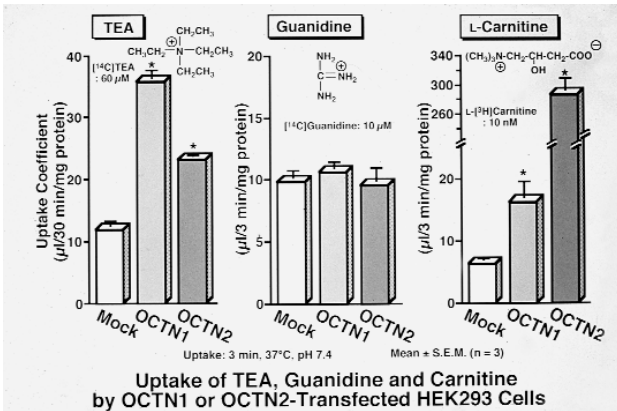
マウスの OCTN2 をクローニングいたしました。ヒトとは、85.5% の相同性をもっております。



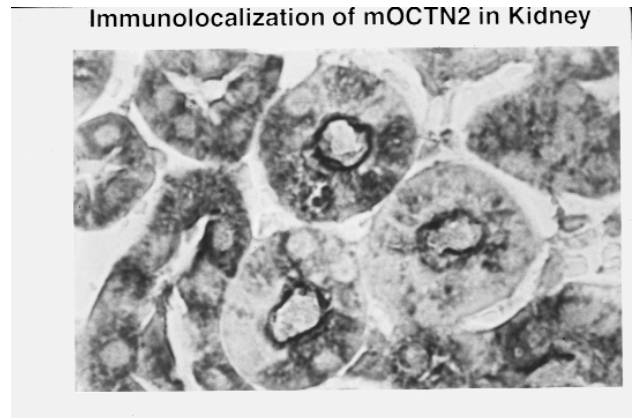
スライド 31



スライド 32



スライド 33



スライド 35

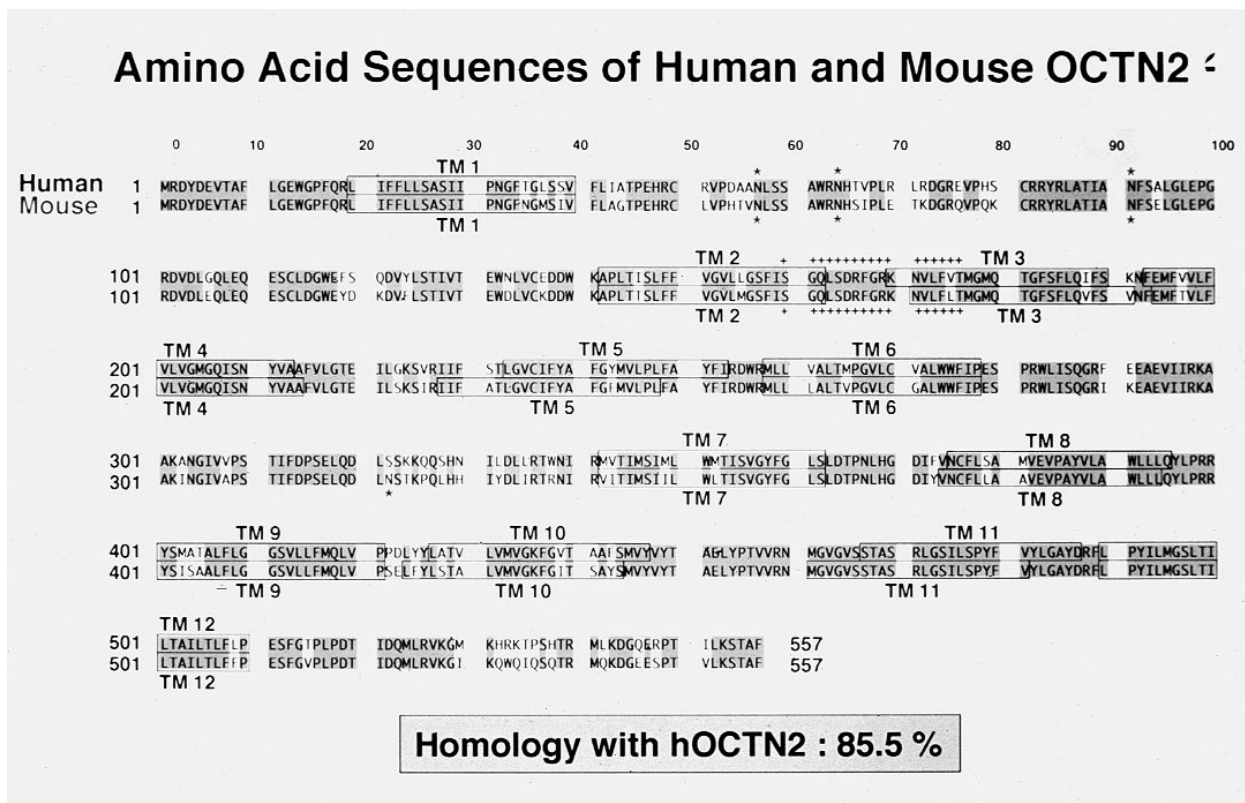
(スライド 35)

