

東邦大学学術リポジトリ



OPAC

東邦大学メディアセンター

タイトル	電気生理学的手法を用いたヒトNa+/taurocholate(TCA)共輸送ポリペプチド(hNTCP)の基質輸送機構の解析
作成者(著者)	増田, 雅行
公開者	東邦大学
発行日	2015.03
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 66.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 宮内
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第775号
学位授与年月日	2015.03.18
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD20975047

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

電気生理学的手法を用いたヒト Na^+ /taurocholate (TCA) 共輸送ポリペプチド (hNTCP) の基質輸送機構の解析

薬物動態学教室 増田雅行

【目的】

胆汁酸は、肝臓でコレステロールから産生され、胆汁中に分泌される比較的親水性のコレステロール誘導体である。胆汁酸の分泌は、胆汁流量の維持や胆汁脂質の分泌促進のみならず、コレステロールの恒常性の維持においても重要な役割を担っている。さらに、小腸に分泌された胆汁酸は、脂溶性ビタミンやコレステロール、水に不溶な薬物等の多くの脂溶性物質の可溶化剤としても機能している。

小腸に分泌された胆汁酸は、95%以上が小腸上皮細胞により再吸収を受け、門脈から肝臓へと運ばれ再び肝細胞に取り込まれる、いわゆる腸肝循環を受けている。これまでの研究から、胆汁酸の腸肝循環には肝臓、小腸上皮細胞において胆汁酸の取り込みを担う輸送担体の関与が明らかとされており、肝臓では主に Na^+ /TCA 共輸送ポリペプチド (NTCP, SLC10A1) が関与している。胆汁酸の肝細胞への取り込みにおいて、その80%が Na^+ 依存的な輸送機構による取り込みであることから、NTCP は胆汁酸の肝取り込みにおける主要輸送担体として重大な役割を担っている。このため、NTCP を介した胆汁酸の取り込みが阻害されると、胆汁酸血中濃度の顕著な上昇が起こり、細胞毒性、細胞膜の損傷、ミトコンドリアの機能不全や細胞代謝の変化などが惹起される。近年、NTCP は、胆汁酸以外にも構造の異なる様々な薬物を輸送することが明らかにされてきた。この NTCP の幅広い基質認識性により、NTCP を介した薬物間相互作用や薬剤による NTCP の阻害に起因した胆汁酸の恒常性の破綻、それに伴う毒性の惹起が報告されている。更に、この NTCP の持つ幅広い基質認識性より、肝臓を治療対象とする薬物の肝臓への移行性が向上した例が多数報告されており、NTCP が肝臓への薬物送達のターゲットとして注目されており、NTCP は薬物動態学の観点から、重要な輸送担体の一つとなっている。

ところで、NTCP は、 Na^+ と胆汁酸を共輸送するということは十分に証明されているものの、輸送分子機構: (i) 胆汁酸に対する Na^+ の化学量論比や輸送担体の起電性, (ii) 基質認識機構等に関する詳細については不明な点が多く残されている。そこで、我々は、NTCP の起電性を基質一誘起電流の測定により解明するために、大量かつ安定な機能を保持できることが期待出来る、hNTCP のアフリカツメガエル卵母細胞発現系の確立を行った。更に、この発現系を用いて、hNTCP による胆汁酸の基質輸送機構の詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】

アフリカツメガエル卵母細胞における hNTCP 発現系: ヒト肝臓 totalRNA より RT-PCR により hNTCP をクローン化し、アフリカツメガエル卵母細胞発現ベクター-pGH19 組み込み RNA 合成プラスミド (hNTCP/pGH19) を構築した。hNTCP/pGH19 を鋳型として cRNA を合成し、卵母細胞に cRNA (10ng) をインジェクションした。卵母細胞は、3日から4日間、18°Cでインキュベート後、実験に用いた。hNTCP の代表的基質である TCA の ^3H 標識体 [^3H]TCA を用いて、TCA 輸送活性を測定した。放射活性は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2910TR, PerkinElmer Inc.) を用いて定量した。

初代肝培養細胞を用いた取り込み実験: Sprague Dawley 系雄性ラット (6週齢) からコラゲナーゼ処理法に従い、肝細胞を遊離した。William's E 培地 (10% FBS, 10 nM insulin, 5 nM デキサメタゾン) 、37°C、5% CO_2 /95% air、の条件下で 20 時間培養したものを TCA 取り込み実験に用いた。 [^3H]TCA を用いて、TCA 輸送活性を測定した。

