

博士学位論文

トランスポーターを介した D-luciferin の細胞膜透過機構の解明と  
その生物発光イメージングへの応用に関する研究

古屋 貴人

東京薬科大学 大学院薬学研究科

*Studies on the Elucidation of Transport Mechanism of D-luciferin and  
Its Application to Bioluminescent Imaging*

*Takahito Furuya*

PhD Thesis

*Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

# 目次

略語一覧	1
緒論	2
第1章：HEK293細胞における内因性 D-luc トランスポーターの同定	
1-1：概論	7
1-2：実験方法	9
1-3：結果	12
1-4：考察	16
第1章 小括	18
第2章：外因性 D-luc トランスポーターの探索とその応用	
第1節：HEK/eLuc細胞における D-luc-eLuc 反応に及ぼす各種有機アニオン トランスポーターの影響	
2-1-1：概論	19
2-1-2：実験方法	20
2-1-3：結果	23
2-1-4：考察	25
第2節：OAT1を介した 6-carboxyfluorescein の取り込みに対する D-luc の阻害効果	
2-2-1：概論	26
2-2-2：実験方法	26
2-2-3：結果	27
2-2-4：考察	27
第3節：HEK/eLuc/OAT1細胞における D-luc-eLuc 反応の解析	
2-3-1：概論	28
2-3-2：実験方法	28
2-3-3：結果	28
2-3-4：考察	29

第4節：OAT1を介した <i>in vivo</i> 生物発光イメージングの最適化	
2-4-1：概論	30
2-4-2：実験方法	30
2-4-3：結果	31
2-4-4：考察	32
第2章 小括	33
第3章：生物発光イメージングを利用した OAT1 を介した薬物間相互作用の評価	
3-1：概論	34
3-2：実験方法	36
3-3：結果	36
3-4：考察	38
第3章 小括	39
総括	40
謝辞	42
引用文献	43

## 略語一覽

BL	Bioluminescence
6-CF	6-Carboxyfluorescein
D-luc	D-Luciferin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt
eLuc	Pyrearinus termitillumians luciferase
FI	Fluorescence intensity
fLuc	Firefly luciferase (Photinus pyrails luciferase)
GFP	Green fluorescence protein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK293	Human embryonic kidney 293 cells
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
IVIS	In vivo imaging system
LI	Luminescence intensity
MCT	Monocarboxylate transporter
MRI	Magnetic resonance imaging
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Positron emission tomography
SPECT	Single-photon emission computed tomography
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide
UV	Ultraviolet

## 緒論

ライフサイエンス研究において、*in vitro* 試験で得られた知見をもとに *in vivo* での生命現象を理解しようとする取り組みが数多くなされているが、*in vitro* 試験から予測される生命現象が必ずしも *in vivo* に反映されるとは限らない。それは、*in vivo* 系ではどのような分子であっても、系内に存在する様々な低分子化合物、タンパク質あるいは遺伝子と動的に関連しながら機能しているためである。したがって、生命現象の理解に繋がる信頼性・信憑性の高い知見を得るためには、*in vivo* において、*in vitro* 試験で検討対象となる分子の挙動や変化を検討する必要があり、そのためには、その生体環境下における事象を観察する技術が必須となる [1]。

現在、生きたままの実験動物個体において、リアルタイムかつ非侵襲的に、低分子化合物、タンパク質および遺伝子の動きを可視化・画像化する手法として分子イメージング技術に注目が集まっている [2]。この技術は、放射性標識体を用いた single-photon emission computed tomography (SPECT) および positron emission tomography (PET) [3-6]、核磁気共鳴現象を用いた magnetic resonance imaging (MRI) [7-9]、green fluorescence protein (GFP) [10] やルシフェラーゼ遺伝子 [11] を用いた光イメージングの三つに大別され [12] [13]、がん細胞の浸潤 [14] や血管新生 [15]、腫瘍細胞におけるグルコース誘導体の集積性に基づく病理診断 [16]、さらには、創薬における薬物動態の評価 [17] に応用されている (Table 1)。

Table 1 Characterization of molecular imaging technologies [3-10]

イメージング技術	プローブ	長所	短所
SPECT PET	放射性同位体標識体 ( $^{18}\text{F}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ )	・高感度 ・高時間分解能 ・ヒトへの適応	・低い空間分解能 ・遺伝毒性 ・高コスト (プローブ等が高価)
MRI	造影剤 ( $\text{Gd}^{3+}$ 、ultrasmall superparamagnetic iron oxide; USPIO)	・高感度 ・高空間分解能 ・ヒトへの適応	・低い時間分解能 ・高コスト (プローブ等が高価)
光イメージング： 蛍光、発光	GFP、ルシフェラーゼ基質 (D-luciferin、Coelenterazine 等)	・中間度 ・高時間分解能 ・高空間分解能 ・汎用性	・適応は小動物のみ ・感度が他の技術と比較すると高くない。

SPECT や PET イメージングは、放射性同位体で標識したプローブの原子核崩壊に伴い放出される  $\beta$  線や  $\gamma$  線等の光子を検出し、イメージングする技術である。一般に、あらゆる環境下において他の因子の影響を受けることなくシグナルを検出することができるため、感度および定量性において非常に優れている。特に PET イメージングは、その感度の高さから医薬品開発における薬物動態や薬効薬理の評価に応用されるなど [18] [19]、様々な領域に適応を拡大しつつある。しかし、プローブおよび検出器、いずれもが高価である点や、プローブが生体内において代謝を受ける場合、その変化の識別が困難であること、および空間分解能が低いことから、汎用性に欠けることが課題となっている。

MRI イメージングは、生物個体内にある水分や脂肪の水素原子核に対し、ラジオ波領域の電磁波を照射することで、水素原子核から放射される電磁波を画像化するものである。特に **ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)** 粒子を取り込ませ標識した標的細胞においては、特定シグナルの増幅が可能であるため [20]、細胞のトラフィックにも応用されている [21]。しかし、空間分解能は低く、USPIO が細胞内に長期滞留した際、細胞毒性、細胞分裂に伴う造影剤の希釈によるシグナル低下が問題となるため、単一細胞レベルのイメージングには至っていないのが現状である。

近年、最も注目を集めているのが、光イメージング技術である。その理由として簡便性と低コストが挙げられる。光イメージングは、**GFP** 等の蛍光タンパク質や蛍光色素を用いる蛍光イメージングとルシフェラーゼ（発光酵素）遺伝子を用いる発光イメージングに大別される。蛍光イメージングは、複数の蛍光プローブを利用することにより、同時に多数の情報を得ることができ、分子の構造、距離といった三次元的情報を得ることが可能である [22] [23]。しかし、蛍光を観測するためには、外部からの励起光の照射が必須であり、励起光が生体内の目的分子を発現する部位まで透過しなくてはならないため、皮膚の厚い個体や体内深部のイメージングは困難とされている。また、励起光照射に伴う細胞障害性により長時間の観測に不向きであることや細胞の自家蛍光によるバックグラウンドも問題となっている [24] [25]。一方、ホタルや鉄道虫等が持つ発光酵素であるルシフェラーゼとその基質であるルシフェリンの反応による生物発光を用いた発光イメージングは、励起光の照射が不要であるため、バックグラウンドの干渉も少ない [26]。したがって、光イメージング技術においては、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による生物発光を利用した発光イメージング、あるいは生物発光を伴う蛍光イメージングが近年では主流になりつつある [27] [28]

生物発光に用いられる酵素および基質には、昆虫由来のルシフェラーゼに対する基質として **D-luciferin (D-luc)**、クラゲ類、ウミエラ類および甲殻類（エビ目、アミ目）などの海洋生物由来のルシフェラーゼに対する基質として **coelenterazine**、甲殻類（ウミホタル目）および魚類由来のルシフェラーゼに対する基質としてウミホタルルシフェリン、過鞭毛藻類および甲殻類（オキアミ目）由来のルシフェラーゼに対する基質として過鞭毛藻類ルシフェリンの 4 つの組み合わせが存在する (Table 2) [24]。これらの中でライフサイエンス研究において最も頻用されているのが、**D-luc** と昆虫由来のルシフェラーゼの組み合わせである。**D-luc**-ホタ

ルシフェラーゼ (fLuc) 反応の発光量子収率は約 0.4 となっており [24]、他の組み合わせと比較しても 1.3~8 倍ほど高い。

Table 2 Characterization of combination of luciferin and luciferase

ルシフェリン	由来生物	発光量子収率
D-luciferin (D-luc)	昆虫類 (甲虫目)	0.41 (fLuc)
coelenterazine	クラゲ類 (軟クラゲ)、ウミエラ類 (ウミエラ目)、甲殻類 (エビ目、アミ目)、頭足類 (ツツイカ目)	0.05
ウミホタルルシフェリン	甲殻類 (ウミホタル目)、魚類 (ガマアンコウ目)	0.30
過鞭毛藻類ルシフェリン	過鞭毛藻類 (ピロキスチス目、ヤコウチュウ目)、甲殻類 (オキアミ目)	—

しかし、D-luc-ルシフェラーゼ反応を利用した生物発光イメージングの短所として、*in vivo* におけるシグナル強度の低さが指摘されている。この問題を克服するために、現在までに多面的な検討がなされてきており、そのアプローチは、1) 発光波長の近赤外領域へのシフト、2) 検出デバイスの高感度化、3) 発光強度が高いルシフェラーゼの探索の三つに大別される。