OCTN2 がマウスのどこに発現しているか調べてみますと、腎の尿細管の刷子縁膜側に高度に発現していることが分かります。これには医学部保健学科の河原教授の協力を得ました。尿中のカルニチンは、OCTN2 のナトリウム依存的な取り込みによって細胞内に再吸収されます。そこで、*JVS* マウスでは OCTN2 が欠損しているのではないかと考えられました。

5.3.3 カルニチン欠損症患者のトランスポーター (OCTN2) 変異

(スライド 36)

JVS マウスの OCTN2 を調べてみますと、352 番目のロイシンがアルギニンに変化している点突然変異でした。取り込み活性を見てみますと、野生型では TEA (tetraethylammonium) とカルニチンの両方を運ぶのですが、*JVS* マウスでは有機カチオンも運ばずカルニチンも運ばないということが分かりました。従いまして、*JVS* マウスの欠損の原因遺伝子が



スライド 34

OCTN2であることが分かったわけです。そうしますと、私たちが興味をもったのは日本全国への全身性カルニチン欠損患者において、OCTN2の関係はどうかということでした。そこで、秋田大学、東北大学、久留米大学の協力を得まして、患者の家系の遺伝子解析をいたしました。さいわい、日本で三家系だけが生きておられまして、カルニチンを毎日服用するによって現在健康でおられます。

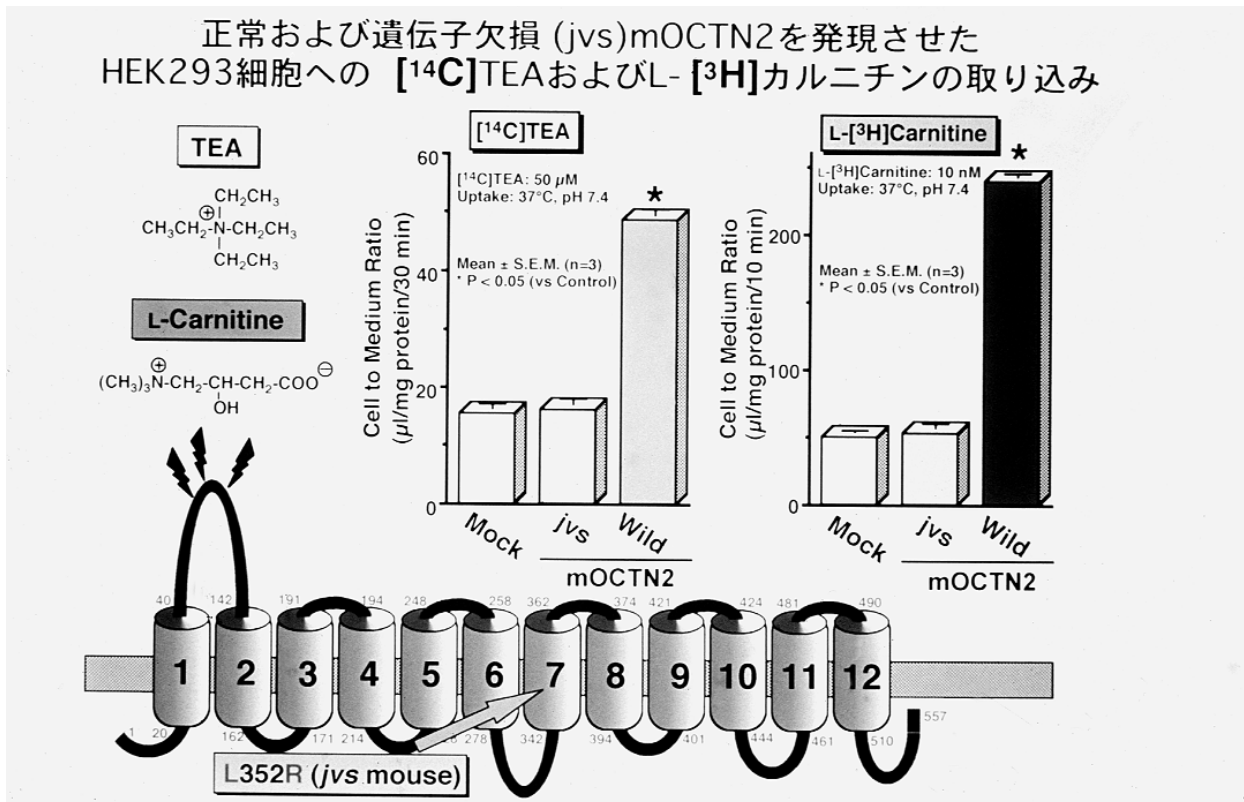
(スライド 37)