基質輸送に伴った誘起電流の測定: hNTCP の cRNA インジェクション 3~4 日後、基質輸送に伴った誘起電流を二電極電圧固定 (TEVC) 法 (膜電位 -50 mV 固定、CEZ1250 (日本光電 (株))) により測定した。

【結果および考察】

1 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた hNTCP 発現系の構築

hNTCP の cRNA を卵母細胞にインジェクションを行い、機能解析に最適な hNTCP の卵母細胞における発現系の構築を行った。典型的な NTCP の基質である TCA を用いて、取り込み輸送活性を検討した (図1)。hNTCP の cRNA インジェクション卵母細胞は、コントロール卵母細胞に比べ 300 倍以上の TCA 輸送活性を示した。この顕著な輸送活性は Na^+ 非存在下ではコントロール卵母細胞と同レベルにまで低下し、 Na^+ 依存性 TCA 輸送であることが示された。この Na^+ 依存性 TCA

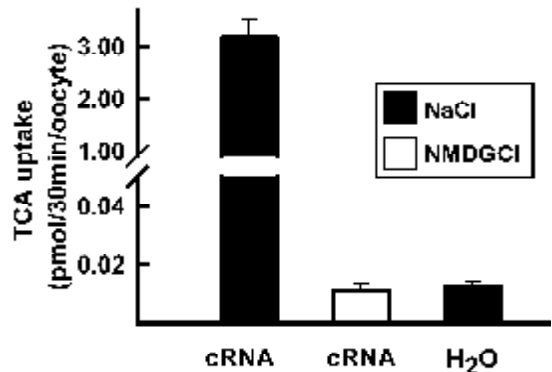


図1 hNTCP 発現卵母細胞への TCA の取り込み

輸送活性が hNTCP を介した TCA の取り込みか否かを検討するために、基質濃度依存性および Na^+ 濃度依存性を検討した (図2)。TCA 取り込み輸送活性は基質濃度の増大に伴い、ミカエリスメンテン型の飽和性を示した (図2A)。

Eadie-Hofstee プロット (挿入図) より、一つの飽和コンポーネントからなることが明らかとなった。そのミカエリス定数 (K_m) は $10.5 \pm 2.9 \mu\text{M}$ 、最大取り込み速度は $18.6 \pm 1.5 \text{ pmol}/10 \text{ min}/\text{oocyte}$ と算出された。

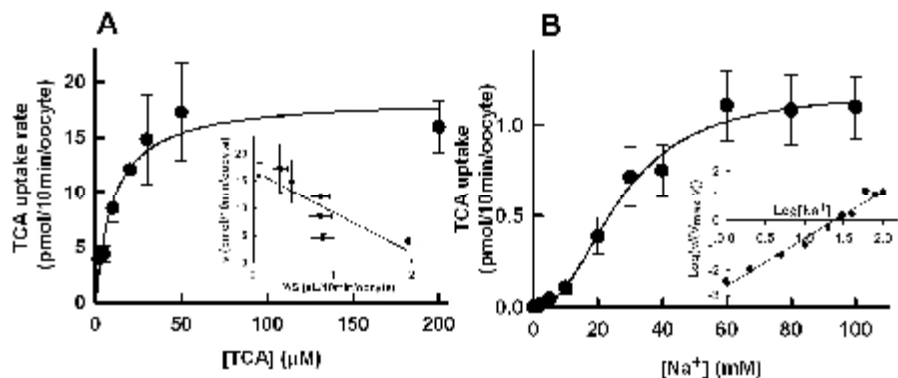


図2 hNTCP を介した TCA 取り込みの速度論的解析

卵母細胞発現系における K_m 値は、hNTCP 動物細胞発現系あるいはヒト肝細胞を用いて求められた K_m 値と同程度の値を示した。一方、TCA と共輸送される Na^+ 濃度を増加させたときに、TCA 取り込み速度がどのように変化するかを測定した (図2B)。TCA 取り込み速度は、 Na^+ 濃度の増加に伴い、シグモイド型の飽和を示した。図2B 挿入図に示す Hill プロットにより、Hill 係数 $h = 1.9 \pm 0.1$; $K_{0.5} = 26.9 \pm 2.0 \text{ (mM)}$ と算出された。このことにより、hNTCP を介した 1 分子の TCA の輸送は、少なくとも 2 個の Na^+ が共輸送される、起電性輸送であることが示唆された。更に、taurochenodeoxycholate、cholate、deoxycholate、ursodeoxycholate や lithocholate などの内因性の胆汁酸 (BA) を含む様々な化合物による TCA 輸送活性阻害により、卵母細胞に発現した hNTCP の基質認識性を検討した (図3)。TCA の輸送活性は、濃度依存的に顕著に阻害され、卵母細胞発現の hNTCP が動物細胞発現系およびヒト肝細胞における hNTCP の基質認識性と同様の性質を示した。一方、胆汁酸とは全く構造の異なるフルバスタチンやロスバスタチン等のスタチン系化合物も TCA 輸送活性を濃度依存的に阻害したことから、hNTCP が BA と構造の異なる化合物も輸送基質として認識する能力を有していることが示唆された。