- 1) **発光波長の近赤外領域へのシフト:** 生体における光の透過性は波長により異なり、生体の窓と呼ばれる 650~900 nm の近赤外領域で最も高い。この領域はヘモグロビンや水による干渉が少ないためである [29] [30]。しかし、D-luc-ルシフェラーゼ反応によって生成される光子の波長は約 560 nm であるため、その波長を近赤外領域にシフトさせる取り組みがなされている [31]。例えば、D-luc の水酸基をアミノ基に置換することで、ルシフェラーゼとの反応による生物発光の極大波長は 610 nm へシフトし、その基質を用いることで生体深部やより大きな動物においてもイメージングが可能となることが報告されている [32-34]。
- 2) **検出デバイスの高感度化:** 最近では、光検出デバイスである CCD カメラの性能が格段に向上している。従来、光検出器として用いられていた光電子倍增管やイメージンテンシファイア付フォトダイオードアレイ検出器の検出効率は 10~15% 程度であったが、-90°C まで冷却可能な CCD カメラが開発され、約 90% の検出効率を達成しており、極めて微弱な発光でも観測することが可能となっている [35-37]。



3) **発光強度が高いルシフェラーゼの探索:** 昆虫由来のルシフェラーゼとして、アメリカ産ホタルルシフェラーゼ (*Photinus pyralis* luciferase、firefly luciferase ; fLuc) が最も利用される [38]。しかし、fLuc は発光強度が低く、pH 感受性であるため、生体環境の変化により発光強度が変化するという問題がある。一方、最近、見出されたヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼ (*Pyrearinus termitillumians* luciferase; eLuc) は、pH 非感受性であり、その発光強度は fLuc の約 100 倍にも及ぶ [39-42]。

以上の取り組みにより、D-luc-ルシフェラーゼ反応 (Fig. 1) による生物発光を用いた手法は主要なイメージングツールとなっている (Fig. 1)。しかし、未だ *in vivo* における生物発光イメージングでは皮膚の薄いマウスが主に用いられ、より大きなラット等の小動物個体では生体深部のイメージングは困難なのが現状である。さらに、高感度な生物発光イメージングを行うために、基質である D-luc を小動物に大量投与しているのが現状であり、シグナル強度に関わる問題点はまだ十分に解決されていない。

一般に、D-luc-ルシフェラーゼ反応による生物発光のシグナル強度は、細胞内の D-luc およびルシフェラーゼ含量に依存する [43]。細胞内のルシフェラーゼ活性は規定値であるため、この反応におけるシグナル強度は主に D-luc の細胞内濃度に依存すると推察される。

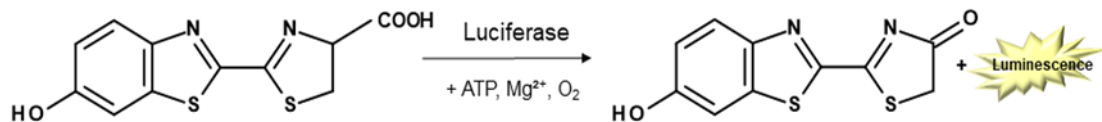


Fig. 1 D-luc-luciferase reaction

D-luc はフェノール性水酸基およびカルボン酸基を持つアニオン性化合物である (Fig. 1)。生理的条件下 (pH 7.4) においては、D-luc が持つカルボン酸基は、ほぼ完全に解離形で存在するため、log *P* 値および分子量などの物理学的性質も考慮すると、単純拡散による D-luc の細胞膜透過性は非常に低いと考えられる [44-46]。

そこで本研究では、D-luc の細胞膜透過の過程に何らかのトランスポーターが関与すると仮説を立て、D-luc の細胞膜透過に関与するトランスポーターの同定を試みた。さらに、トランスポーターを活用して細胞内 D-luc 濃度を上昇させることができれば、より効率的な D-luc-ルシフェラーゼ反応が可能になると仮説を立て、D-luc を高効率で輸送するトランスポーターの探索とその *in vivo* 生物発光イメージングへの応用について検討した。まず、第 1 章では、D-luc の化学構造と生理的条件下における解離状態から、モノカルボン酸トランスポーターに着目し、D-luc-ルシフェラーゼ反応との関連性について検討を行った。第 2 章では、現在、同定されている各種有機アニオントランスポーターのいずれかが D-luc を輸送す

る可能性を考え、これらトランスポーターが D-luc-ルシフェラーゼ反応に与える影響について検討した。この検討により、organic anion transporter 1 (OAT1) が顕著な D-luc 輸送活性を有することを見出すことができたため、OAT1 と eLuc を共発現する安定発現株 (HEK/eLuc/OAT1 細胞) を作製し、その生物発光について速度論的解析を行った。また、HEK/eLuc/OAT1 細胞を用いて、マウスおよびラットにおける *in vivo* 生物発光イメージングにおける D-luc トランスポーターの有用性について検討した。第 3 章では、本イメージング手法が、医薬品開発における薬物トランスポーターを介した薬物間相互作用の評価に適用できる可能性を探るため、OAT1 を介した生物発光イメージングに対する OAT1 阻害剤の影響について検討した。

## 第1章 HEK293細胞における内因性 D-luc トランスポーターの同定

### 1-1 概論

ホタルを含む昆虫由来のルシフェラーゼと D-luc を用いた生物発光は、量子収率が高く、検出感度が高い可視領域（最大波長：540～630 nm）の光子を放出するため、ライフサイエンス研究において広く利用されている。従来、本反応系は、細胞における遺伝子発現の発光プローブとして、あるいは試料に含まれる ATP 含量を高感度に検出するためのツールとしての利用されてきた [47]。その際、高感度測定を行うためには、昆虫由来ルシフェラーゼを発現する細胞を破壊し、その抽出液に十分量の D-luc および ATP を添加しなければならないため、その用途は主に試験管レベルの *in vitro* 実験に限定されていた。しかし光学技術の進歩に伴い、微弱な発光を検出可能な高感度 CCD カメラの開発や発光酵素および発光基質の改良が進み、最近ではルシフェラーゼを発現する細胞や小動物個体から放出される発光を非侵襲的かつリアルタイムにモニターすることが可能になっている。例えば、昆虫由来ルシフェラーゼを発現する遺伝子改変マウス、あるいは昆虫由来ルシフェラーゼを発現する細菌や細胞を移植したマウスに高用量の D-luc (150 mg/kg) を腹腔内投与し、生体内で生じた生物発光を測定することで、*in vivo* における遺伝子発現や細胞挙動を追跡できる [27]。現在、この技術に基づいて、遺伝子の DDS 研究 [48]、ウイルス・細菌による感染研究 [49]、がん・幹細胞の分化増殖 [50] [51] に関する研究など、様々な *in vivo* イメージングの成果が報告されている。しかし、ここで設定されている D-luc の投与量や投与方法は実践的な経験論に基づき最適化されたものであり、D-luc の体内動態特性や薬物速度論的な理論はほとんど考慮されていない。

D-luc-ルシフェラーゼ反応は、D-luc を酸化する際に ATP を利用するため、生体では細胞内においてのみ起こる。さらに、その発光強度は、ルシフェラーゼと ATP 含量が十分存在する条件下では、D-luc の細胞内濃度に依存するため、細胞外 D-luc の細胞内移行が重要となる。しかし、D-luc の細胞・組織移行に関する詳細は、現在のところ不明である。

D-luc は親水性のアニオン性化合物であり、 $\log P$  値および分子量といった物理化学的性質と併せて考えると、D-luc の単純拡散による細胞膜透過性は非常に低いと推察される [44]。しかし、動物個体を用いた *in vivo* 生物発光イメージングにおいては、筋肉、肝臓、腎臓、脳など [52]、様々な組織や臓器において D-luc の細胞内分布に基づく生物発光が認められている。さらに興味深いことに、その生物発光強度は各組織でのルシフェラーゼ活性に必ずしも依存せず、臓器間で差があることが指摘されている [53] [52]。したがって、D-luc の組織移行には特異的なトランスポーターが関与している可能性が推察され、そのトランスポーターは全身に発現している可能性が考えられる。

これまでに *in vivo* 生物発光イメージングへ影響を及ぼすトランスポーターとして、多剤耐性タンパク質の一種である BCRP (breast cancer resistance protein; ABCG2) が知られている。BCRP は、腸管、腎臓、胎盤および血液脳関門などのバリア組織に局在し、細胞内に移

行した様々な有機化合物を細胞外に排出する活性を有している [54]。この特性から BCRP は D-luc を基質として認識し [55]、細胞内に移行した D-luc を細胞外へ排出することでルシフェラーゼを介した生物発光に対して抑制的に働くことが、マウス胎盤 [56] と血液脳関門 [57] を対象とした研究で示されている。他にも HEK293 細胞を用いた生物発光イメージングにおいて、MRP4 (multidrug resistance-associated protein 4; ABCC4) が同様に D-luc を細胞外へ排出し、生物発光強度を低下させることが報告されている [58] [59]。しかし、いずれのケースにおいても、排出トランスポーターが関与する以前に、どのように D-luc が細胞内に移行するかについては考慮されていない。したがって、D-luc の細胞内移行を促進するトランスポーターが様々な生体組織や一般的な培養細胞株に発現していると考えられるが、その分子実態は未だ同定されていない。

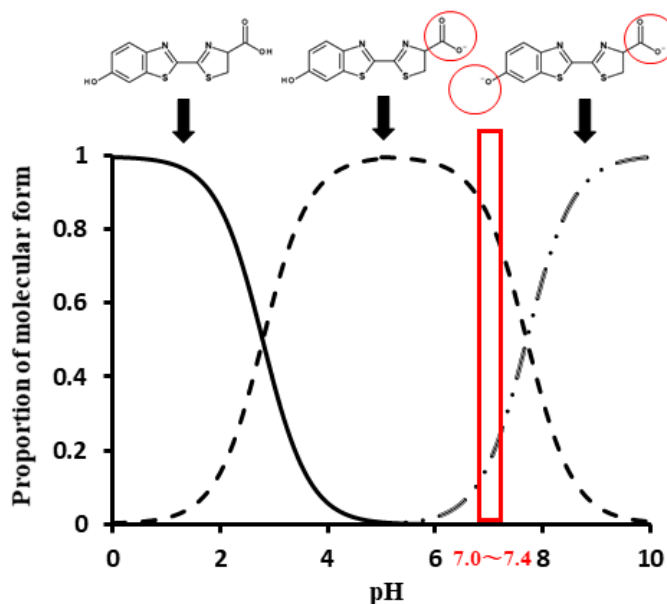


Fig. 2 Chemical structure of D-luc and its ionization profile in different pH

D-luc はカルボキシル基とフェノール性水酸基を有し、それぞれの  $pK_a$  は 2.8、7.7 である [60]。したがって、生理的 pH における D-luc の分子形は、Fig. 2 に示されるように主にカルボキシル基のみが解離したモノカルボン酸イオンである [61]。

