

論文の内容の要旨

論文題目 腎有機カチオントランスポーターの新規機能マーカー探索および発現調節機構の解明

氏名 三宅 健之

【序論】

薬物の尿中排泄は、糸球体ろ過のほか、近位尿細管を形成する上皮細胞の細胞膜に発現する種々トランスポーターの基質選択性ならびに輸送能力により決定される。低分子有機カチオンは、げっ歯類においては organic cation transporter (Oct) 1/2 (*Slc22a1/2*)、ヒトにおいては OCT2 を介して、血管側から尿細管上皮細胞へ取り込まれる。刷子縁膜側には multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 (*SLC47A1*) および MATE2-K (*SLC47A2*) が発現し、内向きの H^+ 勾配を輸送駆動力として、細胞内から尿中への有機カチオンの排泄を担っている (図 1)。

トランスポーターの機能変動により、薬物応答性および副作用の発現リスクは変動し得るが、その要因としてもっとも注目されているのは薬物間相互作用である。具体的な薬物の例として、抗 HIV 薬 dolutegravir や、チロシンキナーゼ阻害剤 crizotinib, vandetanib は臨床投与量で OCT2 を阻害することが知られており、OCT2 基質薬である metformin との薬物間相互作用が添付文書にも記載されている。同様に、 H_2 受容体拮抗薬 cimetidine, 抗マラリア薬 pyrimethamine (PYR), 抗菌薬 trimethoprim といった薬物は、臨床投与量で MATEs を阻害する薬物であり、基質薬物の腎組織内の蓄積を生じる可能性がある。

医薬品開発では、*in vitro* 試験からトランスポーターの阻害が疑われる事例において、第 3 相試験の前に、当該分子種選択的に輸送されるプローブ薬物を被験者に投与し、新薬の有無による血中濃度推移の変動をみる試験を行うことが強く推奨されているが、偽陽性・偽陰性ともに生じてしまう。そこで、トランスポーターの内在性基質を代替プローブとして利用できれば、臨床予見性を高めつつ、第 1 相試験の時点で早期に薬物相互作用リスクを評価することが可能になると考えられる。当研究室では、OCT2 および MATEs の基質となる creatinine, *N*¹-methylnicotinamide (NMN) を用いて本方法の有用性を実証し [Imamura Y et al., 2011; Ito S et al., 2012]、規制当局が発行する医薬品開発ガイドラインへの収載に向けた検討を進めてきた。しかしこれらの化合物には、腎排泄におけるトランスポーターの寄与が小さい (creatinine) ことや、全身クリアランスに占める腎排泄の寄与が小さく、トランスポーターの機能低下によって血漿中濃度が変動しない (NMN) といった欠点がある。そこで私は、感度および特異性に優れた OCT2/MATEs の機能マーカーを新たに見出すべく、以下の研究を行った。

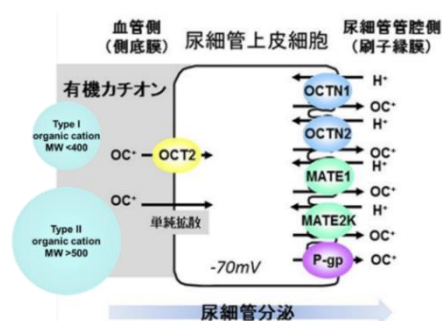


図1. 近位尿細管における有機カチオン輸送システム

【方法と結果】

1. OCT2 および MATEs の基質として *N*¹-methyladenosine を新たに同定した

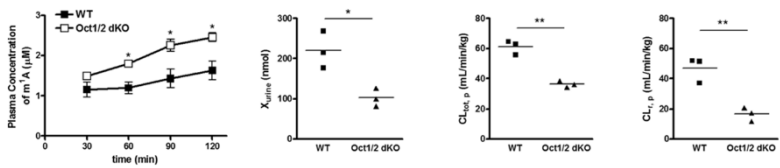
OCT2/MATE の内在性基質の新規探索のため、野生型および Oct1/2 double KO (dKO) マウスの血漿・尿サンプルを用いて、Non-targeting なメタボローム解析を実施した。検出された 819 化合物のうち、tRNA を構成する修飾核酸である *N*¹-methyladenosine (*m*¹A) が、Oct1/2 dKO マウスにおいて血漿中濃度が顕著に増加し、尿中排泄量が減少する唯一の化合物として見出された。トランスポーターを安定発現させた HEK293 細胞を用いて輸送実験を行ったところ、*m*¹A はマウス Oct1/2 および *Mate*1 の基質であること、ヒト OCT2 および MATE2-K の基質であるがヒト MATE1 の基質でないことが明らかとなった。