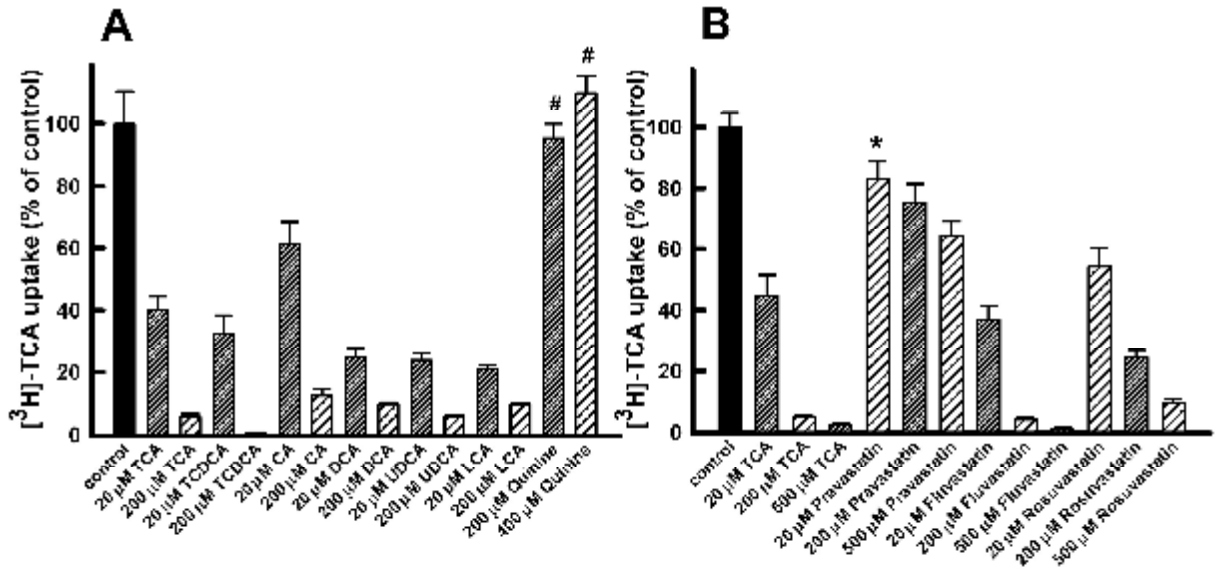


図3 TCAの取り込みに対する各種胆汁酸 (A) およびスタチン系化合物 (B) の阻害効果

TCDC A : taurochenodeoxycholate, CA : cholate, DCA : deoxycholate, UDCA : ursodeoxycholate, LCA : lithocholate
 #: 有意差なし, *: $p < 0.05$, マークなし: $p < 0.01$

2 アフリカツメガエル卵母細胞発現系 hNTCP と初代培養肝細胞における内在性 NTCP との相同性

アフリカツメガエル卵母細胞に発現している hNTCP が肝細胞に内在的に発現している NTCP と同様の機能を保持しているか否かを確認するため、初代培養ラット肝細胞を用いて TCA の取り込みにおける Na^+ 依存性を検討した。図4には、初代培養肝細胞