そこで本研究では、モノカルボン酸トランスポーターが D-luc の細胞内移行に関与すると仮説を立て、トランスポーターの発現系宿主細胞株として汎用される HEK293 細胞における D-luc の細胞内移行におけるモノカルボン酸トランスポーターの関与の可能性と D-luc-ルシフェラーゼ反応に与える影響について検討した。

本検討にあたり、昆虫由来ルシフェラーゼとして、細胞内 pH の影響を受けず [62]、発光強度が高いヒカリコメツキムシ (*Pyrearinus termitilluminans*) のルシフェラーゼ (Emerald Luciferase; eLuc) を選択し、HEK293 細胞に eLuc 遺伝子を安定発現した細胞株 (HEK/eLuc

細胞) を作製した。この細胞は、Fig. 3 の様に、細胞外に添加した D-luc が細胞内へ透過し、eLuc によって代謝されることにより、細胞内で生物発光を放出すると予想される。そこで本細胞株を用い、生物発光強度を指標に D-luc の細胞膜透過過程を評価した。

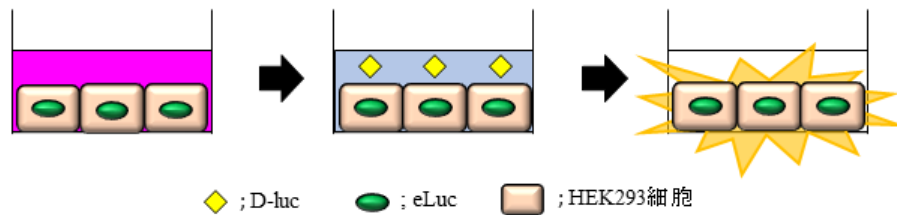


Fig. 3 Cell-based bioluminescence assay system using HEK293 cells stably expressing *Pyrearinus termitilluminans* luciferase

## 1-2 実験方法

### HEK/eLuc 細胞の作製

eLuc の哺乳類安定発現ベクター (eLuc-pEBMulti-Neo) を構築するために、pELuc-test (TOYOBO) から EcoRI と NotI で切断した eLuc 断片を Epstein-Bar virus の複製起点および核抗原を含む pEBMulti-Neo (Wako Pure Chemical Industries) に導入した。HEK293 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて eLuc-pEBMulti-Neo をトランスフェクションし、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) および 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 (Sigma-Aldrich) を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako Pure Chemical Industries) で2週間培養した。得られた抗生物質耐性クローンを eLuc 発現 HEK293 細胞 (HEK/eLuc 細胞) として使用した。

### RT-PCR 法

サブコンフルエントの状態の HEK/eLuc 細胞より、Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を精製し、3  $\mu\text{g}$  の total RNA に対して Rever Tra Ace (TOYOBO) を逆転写酵素として用い、オリゴ (dT) をプライマーとして逆転写反応を行った。生成された HEK/eLuc 細胞の cDNA を用いて、Table 3 に示すプライマーセットを用いて、Table 4 に示す条件で PCR を行った。DNA ポリメラーゼには Taq DNA polymerase (TOYOBO) を使用した。PCR 反応後、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて分離し、特異的サイズの DNA 断片の有無により、

遺伝子の発現を確認した。

Table 3 Primers used for the RT-PCR of monocarboxylate transporters

Transporter (HUGO symbol)	GenBank accession No.	Orientation	Sequence (5' to 3')
MCT1 (SLC16A1)	NM_153276	Forward	CATCGGCTTCTCTTATGCATT
		Reverse	TTTGTGTTGGCTACAAGTCCC
MCT2 (SLC16A7)	NM_004731	Forward	CATTCCCCAAAGCTGTCACC
		Reverse	CTCCCCAAATCCAAGGCCAAA
MCT3 (SLC16A8)	NM_013356	Forward	GGGCTTCGGCCTCTCCTACGGCA
		Reverse	CTGAGACAAGAAGCTGTGTTCCCA
MCT4 (SLC16A3)	NM_004207	Forward	CTTCGGCTGTTTCGTCATCACTGG
		Reverse	CCCACACACGCAGCAGTTGAGCAG

Table 4 PCR conditions

Condition	Time	Cycles
95°C	30 sec	1
95°C	30 sec	35
60°C	30 sec	
60°C	1 min	
68°C	5 min	1
4°C		Hold

### トランスフェクション

HEK/eLuc 細胞 ( $4.0 \times 10^4$  cells/well) を poly-L-lysine でコーティングした白色 96 well マイクロタイタープレート (Sumitomo Bakelite) に播種した。1 日培養後、抗生物質を含まない培地に交換し、Lipofectamine 2000 を用いて、目的のプラスミドを導入した。4~6 時間後に、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を含む DMEM に交換し、さらに 48 時間培養し、その細胞を実験に使用した。

## 生物発光の測定

各 well の細胞を 0.1 mL の取り込み緩衝液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) または AR-C155858 (Chemscone, Monmouth Junction, NJ) を含む取り込み緩衝液で 5 分間プレインキュベーションし、その後 D-luc (2 μM) または D-luc と AR-C155858 を含む 0.1 mL の取り込み緩衝液に置換し、所定時間経過後、ルミノメーター (MicroLumatPlus LB96V; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) にて発光強度を測定した。

## データ分析

トランスポーター介在性輸送は、Michaelis-Menten 式 ( $v = V_{\max} \times s / (K_m + s)$ ) に従うと仮定することによって解析した。最大輸送速度 ( $V_{\max}$ ) および  $K_m$  は、Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA) を用いた非線形最小二乗回帰分析に基づいて、取り込み速度/発光強度 ( $v$ ) 対 基質濃度 ( $s$ ) のデータセットを式にフィッティングさせることによって算出した。

生物発光データは、独立した 3 回の実験について平均 ± S.E.として解析を行った。2 群間の比較については、スチューデントの  $t$  検定を用いて、または複数群の比較が必要な場合には、分散分析に続いてダネット検定を用いて行った。なお有意水準は、 $p < 0.05$  に設定した。

### 1-3 結果

#### 1. RT-PCR 法による HEK/eLuc 細胞における MCT1~4 の発現解析

現在、モノカルボン酸トランスポーターファミリーは Solute Carrier (SLC) superfamily の中の SLC16 群に分類され、ヒトにおいては以下の 14 種のトランスポーターが SLC16 ファミリーのメンバーとして同定されている (Table 5)。

Table 5 Monocarboxylate transporter family [63-66]

Transporter (HUGO symbol)	Expression	Substrate
MCT1 (SLC16A1)	Heart, brain, intestine, muscle, etc.	Lactate, pyruvate, ketone bodies, etc.
MCT2 (SLC16A7)	Liver, brain, sperm tails	Lactate, pyruvate, ketone bodies, etc.
MCT3 (SLC16A8)	Choroid plexus epithelia, retinal pigment epithelium	Lactate
MCT4 (SLC16A3)	Skeletal muscle, astrocytes, white blood cells, etc.	Lactate, ketone bodies
MCT5 (SLC16A4)	Brain, muscle, liver, placenta, etc.	Unknown
MCT6 (SLC16A5)	Kidney, placenta, intestine, lung, etc.	Nateglinide, bumetanide
MCT7 (SLC16A6)	Testis, spleen, heart, kidney	Ketone bodies
MCT8 (SLC16A2)	Liver, kidney, heart, muscle, etc.	T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>
MCT9 (SLC16A9)	Endometrium, testis, ovary, brain, etc.	Carnitine
MCT10 (SLC16A10)	Kidney, intestine, muscle, placenta, heart	T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub> , aromatic acids
MCT11 (SLC16A11)	Skin, lung, ovary, breast, pancreas, etc.	Unknown
MCT12 (SLC16A15)	Kidney, retina, lung, testis	Unknown
MCT13 (SLC16A13)	Breast, bone marrow stem cells	Unknown
MCT14 (SLC16A14)	Brain, heart, muscle ovary, prostate, etc.	Unknown

この中で、MCT1 (SLC16A1)、MCT2 (SLC16A7)、MCT3 (SLC16A8) および MCT4 (SLC16A3) については詳細な輸送機能や基質の探索などが検討されており、これらの生理的役割として、乳酸、ピルビン酸などの有機酸の輸送に関与することが示されている。そこで、HEK/eLuc 細胞における MCT1~4 の発現を確認するため、RT-PCR による解析を行った。Fig. 4 は、それぞれの遺伝子について、左側 (S) が HEK/eLuc 細胞の cDNA、右側 (P) はポジティブコントロール (Calu-3 細胞の cDNA) を使用した結果を示している。HEK/eLuc 細胞においては MCT1 の発現のみが確認され、MCT2、3、4 の発現は認められなかった。したがって、HEK/eLuc 細胞における主要なモノカルボン酸トランスポーターは MCT1 である



ことが示された。以前の報告でも、HEK293 細胞における MCT1~4 の発現については、MCT1 のみの発現が確認され、MCT2、3、4 については発現が認められていない [67] [68]。したがって、本結果は過去の報告と一致するものであった。