2. マウスにおける *m*¹A の体内動態に Oct1/2 および *Mate*1 が主要な役割を果たすことを明らかにした

*m*¹A のマウス静脈内投与試験を行ったところ、野生型マウスにおける *m*¹A の全身クリアランスの 7 割程度を腎クリアランスが占めていた。Oct1/2 dKO マウス、および *Mate*1 阻害剤である PYR を予め投与したマウスでは、*m*¹A の腎クリアランスが対照群の 50% (糸球体濾過速度 (GFR) と同程度) まで低下し、それに伴って *m*¹A の血漿中濃度は 2 倍程度高い値を示した (図 2)。他方、

*Mate*1 とともに尿細管上皮細胞の管腔側に発現する P 糖タンパクや breast cancer resistance protein といったトランスポーターのノックアウトマウスでは、*m*¹A の動態が野生型と変わらなかった。以上の結果から、マウスにおいて、Oct1/2 および *Mate*1 が *m*¹A の尿細管分泌および全身曝露を担う主要な分子であると考えられた。

Wild Type vs. Oct1/2 double KO mice



Pyrimethamine (MATE inhibitor) treatment

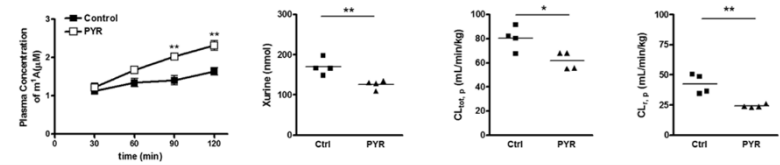


図2. *m*¹Aのマウス静脈内投与試験

*m*¹Aを100 nmol/min/kgで2時間定速静注し、血漿中濃度および尿中排泄量のデータからクリアランスを算出した。PYR投与試験では、20 µmol/kgのPYRを*m*¹Aの静注開始30分前に静脈内瞬時投与した。

3. *m*¹A は既知の内在性基質よりも優位な OCT2/MATE2-K 機能マーカーとなることが示唆された

上記の結果から、*m*¹A はヒトにおいて OCT2/MATE2-K の機能を反映する血中マーカーとなることが期待される。そこで、健康成人男性 15 名 (45 歳以下の若年者 8 名、65 歳以上の高齢者 7 名) を対象とした臨床試験を行い、*m*¹A および creatinine の血漿中濃度および腎クリアランスを測定し、マーカーとしての適性を評価した。その結果、*m*¹A は健康人における日内変動や個人間差が比較的小さいことが明らかとなった。

*m*¹A の腎クリアランスは creatinine と緩やかな相関を示し、またその値が GFR の 2 倍程度であったことから、OCT2/MATE2-K を介した尿細管分泌を受ける化合物であることが示唆された (図 3)。

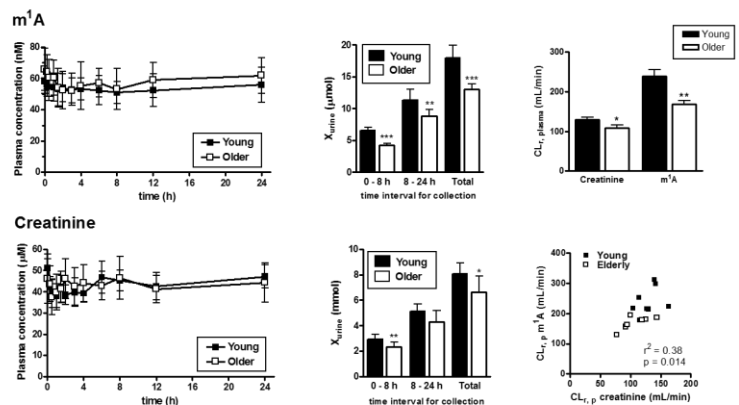


図3. 健康成人男性における *m*¹A および creatinine の体内動態

OCT2/MATE2-K の機能低下により、m¹A の血漿中濃度が上昇するか否かを確認するため、薬効用量で OCT2/MATE2-K の阻害能を有する DX-619 を、プローブ薬 metformin とともにカニクイザルに投与した。その結果、DX-619 投与期において、metformin と同様に m¹A の血漿中濃度 AUC が上昇した(図 4)ことから、血漿中 m¹A 濃度は OCT2/MATE2-K 機能マーカーとして有用であることが示唆された。

4. m¹A の血清中濃度を OCT2 発現量の指標として、OCT2 の発現調節に関わる遺伝子領域を探索した

最近行われた、メタボロームとゲノム情報との関連解析[Shin et al., 2014]で、ヒト血清中 m¹A 濃度が OCT2 の SNPs とのみ有意に相関することがわかっている。当該の 22 個の SNPs は、1 箇所の 3'UTR 変異を除いて全てイントロン変異であり、これらの変異のいずれかが OCT2 の発現調節に関わり、m¹A の血清中濃度のみならず、基質薬の動態を変動させる可能性が考えられる。その変異を含む遺伝子領域は OCT2 のエンハンサーとして機能していると仮説を立て、当該領域の同定のために以下の実験を行った。