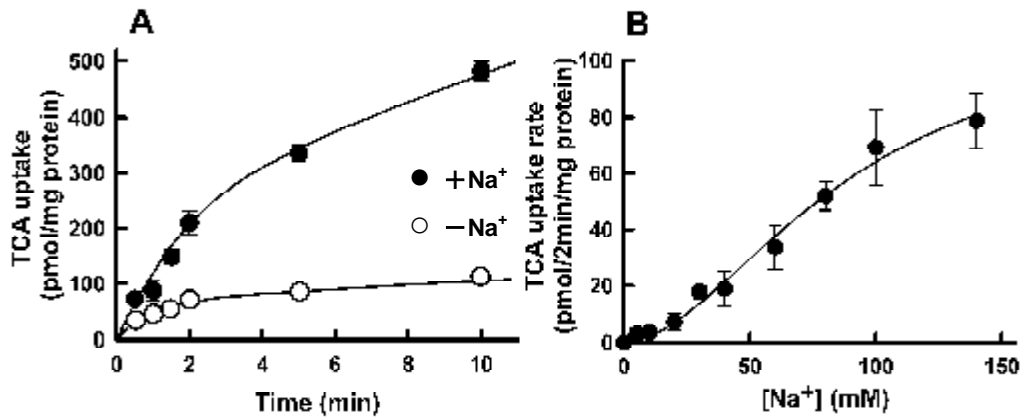


図4 初代培養ラット肝細胞への TCA の取り込み時間推移 (A) および Na^+ 濃度の影響 (B)

による TCA の取り込みの経時的変化および Na^+ 依存性をまとめた。TCA の取り込みは2分まで直線的に増加し、その2/3が Na^+ 依存的な取り込みであった。また、肝細胞による TCA の取り込み活性は Na^+ 濃度依存的に増大し、その増大様式はシグモイド型を示した。 Na^+ 依存性を Hill プロットにより解析したところ、Hill 係数は $h = 1.9 \pm 0.3$ 、 $K_{0.5} = 89 \pm 21$ (mM) と算出され、1 分子 TCA 輸送に少なくとも2個以上の Na^+ が共輸送されていることが明らかとなった。このことから、卵母細胞に発現させた hNTCP は、肝細胞において内在的に発現している NTCP の機能を保持していることが示唆された。

3 電気生理学的手法を用いた NTCP 基質輸送に伴う誘導電流の定量と hNTCP の起電性輸送の実証

これまでの hNTCP 発現卵母細胞を用いた速度論的解析により、hNTCP は起電性輸送担体であることが示唆された。そこで、TEVC 法を用いて、TCA 輸送に伴った誘起電流を測定したところ、TCA の添加により内向きの電流が誘起された。その誘起電流は Na^+ 非存在下では完全に消失した。一方、コン

ロール卵母細胞においては、基質添加により誘起電流は検出されなかった。これより、このhNTCPを介したTCAおよびNa⁺の共輸送に伴った誘起電流であることが明らかとなった。更に、TCA輸送に伴った誘起電流は飽和性を示し、誘起電流におけるK_m値は30 ± 6.2 μMと算出された。誘起電流におけるK_mは、動物細胞発現系hNTCPおよびヒト肝細胞において求められた値とほぼ等しい値を示し、hNTCPを介した基質—誘起電流は、生理的状态でのTCA基質輸送を反映していることが示唆された。

そこで、本測定系を用いて、他の胆汁酸TCDCAや種々のスタチン系化合物の基質輸送—誘起電流を測定した(図5)。TCA同様、TCDCAにおいても同様に内向き電流が誘起されることが確認された。TCDCAにより誘起された電流は、TCAと比較して大きいことから、TCAに比べて、良好な基質であることが示唆された。更に、スタチン系化合物ではフルバスタチン、ロスバスタチン、プラバスタチンの順の基質輸送—誘起電流を示した。これら、誘起電流は、Na⁺非存在下では、完全に消失した。これより、観察された基質誘起電流は、これら化合物とNa⁺の共輸送に伴った誘起電流であり、これらスタチン系化合物もNTCPにより輸送されることが示された。本研究において確立した発現系および電気生理学的手法は、ラジオアイソトープやLC-MS/MS等の精密な測定系を用いることなく、hNTCPの基質輸送活性の測定および基質認識性の探究を可能とする有用なツールの一つであることが明らかとなった。