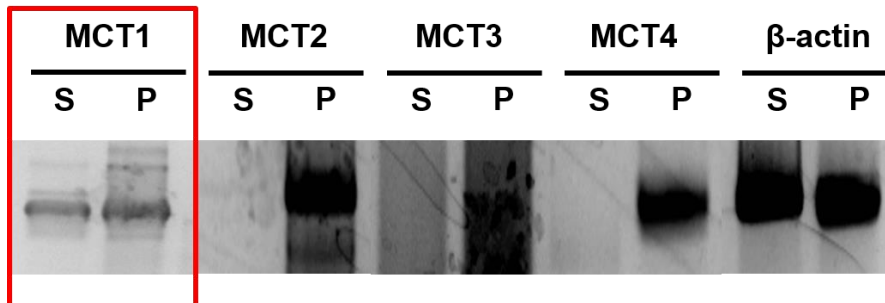


Fig. 4 RT-PCR analysis of the mRNA expression of monocarboxylate transporters (MCT1~4) in HEK/eLuc cells

## 2. D-luc-luciferase反応に与えるMCT1阻害剤 (AR-C155858) の影響

最近、アストラゼネカにおける T 細胞増殖抑制を標的とした創薬研究の過程において、MCT1 および MCT2 を選択的に阻害する AR-C155858 (Fig. 5) が見出されている [69]。そこで、先の RT-PCR 解析より、HEK/eLuc 細胞における主要なモノカルボン酸トランスポーターは MCT1 のみであったため、AR-C155858 を用いて MCT1 機能を阻害した状態における D-luc-luciferase 反応について検討した。

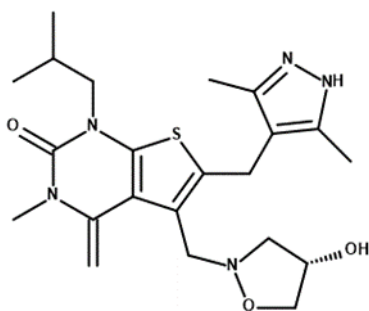


Fig. 5 Structure of AR-C155858, a specific inhibitor of MCT1 and MCT2

HEK/eLuc 細胞に D-luc を添加することにより、D-luc-eLuc を介した発光強度の増大が確認された (Fig. 6)。このことは細胞内に移行した D-luc が eLuc と反応したことを示している。また、その活性は AR-C155858 (10 μM) の添加により有意に阻害された (Fig. 6)。したがって、上述の RT-PCR の結果と合わせると、HEK/eLuc 細胞において D-luc は細胞膜透過性を示し、その膜透過過程には MCT1 が関与する可能性が示唆された。

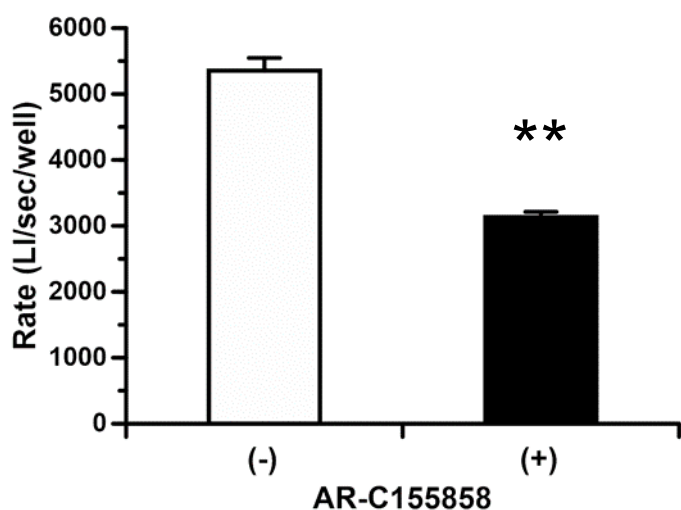


Fig. 6 Effect of AR-C155858 on D-luc-eLuc reaction in HEK/eLuc cells. Bioluminescence was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of D-luc (2 μM). Mean ± S.E. (n = 4), \*\**p* <.0.01 (vs. CTRL)

### 3. MCT1 の一過性発現が D-luc-eLuc 反応に与える影響

D-luc の細胞膜透過に MCT1 が関与している可能性を裏付けるために、HEK/eLuc 細胞に MCT1 を一過性発現させ、発光強度の増大が起きるか否か検討した。

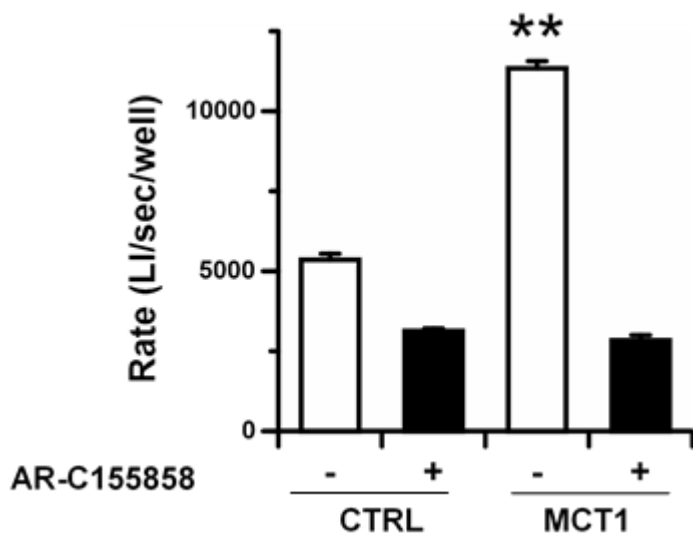


Fig. 7 Effect of heterologous expression of MCT1 on D-luc-eLuc reaction in HEK/eLuc cells. Bioluminescence was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of D-luc (2 μM). Mean ± S.E. (n = 4), \*\**p* < 0.01 compared with the control condition.

MCT1 を HEK/eLuc 細胞に一過性発現させた結果、D-luc 添加時における発光強度は有意に増大した。また、その発光強度の増大は AR-C155858 により消失し、発光強度レベルは CTRL と同じ値にまで低下した (Fig. 7)。この結果は、MCT1 が D-luc を基質として認識し、その細胞内への輸送を促進することで D-luc-eLuc 反応を増強していることを示唆するものである。さらに、HEK/eLuc 細胞における D-luc-eLuc 反応は、トランスポーターを外因的に導入することにより、発光強度を増強できることが示唆された。

#### 4. D-luc-luciferase 反応に対する AR-C155858 の濃度依存性

HEK/eLuc 細胞における D-luc 添加時の発光強度に対する AR-C155858 の阻害効果について、その濃度依存性を検討した。その結果、発光強度は AR-C155858 の添加濃度の増大に伴い低下し、0.1  $\mu\text{M}$  以降は一定値となった (Fig. 8)。この阻害プロファイルを解析した結果、みかけの  $\text{IC}_{50}$  値は 42.9 nM と算出された。この値は、MCT1 の乳酸輸送に対する AR-C155858 の  $K_i$  値 (2.3 nM) [69] [70] に近い値であった。前述の結果と合わせると、HEK293 細胞における D-luc の細胞膜透過過程に MCT1 が関与していることがより強く示唆された。

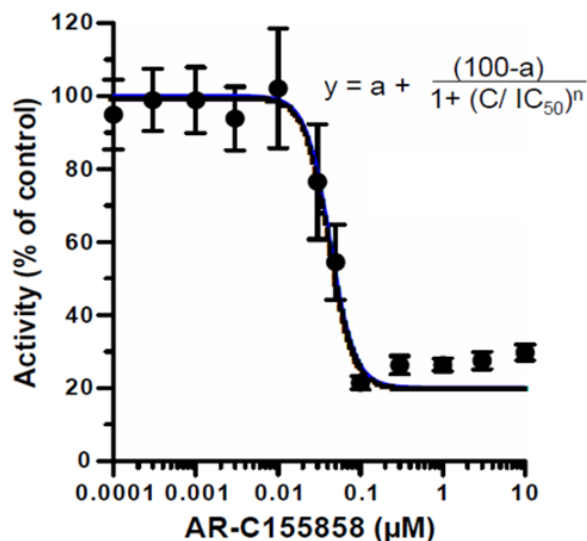


Fig. 8 Concentration dependency of AR-C155858 on D-luc-eLuc reaction in HEK/eLuc cells. Bioluminescence was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of D-luc (2  $\mu\text{M}$ ). Mean  $\pm$  S.E. (n = 4)

#### 1-4 考察

本章では、HEK/eLuc 細胞における内因性 D-luc トランスポーターを同定するにあたり、モノカルボン酸トランスポーターに着目して D-luc-eLuc 反応による生物発光に対する MCT の阻害剤や遺伝子導入の影響について検討を行った。RT-PCR による発現解析により、HEK/eLuc 細胞に発現する主要なモノカルボン酸トランスポーターは MCT1 のみであることが示された。また、HEK/eLuc 細胞に D-luc を添加することで生物発光が認められ、その発光強度は MCT1 の一過性発現により増大し、MCT1・MCT2 の選択的阻害剤である AR-C155858 により濃度依存的に阻害されることが明らかとなった。以上の結果より、HEK293 細胞における D-luc の細胞膜透過に MCT1 が関与していることが示唆された。