その家系を調べてみますと、まずKRの家系にお

いては近親結婚の組み合わせがあり、その子達(1番~6番)にRFLP解析をやってみますと、現在健在でおられる3番と4番の患者さんにおいては、正常な遺伝子が全くなくて、突然変異体のみです。1番, 2番, 5番, 6番が正常なトランスポーターと突然変異の両方持ったヘテロであります。

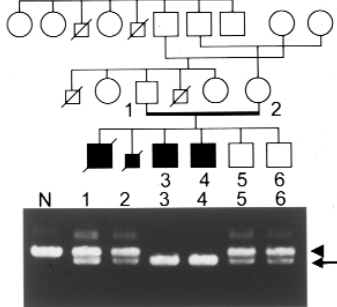
(スライド 38)

またTHの家系におきましては、エクソン8の末端において、AGがAAになったsplicing site mutationでした。



スライド 36

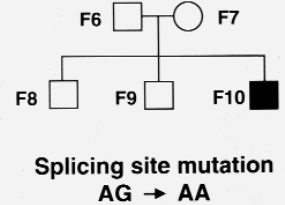
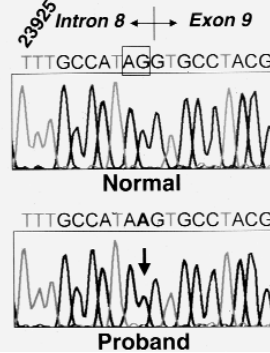
PCR Analysis of Exon 1 of *SLC22A5* in Family KR



Numbered family members were examined for genotype. 113-bp deletion was detected as shown by arrow. Arrow-head shows normal. 3,4: Homozygous; 1,2,5,6: Heterozygous

スライド 37

Mutation of *SLC22A5* in Family TH



Splicing site mutation
AG \rightarrow AA

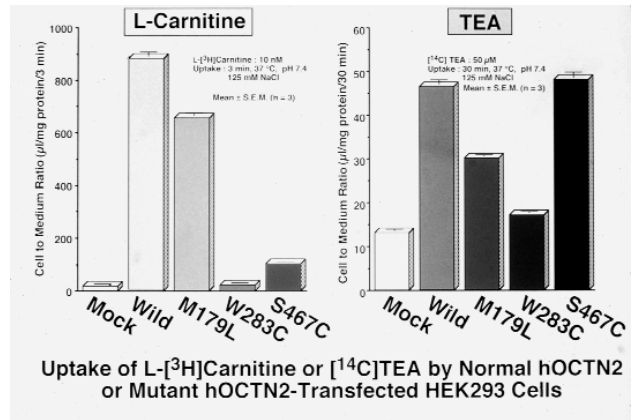
スライド 38

(スライド 39)