まず、ChIP-seq のデータベース (ChIP-Atlas; <https://chip-atlas.org/>) を参照し、当該の SNPs を含み、かつ DNase I 感受性およびエンハンサー様ヒストン修飾が認められる遺伝子領域をピックアップした。条件に合致した 7 つの領域を、OCT2 のプロモーター領域とともにそれぞれルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、細胞にトランスフェクションした際のルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、HepG2 細胞および HeLa 細胞において、5 つの SNPs を含む 1171bp の領域がルシフェラーゼ活性を上昇させた。さらに、この領域中の SNPs をそれぞれ minor allele に置換したところ、rs315987 が minor allele であるとき、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した(図 5)。

rs315987 を含む領域に認識モチーフをもち、minor allele のとき結合能が低下する転写因子を、TRAP (<http://trap.molgen.mpg.de/cgi-bin/home.cgi>) により検索したところ、数多くの遺伝子のプロモーターやその上流にある GC-box に結合し、転写を制御することの知られている Sp1 がヒットした。実際に、エンハンサー候補領域から Sp1 の認識配列を削除したレポーターベクターでは、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した(図 6A)。さらに、OCT2 を内因性に発現する 786-O 細胞に Sp1 阻害剤である Mithramycin A を処理すると、OCT2 の mRNA 発現量が顕著に減少した(図 6B)。以上の結果から、rs315987 の周辺領域が OCT2 エンハンサーとして機能すること、またその活性を Sp1 が担っていることが示唆された。

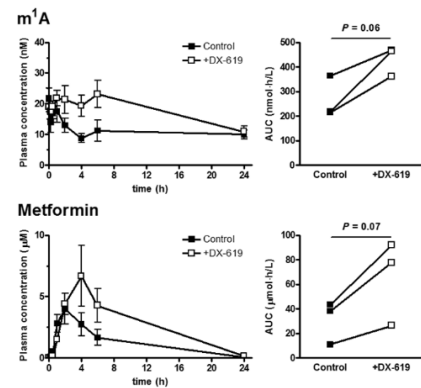


図4. カニクイザルを用いたDX-619投与試験

No.	1	2	3	4	5	6	7
Length (bp)	346	246	1163	1609	941	1171	673
Number of refSNPs	1	1	1	1	1	5	4

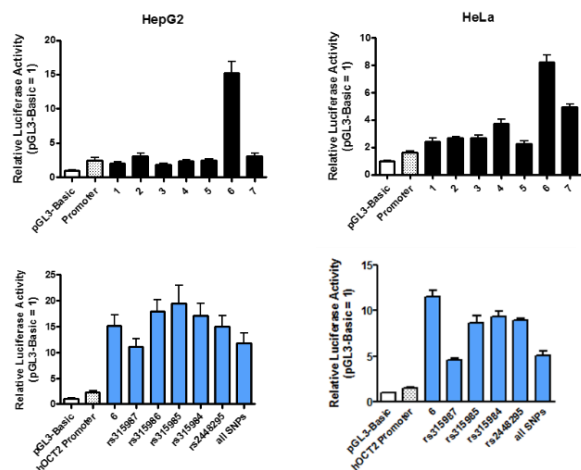


図5. OCT2エンハンサー候補領域によるルシフェラーゼ活性の変動

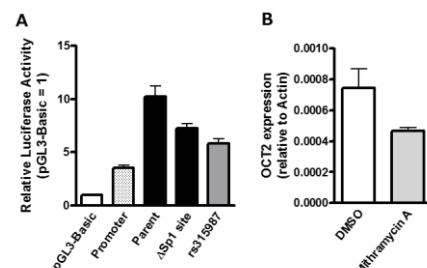


図6. 転写因子Sp1はOCT2のエンハンサー活性を担う

【総括】

薬物間相互作用や疾患によるトランスポーター機能の変動は、トランスポーターが生体内で輸送している内在性基質の血中・尿中濃度の変動を観察することで、非侵襲的にヒト *in vivo* で予測できると考えられる。ただし、そのトランスポーターに対して①比較的选择的な基質となり、②生成プロセスが安定しており、③概日リズムや食事などの影響を受けづらい化合物がプローブとして理想的である。私が OCT2/MATE2-K の内在性基質として新たに見出した m¹A は、実験動物における OCT2/MATEs の機能低下により血漿中濃度が上昇し、さらに健常人における日内変動が比較的小さい化合物であることが分かっており、既知の内在性基質よりも優位なプローブとなることが期待される。臨床での実用に向けて、PYR のヒトにおける用量漸増試験を実施中であるほか、OCT2 阻害剤 dolutegravir についても臨床試験を計画中である。

また、m¹A の血清中濃度に関するゲノムワイド関連解析の結果に基づき、OCT2 の発現調節を担う可能性のあるイントロン中の遺伝子領域および転写因子を見出すことができた。今後、ゲルシフトアッセイやクロマチン免疫沈降法により、当該領域への Sp1 の結合を確認する。また、CRISPR-Cas9 法により 786-O 細胞の rs315987 を minor allele に置換し、OCT2 発現が低下するか否かを検証したい。