これまでに、培養細胞における D-luc の細胞膜透過過程に取り込み型トランスポーターの関与を示唆する 1 つの報告がある。Zhang らは [71]、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞株である MDCK II 細胞にホタルルシフェラーゼ (fLuc) を発現させ、D-luc 添加時の生物発光を評価し、MDCK II 細胞における発光強度が、同程度の fLuc 活性を有する HEK293 細胞やヒト前立腺がん由来細胞株である 22Rv1 細胞と比べて高いことを示している。さらに、この大小関係は、BCRP の阻害剤存在下においても同様であることから、排出トランスポーターの活性の違いによるものでなく、何らかの取り込みトランスポーターの発現量の違いに基づくことを指摘しているが、その分子の特定には至っていない。ここで、本研究成果と他の知見として MDCK II 細胞に MCT1 が高発現していること [72] を併せて考察すると、Zhang らの検討における細胞株間の発光強度の差異は MCT1 の発現レベルに起因するものと考えられる。

一方、現在までのところ、哺乳類細胞系において MCT1 を介した薬物や生体外異物の輸送を明確に示した例は報告されていない。MCT1 に関する研究は主に、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた電気生理学的手法によりなされている [73] [74]。これまでの研究により、MCT は、細胞内外のプロトン濃度勾配を駆動力として、乳酸、ケトン体、酢酸等の低分子モノカルボン酸を輸送することが示されている。また、内因性化合物以外では、安息香酸やサリチル酸の輸送も確認されている [74]。これらは、いずれも分子量が 150 以下の低分子であることから、MCT1 は分子量が大きい化合物を基質として認識しないと考えられてきた。しかし、本検討で輸送されることが明らかとなった D-luc は分子量が 300 程度の化合物であることから、MCT1 は比較的大きい分子サイズの化合物も基質として認識することが明らかとなった。したがって、本結果は、哺乳類細胞系において MCT1 が薬物トランスポーターとして機能することを示した初めての知見である。これまでに哺乳類細胞系において MCT1 による内因性化合物以外の輸送が確認されなかった要因として、MCT1 が低親和性トランスポーターであることが挙げられる。MCT1 の良好な内因性基質である乳酸であっても、その  $K_m$  値は数 mM レベルであることを考えると [73] [74]、他の化合物に対する認識性はさらに低いと推察される。また、低 pH 条件下で有機酸の輸送を測定する際、非解離形の増大に伴う単純拡散の影響が大きく、MCT1 介在性輸送を分離評価できない問題も考えられ

る。本検討では、細胞内の D-luc 濃度を eLuc との反応で生じた生物発光で高感度測定することで、これらの問題を結果的に克服しており、電気生理学的手法では困難なレベルの定量化に成功したものと考えられる。

MCT1 は、脳、肝臓、腎臓、心臓、筋肉等の全身に高発現していることから [37]、D-luc の体内分布に関与する主要なトランスポーターであると推察される。Lee や Berger ら [31] [75] はマウスにおける放射ラベルした D-luc の体内動態について検討を行い、D-luc が全身性に分布することを報告している。したがって、D-luc を用いた *in vivo* 生物発光イメージングにおいては、モニターする細胞や組織における MCT1 の発現やその程度を考慮する必要があり、特に発光強度の比較に基づく解析を行う際、その活性はルシフェラーゼに基づくものでない可能性があるため、データの解釈に注意が必要であろう。

## 第1章 小括

HEK/eLuc 細胞における生物発光強度は、細胞外への D-luc 添加により増加し、その活性は MCT1、2 の特異的阻害剤 AR-C155858 によって有意に阻害された。また、HEK293 細胞における MCT2~MCT4 の発現は認められず、主要なモノカルボン酸トランスポーターは MCT1 のみであった。HEK/eLuc 細胞に MCT1 を一過性発現させた結果、発光強度は有意に増大し、その増大分は AR-C155858 の添加により消失した。さらに、その発光強度に対する AR-C155858 のみかけの  $IC_{50}$  値は 42.9 nM であり、この値は MCT1 に対する  $K_i$  値と同等であった。以上の結果より、HEK293 細胞における D-luc 細胞膜透過過程に MCT1 が関与していることが示唆された。

## 第2章 外因性 D-luc トランスポーターの探索とその応用

### 2-1 HEK/eLuc における D-luc-eLuc 反応に及ぼす各種有機アニオン性トランスポーターの影響

#### 2-1-1 概論

生物発光イメージングにおいて、D-luc-ルシフェラーゼ反応による生物発光は、D-luc の濃度が一定条件であれば、細胞や組織に発現するルシフェラーゼの活性に依存するというコンセンサスに基づいて利用されている [76]。しかし、第1章において、D-luc-eLuc 反応のシグナル強度は、D-luc の細胞外から細胞内に移行する量、即ち細胞膜透過過程に依存することが明らかとなり、HEK293 細胞での D-luc の細胞膜透過過程にモノカルボン酸トランスポーターである MCT1 が関与することが示唆された。このことは、細胞内のルシフェラーゼ活性レベルに関わらず、細胞内への D-luc の移行を促進することができれば、生物発光を増強できることを示している。

一方、MCT1 は D-luc の輸送能を有するものの、その活性は十分高いものではない可能性が考えられる。MCT1 は  $H^+$  の濃度勾配を駆動力として基質の細胞内濃縮を触媒するトランスポーターであるが、 $H^+$  の濃度勾配がない条件下では細胞内外の基質の濃度差に基づく輸送を行うため、生理的条件下では MCT1 による濃縮的な D-luc 輸送はほとんど起こっていないと推察される。したがって、生物発光イメージングのシグナル強度を増大させるためには、D-luc の細胞膜透過性を上げることに加えて、細胞内への D-luc の集積性を高める方策が有効と考えられる。

現在までに、有機アニオン化合物を細胞内に濃縮的に取り込むことができる主要なトランスポーター群として、下記の SLC22A family と SLCO family が知られている (Table 6)。これらのトランスポーターは、基質認識性が広く、内因性化合物やその代謝産物等を基質とするだけでなく、生体外異物である薬物も基質として認識することが報告されている。

本章では、これら有機アニオントランスポーターのいずれかが濃縮的な D-luc の細胞内取り込みを行うこと、およびその輸送活性により D-luc-eLuc 反応が促進されることを仮定し、HEK/eLuc 細胞に各種ヒト有機アニオン性トランスポーターを一過性発現させ、D-luc-eLuc 反応に与える影響について検討した。

Table 6 Major organic anion (and zwitterion) transporters [77-80]

Transporter (HUGO symbol)	Expression	Substrate
OAT1 (SLC22A6)	Kidney, placenta	<i>p</i> -Aminohippurate, etc.
OAT2 (SLC22A7)	Kidney, liver	PGE <sub>2</sub> , salicylate, etc.
OAT3 (SLC22A8)	Kidney, brain	Estrone sulfate, etc.
OAT4 (SLC22A11)	Kidney, placenta	Estrone sulfate, PGE <sub>2</sub> , etc.
OCTN1 (SLC22A4)	Kidney, placenta, etc.	Quinidine, verapamil, etc.
OCTN2 (SLC22A5)	Skeletal muscle, kidney, etc.	Carnitine, L-lysine, etc.
OATP1A2 (SLCO1A2)	Brain	Estrone sulfate, pitavastatin, etc.
OATP1B1 (SLCO1B1)	Liver	Estrone sulfate, pravastatin, etc.
OATP2B1 (SLCO2B1)	Liver, intestine	Estrone sulfate, PGE <sub>2</sub> , etc.

## 2-1-2 実験方法

### 発現ベクターの作製

各トランスポーターの cDNA は、ヒト組織 total RNA (BioChain Institute Inc., Newark, CA) から調製した cDNA を鋳型とし、GenBank の配列に基づき設計したプライマーセットを用いて、KOD plus DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) による PCR により増幅した。得られた PCR 産物を鋳型とし、制限酵素部位を含むプライマーセットを用いて第 2 の PCR を行った。各トランスポーター cDNA 断片を単離するために使用したプライマーの配列および total RNA の由来組織を Table 7 に示す。得られた PCR 産物を対応する制限酵素で処理し、哺乳動物発現ベクターである pCI-neo (Promega, Madison, WI) に導入した。ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて最終産物のヌクレオチド配列を決定した。なお、OATP1B3-pcDNA3.1 は東京大学楠原教授より提供いただいた。

Table 7 Primers and total RNAs used for the cloning of transporters

Transporter (HUGO symbol)	GenBank accession no.	Total RNA source		Orientation	Sequence (5' to 3')
OAT1 (SLC22A6)	NM_153276	Kidney	1st	Forward	CAACCCAGCTGCGGAGGCAA
			PCR	Reverse	GATGCTTTCCTGAACCACAACCCC
			2nd	Forward <sup>a)</sup>	CTAGAATTCGCCATGGCCTTTAATGACCTC
			PCR	Reverse <sup>b)</sup>	GTCTCTAGACCTGTAGGACCTTCCCT
OAT2 (SLC22A7)	NM_006672	Kidney	1st	Forward	TCCCACCTCCAGAGTCCAAG
			PCR	Reverse	ACAGAATCCTCCCAACCGT
			2nd	Forward <sup>c)</sup>	GATCTCGAGTGGGTGAGCAGCATGGGG
			PCR	Reverse <sup>b)</sup>	ACTTCTAGACACTCCCACTTAGTCTCTG
OAT3 (SLC22A8)	NM_004254	Kidney	1st	Forward	GGGACCTCAACTACACTGATCACCA
			PCR	Reverse	AGTTCCTATCGCTGTTTATTGAAACCTCC