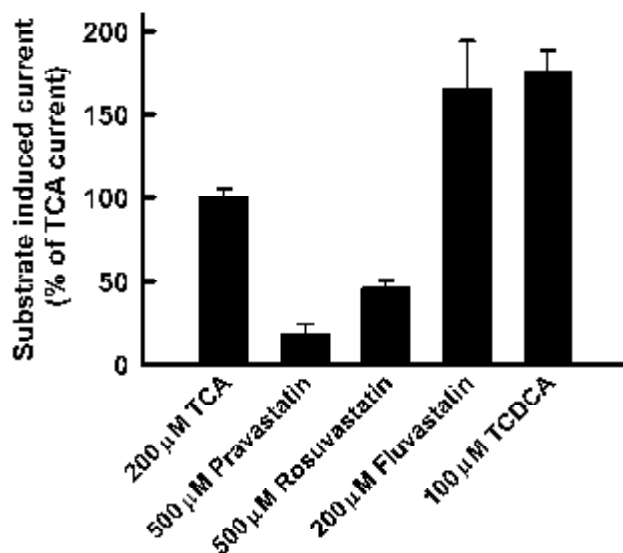


図5 hNTCPを介した胆汁酸およびスタチン系化合物による誘起電流

【結論】

我々は、hNTCPのアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、基質—誘起電流を測定することによりNa⁺/胆汁酸共輸送担体であるhNTCPが起電性であることを実証した。更に、この発現系を用いて、hNTCPは、胆汁酸のみならず構造の異なるスタチン系化合物を輸送する能力を有していることを明らかにした。このhNTCPの幅広い基質認識性は、肝臓への薬物到達の分子ターゲットとして有力な候補の一つであることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Alrefai W.A. and Gill R.K. (2007) *Pharm. Res.*, 24, 1803-1823.
- 2) Hagenbuch B., Stieger B., Foguet M., Lübbert H., Meier P.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10629-10633.
- 3) Weinman S.A. (1997) *Yale J Biol. Med.*, 70, 331-340

【対象論文】

M. Masuda, Y. Ichikawa, K. Shimono, M. Shimizu, Y. Tanaka, T. Nara, S. Miyauchi (2014) *Arch. Biochem. Biophys.* 562, 115-21 : Electrophysiological characterization of human Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (hNTCP) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes

論文審査結果の要旨

「電気生理学的手法を用いたヒト Na⁺/ taurocholate (TCA) 共輸送ポリペプチド (hNTCP) の基質輸送機構の解析」と題する増田雅行氏の審査論文は、肝臓において、胆汁酸の肝細胞への取り込みにおける主要輸送担体である、Na⁺/TCA 共輸送ポリペプチド (NTCP、SLC10A1) の輸送機構分子機構 (i) 胆汁酸に対する Na⁺ の化学量論比や輸送担体の起電性、(ii) 基質認識機構等に関する詳細を明らかとしたものである。先ず、我々は、NTCP の起電性を基質—誘起電流の測定により解明するために、大量かつ安定な機能を保持できることが期待出来る、hNTCP のアフリカツメガエル卵母細胞発現系の確立を行った。更に、この発現系を用いて、電気生理学的手法により hNTCP の輸送分子機構及び胆汁酸の基質認識・輸送機構の詳細を明らかにした。増田氏の論文は、以下の 2 つの研究成果からなる。

第一の研究成果: アフリカツメガエル卵母細胞を用いた hNTCP 発現系の構築

hNTCP の cRNA を卵母細胞にインジェクションを行い、機能解析に最適な hNTCP の卵母細胞における発現系の構築を行った。典型的な NTCP の基質 TCA を用いて、取り込み輸送活性を検討した。hNTCP の cRNA インジェクション卵母細胞は、コントロール卵母細胞に比べ 300 倍以上の TCA 輸送活性を示した。この顕著な輸送活性は Na⁺ 非存在下ではコントロール卵母細胞と同レベルにまで低下し、Na⁺ 依存性 TCA 輸送であることが示された。この Na⁺ 依存性 TCA 輸送活性が hNTCP を介した TCA の取り込みか否かを検討するために、基質濃度依存性および Na⁺ 濃度依存性を検討した。TCA 取り込み輸送活性は基質濃度の増大に伴い、ミカエリスメンテン型の飽和性を示した。そのミカエリス定数 (K_m) は $10.5 \pm 2.9 \mu\text{M}$ 、最大取り込み速度は $18.6 \pm 1.5 \text{ pmol}/10 \text{ min}/\text{oocyte}$ と算出された。卵母細胞発現系における K_m 値は、hNTCP 動物細胞発現系あるいはヒト肝細胞を用いて求められた K_m 値と同程度の値を示した。一方、TCA と共輸送される Na⁺ 濃度を増加させたときに、TCA 取り込み速度がどのように変化するかを測定した。TCA 取り込み速度は、Na⁺ 濃度の増加に伴い、シグモイド型の飽和を示した。Hill プロットにより、Hill 係数 $n = 1.9 \pm 0.1$; $K_{0.5} = 26.9 \pm 2.0 (\text{mM})$ と算出された。このことにより、hNTCP を介した 1 分子の TCA の輸送は、少なくとも 2 個の Na⁺ が共輸送される、起電性輸送であることが示唆された。更に、cholate、chenodeoxycholate、deoxycholate や lithocholate などの内因性の胆汁酸 (BA) を含む様々な化合物による TCA 輸送活性阻害により、卵母細胞に発現した hNTCP の基質認識性を検討した。TCA の輸送活性は、濃度依存的に顕著に阻害され、卵母細胞発現の hNTCP が動物細胞発現系およびヒト肝細胞における hNTCP の基質認識性と同様の性質を示した。一方、胆汁酸とは全く構造の異なるフルバスタチンやロスバスタチン等のスタチン系化合物も TCA 輸送活性を濃度依存的に阻害したことから、hNTCP が BA と構造の異なる化合物も輸送基質として認識する能力を有していることが示唆された。