日本の患者については、スライドに示すように TH の家系の患者さんはフレームシフト突然変異、先程の KR の家系の人は欠損(deletion)でございます。それから TH の家系はスプライシングです。その他、アメリカ、ドイツ、カナダの患者さんで調べてみますと、すべてに OCTN2 に変異が見られました。また興味あることに、共同研究者である秋田大学(現京都大学)小泉教授が自動車を作るディーラー 1,000 人に対して、表現型と遺伝子型の分類 (phenotyping と genotyping) をやったわけです。Phenotyping はカルニチンの血中濃度が低く、尿中のカルニチンの排泄が高い人だけにインフォームドコンセントをとりまして、genotyping をやったところ、0.8% の割合で、ヘテロでありました。ということは、ホモが 6 万人に 1 人の可能性があるという極めて高い遺伝子欠損であります。その内の正常な人から見つかったのが 467 番目のセリンがシステインに変わっているものです。この変異は極めて興味深いものでした。

(スライド 40)

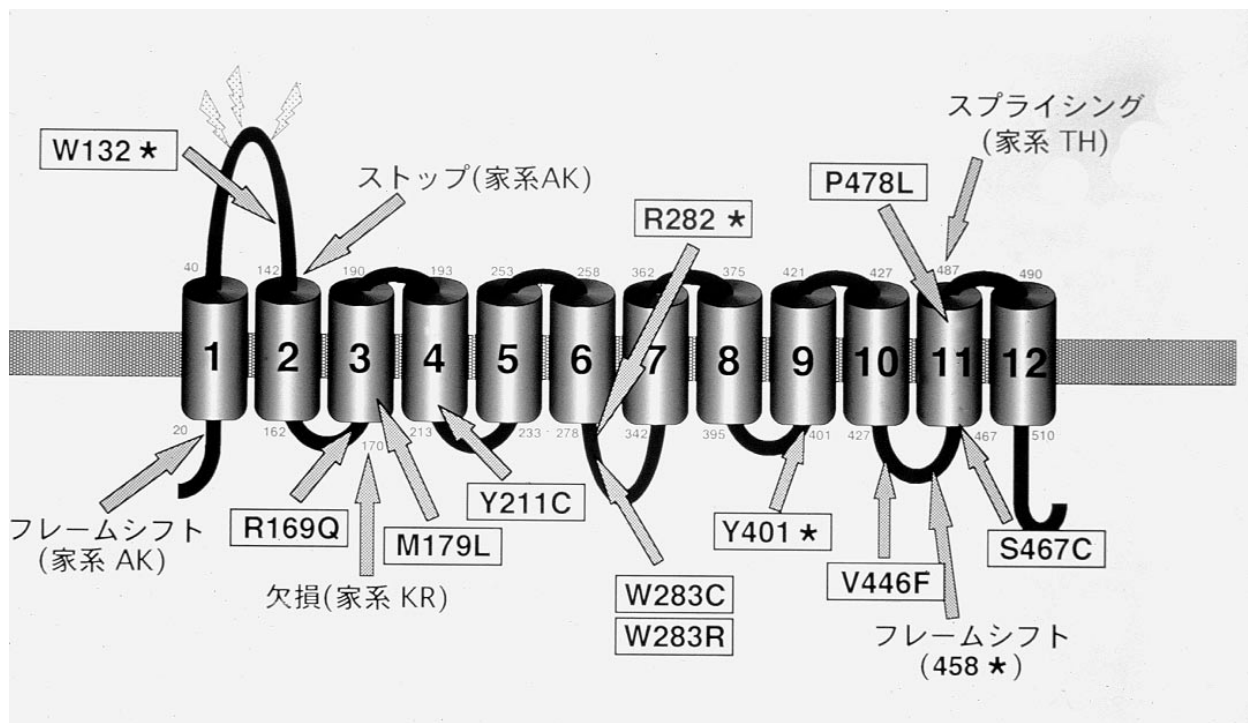
467 番目がセリンがシステインに変わったものはカルニチンを全く運ばないけれども、TEA の輸送活性は全く落ちていないという結果です。その他の変異につきましても、トランスポート活性に何らかの変化がありました。