OCTN1 (SLC22A4)	NM_003059	Small intestine	2nd	Forward <sup>a)</sup>	AGCGAATTCTGCCATGACCTTCTCGGAGA
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	GACTCTAGAGGTGCCTGGCTAGGATCAG
			1st	Forward	GCAAGTTTCGGAGCGGCAGT
				PCR Reverse	ACGAATTTCTCCACAGGGTCTTA
OCTN2 (SLC22A5)	NM_003060	Small intestine	2nd	Forward <sup>a)</sup>	AGAATTCGGAGCGGCAGTGGGA
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	GTTCTAGAATTTCTCCACAGGGTCTT
			1st	Forward	GGACGGTCTTGGGTGCCTGC
				PCR Reverse	GGGGAAAGGGGTGGGGGACTTA
OATP1A2 (SLCO1A2)	NM_021094	Brain	2nd	Forward <sup>a)</sup>	TGGGAATTCGGGCATGCGGGACTACGACGAGGT
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	TCCTCTAGACAGTCTTTCCTCTTC
			1st	Forward	ATGGGAGAACTGAGAAAAGA
				PCR Reverse	CAATTTAGTTTTCAATTCATCATC
OATP1B1 (SLCO1B1)	NM_006446	Liver	2nd	Forward <sup>c)</sup>	GCCTCGAGTCATGGGAGAACTGAGAAA
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	CTTCTAGATTACAATTTAGTTTTCAATTC
			1st	Forward	ATCTATATTTCAATCATGGACC
				PCR Reverse	GGCATTTCTCTTTACTTAGGAT
OATP2B1 (SLCO2B1)	NM_007256	Small intestine	2nd	Forward <sup>c)</sup>	CAACTCGAGATCATGGACCAAAATCAAC
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	CACTCTAGAATCAATGCAATGCTGTT
			1st	Forward	TGCTTCTCTCCCCTGCTAAG
				PCR Reverse	GAAGGTGATCCAGGCGAGTG
			2nd	Forward <sup>c)</sup>	GAACTCGAGGTCATGGGACCCAGGATAG
				PCR Reverse <sup>b)</sup>	GTGTCTAGAGGAGGTACTGCTGTGGC

Underlined are restriction enzyme sites for EcoRI (a), XbaI (b) or XhoI (c).

## 取り込み実験

Poly-L-lysine でコーティングした 24 well プレートに HEK293 細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells/well になるよう細胞を播種し、その翌日、前章 1-2 に示した方法で、OAT1-pCI-neo をトランスフェクションした。なお、CTRL には、空ベクターである pCI-neo を用いた。

トランスフェクションした各 well の細胞を 0.5 mL の取り込み緩衝液で 5 分間プレインキュベーションし、その後 D-luc (2  $\mu$ M) を含む 0.5 mL の取り込み緩衝液で置換し、15 分間の取り込み時間経過後、氷冷した取り込み緩衝液で 3 回、各 well を洗浄した。洗浄後、0.1% ギ酸が含む 50% methanol 水溶液を 500  $\mu$ L を加え、室温で 30 分放置し、全量を回収した。その後、13,000 rpm で 30 分間遠心分離した後、上清を回収し、これを LC-MS/MS サンプルとした。

## LC-MS/MS による D-luc の定量

LC-MS/MS (Waters Xevo TQ-S 質量分析システム; Waters, Milford, MA) を用いて D-luc の細胞内濃度を測定した。サンプル (5  $\mu$ L) を、水相 0.1% ギ酸 (A (0.1 M)) および有機相メタノール (B) で流速 0.2 mL/分、カラム温度は 30°C で測定を行った。カラムは、オクタデシル基結合シリカゲルカラム (Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m カラム、100 mm  $\times$  2.1 mm; Waters) を用いた。グラジエントは 10% B で開始し、0.5 分間維持し、3.0 分にわたって

90% B に増加させ、3.0 分間 90% B で維持し、次いで平衡化するために 1.5 分にわたって 10% B の組成で移動相中の溶媒濃度を変化させた。

D-luc の親イオン  $m/z$  280.97 および娘イオン  $m/z$  177.01, 193.98 および 235.01 を ESI+モードでモニタリングした。イオン化パラメータは以下の通りである。

キャピラリー電圧: 3.0 kV ; 脱溶媒和温度: 500°C ; 脱溶媒和ガス流速: 1000 L/h ; ソース温度: 500°C; コーンガス流量: 50 L/h

### 2-1-3 結果

OAT1/SLC22A6、OAT2/SLC22A7、OAT3/SLC22A8、OATP1A2/SLCO1A2、OATP1B1/SLCO1B1、OATP1B3/SLCO1B3、OATP2B1/SLCO2B1、OCTN1/SLC22A4 および OCTN2/SLC22A5 を HEK/eLuc 細胞に一過性発現させ、2  $\mu$ M の D-luc の存在下で D-luc-eLuc 反応による発光強度を測定した (Fig. 9)。CTRL と比較して、発光強度は、OAT1 および OAT3 を発現する HEK/eLuc 細胞において顕著に増加し、それぞれ 13.6 および 2.24 倍であった。しかし、他の OAT や両性イオントランスポーターである OCTN、および OAT とは異なるファミリーに属する有機アニオントランスポーターである OATP は発光強度を変化させなかった。したがって、D-luc-eLuc 反応による発光強度の増大は OAT1 および OAT3 に特異的であることが示された。

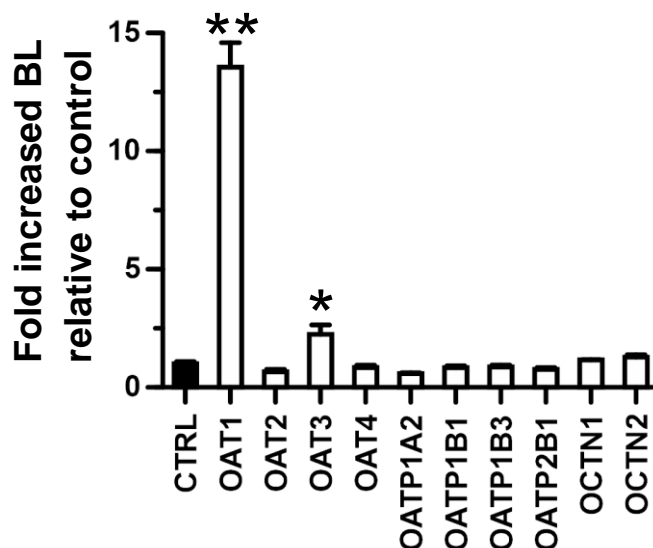


Fig. 9 The effect of various organic anion transporter genes on bioluminescence generated by the D-luc-eLuc reaction. An empty vector was used as the control. Bioluminescence was evaluated for 5 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of D-luc (2  $\mu$ M). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 compared with the control condition. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3–4).

OAT1 および OAT3 を一過性発現させた HEK/eLuc 細胞における発光強度の増大は、これらトランスポーターを介した D-luc の膜透過性の亢進および細胞内への集積によるものと考えられた。そこで、D-luc が OAT1 の基質であるか否かを決定するために、OAT1 を一過性に発現させた HEK293 細胞における D-luc の細胞内取り込みを LC-MS/MS を用いて定量評価した。D-luc (2  $\mu$ M) を細胞外に添加し、15 分間インキュベーションした結果、D-luc の細胞内取り込みは、OAT1 発現細胞では CTRL 細胞に比較し 62.2 倍大きい値を示した (Fig. 10)。また、速度論的解析により、OAT1 による D-luc の取り込みは、Michaelis-Menten 式に従い、飽和性を示し、 $K_m$  値は 0.23  $\mu$ M と算出された (Fig. 11)。これらの結果より、OAT1 は D-luc を輸送することが明らかとなった。さらに、OAT1 を介した細胞内への D-luc の取り込みは、

細胞内 D-luc 濃度を増大させ、eLuc による反応を促進することが示唆された。

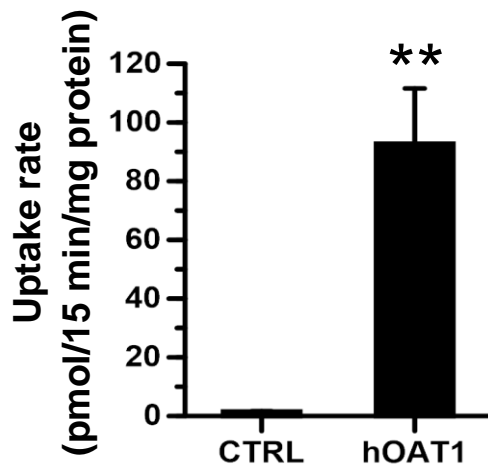


Fig. 10 Uptake of D-luc in HEK293 cells transiently expressing OAT1 alone. The uptake of D-luc (2  $\mu$ M) was evaluated for 15 min.  $*p < 0.05$  compared with the control condition. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3–4).

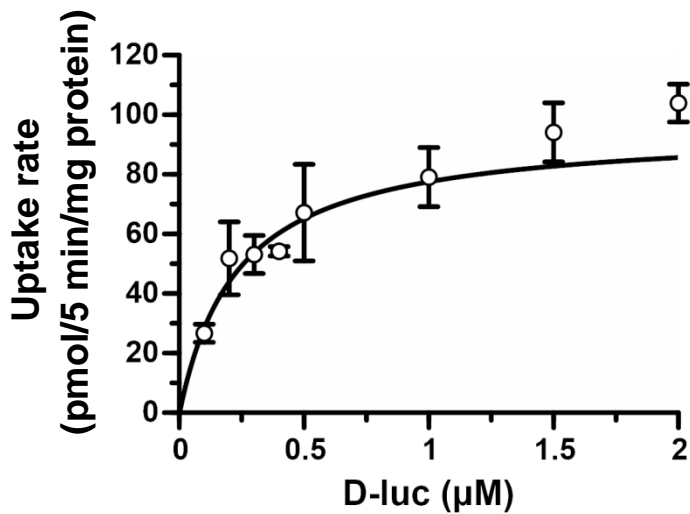


Fig. 11 Concentration-dependent uptake of D-luc mediated by OAT1 transiently expressed in HEK293 cells. The  $K_m$  value for D-luc was estimated as 0.23  $\mu$ M by non-linear curve fitting to the Michaelis–Menten equation. The OAT1-specific uptake was calculated by subtracting the uptake in the mock cells. The uptake was evaluated at 37°C and pH 7.4. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3–4).