第二の研究成果: 電気生理学的手法を用いた、NTCP 基質輸送に伴った誘導電流の定量と hNTCP の起電性の解明

これまでの hNTCP 発現卵母細胞を用いた速度論的解析により、hNTCP は起電性輸送担体であることが示唆された。そこで、TEVC 法を用いて、TCA 輸送に伴った誘起電流を測定した。TCA の添加により、内向きの電流が誘起した。その誘起電流は Na⁺ 非存在下では完全に消失した。一方、コントロール卵母細胞においては、基質添加により誘起電流は検出されなかった。これより、この hNTCP を介した TCA および Na⁺ の共輸送に伴った誘起電流であることが明らかとなった。更に、TCA 輸送に伴った誘起電流は飽和性を示し、誘起電流における K_m 値は $30 \pm 6.2 \mu\text{M}$ と算出された。誘起電流における K_m は、動物細胞発現系 hNTCP およびヒト肝細胞において求められた値とほぼ等しい値を示し、hNTCP を介した基質—誘起電流は、生理的狀態での TCA 基質輸送を反映していることが示唆された。そこで、本測定系を用いて、他の胆汁酸 TCDCA や種々のスタチン系化合物の基質輸送—誘起電流を測定した。TCA 同様、TCDCA においても同様に内向き電流が誘起されることが確認された。TCDCA により誘起された電流は、TCA と比較して大きいことから、TCA に比べて、良好な基質であることが示唆された。更に、スタチン系化合物ではフルバスタチン、

ロスバスタチン、プラバスタチンの順の基質輸送—誘起電流を示した。これら、誘起電流は、 Na^+ 非存在下では、完全に消失した。これより、観察された基質誘起電流は、これら化合物と Na^+ の共輸送に伴った誘起電流であり、これらスタチン系化合物も **NTCP** により輸送されることが示された。本研究において確立した発現系および電気生理学的手法は、ラジオアイソトープや **LC/MS** 等の精密な測定系を用いることなく、**hNTCP** の基質輸送活性の測定および基質認識性の探究を可能とする有用なツールの一つであることが明らかとなった。

以上、増田氏は、 Na^+ /胆汁酸共輸送担体である **hNTCP** の **TCA** 輸送における Na^+ の化学量論比 **TCA : Na^+** が **1 : 2** であることおよび **hNTCP** が起電性輸送担体であることを初めて直接的に実証した。更に、胆汁酸や構造の全く異なるスタチン系薬剤を用いた基質認識性を検討し、**hNTCP** は胆汁酸だけでなく構造の全く異なるスタチン系薬剤も基質として認識することを明らかにした。**hNTCP** は、様々な薬物を輸送する能力があり、肝臓への薬物送達分子ターゲットの一つとなりうることを明らかにした。また、本研究において確立した発現系および電気生理学的手法は、放射ラベルされた薬剤や精密測定機器である液体クロマトグラフィー質量分析装置 (**LC-MS/MS**) などを用いる事無く、薬剤灌流に伴う誘起電流を測定することで簡単に評価できる有用なツールの一つであることが明らかになった。今後、このツールを用いて様々な化合物を検討することにより、**hNTCP** の基質認識機構の解明や、それを応用した **DDS** の発展が期待される。

これら増田雅行氏の一連の研究結果は、学術論文としてまとめられ、掲載済みである。**hNTCP** を介した薬物間相互作用の解明および **DDS** への進展に重要な知見をもたらしたと考えられる。従って、増田雅行氏の審査論文は博士(薬学)の学位を授与するに充分価値のあるものと判断した。

平成 27 年 2 月 25 日

宮内 正二 印