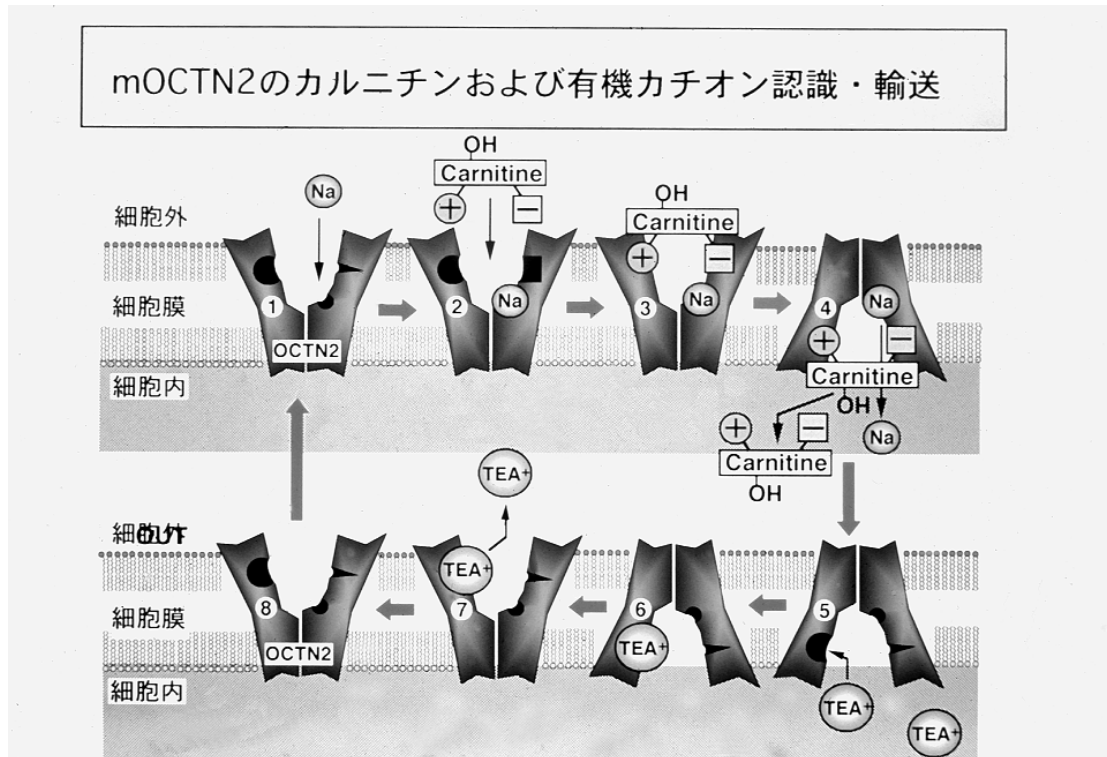
スライド 40

(スライド 41)

OCTN2 はカルニチンをナトリウム依存的に細胞外から細胞内に取り込むと同時に、細胞内にある有機カチオンをナトリウム非依存的に細胞外に排出するという性質を持っています。一つのトランスポーターが、生体にとって必要なものを取り込み、細胞内にある不必要な有機カチオンを排除する多機能性トランスポーターであるということが分かってきたわけです。



スライド 39



スライド41

6 まとめ

(スライド1参照)

カルニチントランスポーターの発見をきっかけにして、私たちは病態とトランスポーターの多型との関係に多大の関心を寄せております。このようにトランスポーターの薬剤輸送あるいはこれとの相互作用を解明することによって、薬剤を投与後適量な量を尿中に排泄させる、あるいは胆汁中に排泄させる。そして特定の臓器に移行させ、不必要な臓器に移行させないというドラッグデザインが可能になってくるのではないかと考えています。こういう観点から研究を続けております。

(スライド2参照)

最初に申しましたように生体膜が、生体にとって必要なものを積極的に取り込み、そして不必要なものを排除し、代謝変換によって代謝産物を体外に排出するという生体におけるトランスポーターと化学変換による生体防御のシステムを解明していきたい。そういうことで私たちは多くの先生方の協力を得ながら、この研究を進めてまいりました。

7 謝辞

以上の研究は先程申しました先生方の協力を得て完成したものであります。私たちだけでは決して研究は展開できなかったわけです。近くに優秀な、そして協力していただける先生方がおられるということは、私たちにとって極めて幸せではなかったかと思えます。また、アイソトープの使用によって本研究が達成できました。ここに本学アイソトープ総合センターの皆様のご協力に感謝する次第です。

最後に現在私たちの研究室において、活躍してくれる玉井助教授、崔助手と大学院の学生がリードをし、そして学生諸君が一丸となって朝から遅くまで私の厳しい叱咤に耐えて研究をしていただいた。今日このような結果を得ることができたわけでありませう。これらの諸氏に感謝する次第です。どうもご清聴ありがとうございました。

(平成12年5月9日開催の金沢大学アイソトープ総合センター開設20周年記念講演会の講演録)