#### 2-1-4 考察

本節では、HEK/eLuc 細胞において D-luc-eLuc 反応に及ぼす各種有機アニオントランスポーターの影響について検討した。その結果、OAT1 および OAT3 は D-luc を基質として認識するトランスポーターであることが示された。また、OAT1 による D-luc 輸送の  $K_m$  値は  $0.23 \mu\text{M}$  と算出され、D-luc は OAT1 に対して非常に高親和性の基質であることが示された。

OAT1 は、有機アニオンを基質として認識するトランスポーターである。OAT1 は、血液から腎臓の近位尿細管上皮細胞への物質輸送に関与し、栄養素、内因性代謝物、および薬物を含む生体異物など、広範囲の化合物の腎排泄に関与している。したがって、この非特異的かつ広範な基質特異性を有する OAT1 の特性により、生理学的条件においてアニオンおよびジアニオン性の形態で存在する D-luc が基質として認識されると推察される。しかし、OAT1 の D-luc に対する親和性 ( $K_m$  値:  $0.23 \mu\text{M}$ ) は極めて高く、その  $K_m$  値は OAT1 の典型的な生体内基質である *p*-アミノ馬尿酸の  $K_m$  値 ( $28.5 \mu\text{M}$ ) よりもはるかに小さい [81]。したがって、D-luc は OAT1 の特異的プローブとなり得ると考えられる。

また以前に、マウスを用いた D-luc の体内動態の検討において、放射性同位元素で標識された D-luc は、静脈内投与後、腎臓に顕著に蓄積することが報告されている [36]。マウス OAT1 はヒト同様、腎臓に高発現しているため、このことは今回の検討で得られた、D-luc は OAT1 により輸送されるという知見を支持するものである。

最近、取り込みトランスポーターを利用して細胞系における生物発光の増強に初めて成功した事例が報告されている [82]。HEK293 細胞にラット *Oatp1* を発現させることにより、D-luc ( $89 \mu\text{M}$ ) を添加した際の発光強度が、CTRL と比較し 2.6~5.6 倍増加したことが示されている [82]。しかし、本検討ではヒト OATP を用いて発光強度の有意な増強を検出することができなかった。この違いは、使用した D-luc の濃度条件、あるいは基質特異性における種差に起因すると考えられる。先のラット *Oatp1* の研究で検討された D-luc 濃度 ( $36\sim 536 \mu\text{M}$ ) は、本検討におけるトランスポーターの機能的スクリーニングに用いた濃度 ( $2 \mu\text{M}$ ) よりもはるかに高い。さらに、D-luc のラット *Oatp1* の見かけの  $K_m$  値 ( $166 \mu\text{M}$ ) [82] は、OAT1 の  $K_m$  ( $0.23 \mu\text{M}$ ) よりもはるかに大きい。ここで、両トランスポーターが同程度の輸送効率 (同等の  $V_{\max}$  値を有する) と仮定すると、ラット *Oatp1* による取り込み速度は、線形性を示す条件下で OAT1 の取り込み速度よりも約 720 倍低いと見積もられる。したがって、今回の実験条件では、OATP による発光強度の増強は検出が困難であった可能性がある。あるいは、トランスポーターの基質特異性が、ヒト OATP とラット *Oatp1* とで異なり、ヒト OATP による D-luc 輸送活性が低い可能性も考えられる。Kullak-Ublick らの報告 [83] によれば、ラット *Oatp1* はヒト OATP1A2 と最も高い相同性 (67%) を有するものの、ラット *Oatp1* に対応するヒトのパラログ遺伝子は存在しないことがゲノム解析によって明らかにされている。

## 2-2 OAT1 を介した 6-carboxyfluorescein の取り込みに対する D-luc の阻害効果

### 2-2-1 概論

前節において、OAT1 が D-luc を基質として認識し、細胞内に濃縮的に取り込むトランスポーターであることが明らかとなった。このことから、OAT1 を利用することにより、生物発光イメージングのシグナル強度が増大し、*in vivo* における遺伝子発現動態の解析や細胞の追跡に応用できる可能性が考えられる。そこで、より詳細な OAT1 の D-luc 輸送解析とともに *in vivo* における生物発光イメージングを検討するために、OAT1 安定発現株である HEK/eLuc/OAT1 細胞の作製を試みた。

一方、HEK/eLuc/OAT1 細胞では、D-luc が eLuc により速やかに代謝を受けるため、OAT1 による D-luc 輸送活性を直接的に解析するのは困難である。一般に、OAT1 の輸送評価では、基質として放射性同位体標識された *p*-アミノ馬尿酸や蛍光基質である 6-carboxy-fluorescein (6-CF) [81] [84] が用いられる。

本節では、作製された HEK/eLuc/OAT1 細胞における OAT1 を介した 6-CF の取り込み活性を評価し、それに対する D-luc の効果を検討することで、OAT1 と D-luc の相互作用の評価を行った。

### 2-2-2 実験方法

#### HEK/eLuc/OAT1 細胞の作製

OAT1-pCI-neo を EcoRI と NotI で切断して得られた OAT1 断片を pEBMulti-Hyg (Wako Pure Chemical Industries) に導入することにより、OAT1 (OAT1-pEBMulti-Hyg) のエピソーム発現ベクターを作製した。第 1 章の方法 (1-2) と同様に、HEK/eLuc 細胞に OAT1/pEBMulti-Hygro を導入し、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の hygromycinB の存在下で 1 週間培養することで OAT1 の安定発現株を得た。

#### 6-CF 取り込み実験

細胞の播種や取り込み実験の過程は第 1 章の方法 (1-2) と同様に行った。細胞を洗浄後は、細胞を室温で 0.2% Triton X-100 含有する 20 mM TRIS 溶液 (0.2 mL) に可溶化した。各サンプル (150  $\mu\text{L}$ ) に含まれる 6-CF 量は、485/520 nm の励起/蛍光波長における蛍光をプレートリーダー (Varioskan TM Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) により定量した。

### 2-2-3 結果

HEK/eLuc/OAT1 細胞において顕著な 6-CF の取り込みが確認され、CTRL 細胞では 6-CF の取り込みは検出限界レベルであった。この OAT1 を介した 6-CF の取り込みは Michaelis-Menten 式に従い、その  $K_m$  値は  $3.90 \mu\text{M}$  と算出され (Fig. 12A)、この値は以前の 6-CF による OAT1 の機能解析での報告値 ( $3.93 \mu\text{M}$ 、 $6.94 \mu\text{M}$ ) [85] と一致した。OAT1 による 6-CF の取り込みに対する D-luc の阻害効果を検討した結果、D-luc は濃度依存的に 6-CF 取り込みを減少させ、半数阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は  $1.14 \pm 0.37 \mu\text{M}$  であった (Fig. 12A)。

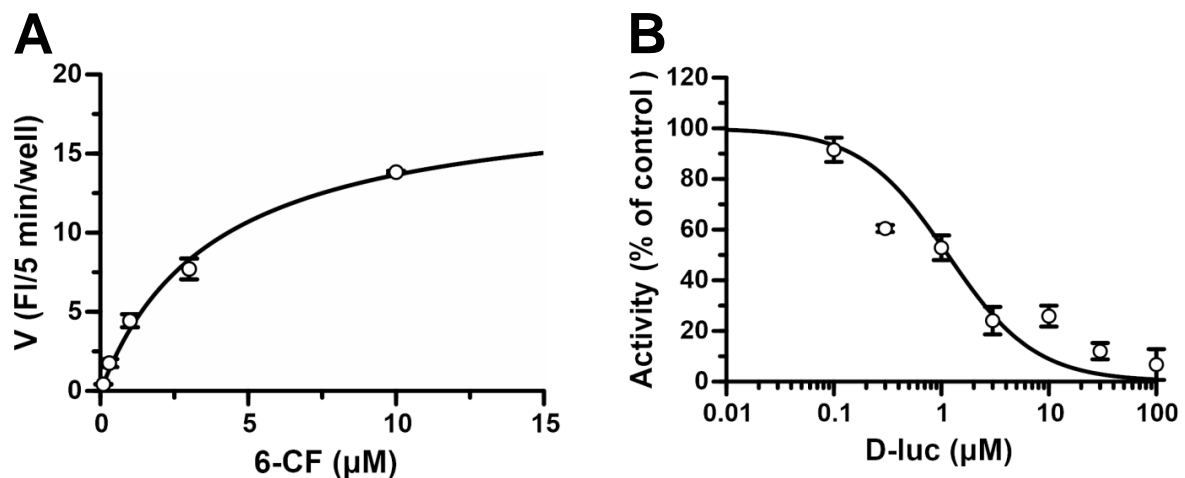


Fig. 12 Inhibitory effect of D-luc on 6-CF uptake mediated by OAT1

(A) The concentration dependence of 6-CF uptake in HEK293/eLuc/OAT1 cells. The  $K_m$  value for 6-CF was estimated as  $3.90 \mu\text{M}$ . (B) Inhibition profile of 6-CF ( $5 \mu\text{M}$ ) uptake by D-luc. The  $IC_{50}$  value of D-luc was  $1.14 \pm 0.37 \mu\text{M}$ . The uptake was evaluated for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  and pH 7.4. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

### 2-2-4 考察

本節では、OAT1 を安定発現させた HEK/eLuc/OAT1 細胞を用いて、OAT1 を介した 6-CF の取り込みの評価を行い、その輸送に対する D-luc の阻害効果を検討した。その結果、HEK/eLuc/OAT1 細胞における顕著な 6-CF の輸送が確認できたことから、OAT1 を高発現する HEK/eLuc/OAT1 細胞の作製に成功したことが示された。OAT1 による 6-CF の取り込みに対する D-luc の  $IC_{50}$  値は  $1.14 \pm 0.37 \mu\text{M}$  であり、競合阻害を仮定したモデル式 [ $K_i = IC_{50} / (1 + s/K_m)$ ] にあてはめて阻害定数 ( $K_i$ ) を算出すると、 $0.50 \mu\text{M}$  となった。この値は、前節の OAT1 による D-luc の輸送解析で求められた  $K_m$  値 ( $0.23 \mu\text{M}$ ) とほぼ等しいことから、その阻害様式は競合阻害であることが示唆され、本検討からも D-luc が OAT1 の基質となることを支持する結果を得ることができた。

## 2-3 HEK/eLuc/OAT1 における D-luc-eLuc 反応の解析

### 2-3-1 概論

第2章第2節より、OAT1の基質である6-CFの取り込みに対するD-lucの効果は、競合阻害である可能性が示唆された。第2章第1節の結果と合わせると、OAT1はD-lucを基質として認識することが強く示唆された。

本節では、HEK/eLuc/OAT1細胞におけるD-luc-eLuc反応を解析することで、*in vivo*における生物発光イメージングの応用に繋がると考え、発光強度の時間依存性および濃度依存性を検討し、OAT1により増大したD-luc-eLuc反応の解析を行った。

### 2-3-2 実験方法

#### 生物発光の測定

第1章第1部で記した方法と同様の方法で、HEK/eLuc細胞およびHEK/eLuc/OAT1細胞 ( $4.0 \times 10^4$  cells/well) を poly-L-lysine でコーティングした白色 96 well マイクロタイタープレートに播種した。1日後、各 well の細胞を 0.1 mL の取り込み緩衝液で 5 分間プレインキュベーションし、その後 D-luc (2  $\mu$ M) 0.1 mL の取り込み緩衝液に置換し、所定時間経過後、ルミノメーターにて発光強度を測定した。

#### データ分析

第1章第1部で記した方法と同様の方法で、トランスポーター介在性輸送は、Michaelis-Menten 式 ( $v = V_{\max} \times s / (K_m + s)$ ) に従うと仮定することによって解析した。

生物発光データは、独立した3回の実験について平均  $\pm$  S.E.として解析を行った。2群間の比較については、スチューデントのt検定を用いて、または複数群の比較が必要な場合には、分散分析に続いてダネット検定を用いて行った。なお有意水準は、 $p < 0.05$  に設定した。

### 2-3-3 結果

HEK/eLuc/OAT1細胞において、細胞外D-lucを様々な濃度(0.1~2.0  $\mu$ M)で添加した結果、いずれの濃度においても発光強度は直ちに最大レベルまで上昇し、徐々に低下し、約15分後に定常状態に達した(Fig.13A)。定常状態(添加後15分)における発光強度は、濃度依存性かつ飽和性を示し(Fig. 13B)、Michaelis-Menten式に基づき算出された見かけの $K_m$ 値は0.36  $\mu$ Mであった。



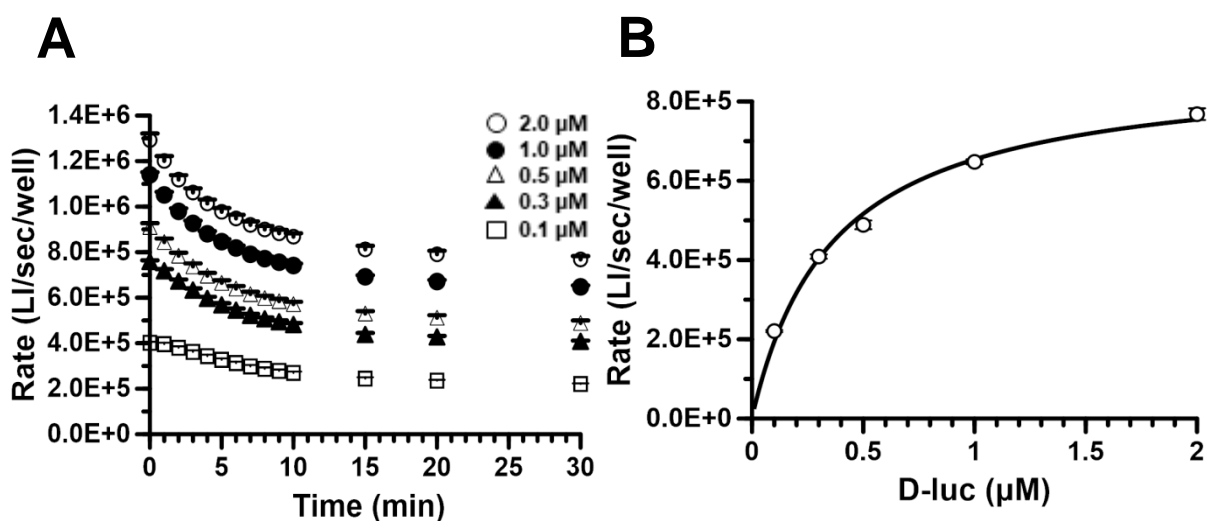


Fig. 13 Functional characteristics of the D-luc–eLuc reaction in HEK293/eLuc/OAT1 cells  
 (A) Time courses of bioluminescence (BL) in the presence of varied concentrations of D-luc (0.1–2  $\mu\text{M}$ ). BL intensities generally reached a steady state at 15 min. (B) BL dependence on D-luc concentration. BL intensities increased with increasing concentrations of D-luc. The apparent  $K_m$  value for D-luc was estimated as 0.36  $\mu\text{M}$ .

#### 2-3-4 考察

ルミノメーターにより測定される発光強度は、単位時間あたりにカウントされた光子数 (photon/sec) であるため、実質的には発光速度 (D-luc–eLuc 反応の速度) を表している。したがって、HEK/eLuc/OAT1 細胞で認められた発光強度の変化より、発光速度は D-luc 添加直後が最大であり、その後、徐々に低下し、15 分後に定常状態に達したことになる。

D-luc–eLuc 反応の見かけの反応速度は、D-luc の細胞膜透過および eLuc の酸化反応の二つの過程により制御されている。HEK/eLuc/OAT1 細胞における発光強度の速度論的解析を行った結果、 $K_m$  値は 0.36  $\mu\text{M}$  と算出され、OAT1 (0.23  $\mu\text{M}$ ) の  $K_m$  と同等であった。一方、eLuc による D-luc の酸化反応は  $K_m$  値が 80  $\mu\text{M}$  であることが示されている [41]。これらのことから、検討した D-luc 濃度 (2  $\mu\text{M}$  以下) 条件下においては、D-luc–eLuc 反応に起因する発光強度は、OAT1 による細胞膜透過過程に依存していることが示唆される。すなわち、OAT1 による D-luc 輸送が HEK/eLuc/OAT1 細胞における生物発光の律速段階となっていると考えられる。実際、D-luc–eLuc 反応の見かけの速度は、細胞外からの D-luc の流入と細胞内での D-luc–eLuc 反応が同じ速度で起こる平衡状態に達することからも、系全体の反応速度が細胞膜透過過程に依存していると推察される。したがって、OAT1 の発現量の増大は D-luc–eLuc 反応による生物発光の増強に直結することが見込まれるため、目的とする eLuc 発現細胞に OAT1 を高度に発現させる技術が確立できれば、更なる生物発光の増強が可能になると考えられる。

## 2-4 OAT1 を介した *in vivo* 生物発光イメージングの最適化

### 2-4-1 概論

これまでの検討結果より、OAT1 を用いることで培養細胞における D-luc-eLuc 反応をより効率的に行えることが明らかとなった。

本節では、OAT1 が動物個体における生物発光イメージングの感度を改善し得るかどうかを検証するために、HEK/eLuc/OAT1 および HEK/eLuc 細胞を皮下移植したマウスおよびラットを用いて、D-luc 腹腔内投与による生物発光のイメージングを検討した。

### 2-4-2 実験方法

#### 実験動物

本実験では、4 週齢の Wistar 雄性ラット (東京実験動物) および 4 週齢の ICR 雄性マウスを用いた。飼料と水は自由摂取とし、恒温 (23±1°C)、恒湿 (55±5%)、定時照明 (12 時間明所 7:00~19:00、12 時間暗所 19:00~7:00) の人口環境下で飼育した。動物の飼育、実験操作は「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年総理府公示第 6 号)」及び「東京薬科大学実験動物規程 (平成 22 年 東京薬科大学学長)」に則って行った。

#### *In vivo* 生物発光イメージングの評価

マウスおよびラットを用いた *in vivo* 生物発光イメージングは、IVIS ルミナシリーズ III (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) を用いて行った。PBS に懸濁した HEK/eLuc 細胞または HEK/eLuc/OAT1 細胞 (それぞれ  $1 \times 10^6$  cells/2 mL/kg) を、画像化の 60 分前にマウスまたはラットの大腿部皮下に移植した。各用量の D-luc (5~100 mg/kg) を腹腔内投与後、以下の設定で生物発光をモニタリングした。

Resolution and sensitivity: Binning medium (中解像度/中間度), F/Stop: 1 (絞り無し), Exposure time: 60 s

D-luc で処置した動物で得られたシグナルからバックグラウンドを差し引くことによって、D-luc-eLuc 反応に特異的な生物発光を定量化した。

### 2-4-3 結果

20 mg/kg の D-luc 投与後 30 分における生物発光のシグナル強度は、HEK/eLuc 細胞を移植した部位に比較し、HEK/eLuc/OAT1 細胞が移植された部位において有意に高いことが示された (Fig. 14A)。また、マウスに比べ、皮膚の厚いラットを用いた検討においても同様の結果が認められた (Fig. 14B)。次に、マウスに 20 mg/kg の D-luc を投与した後の発光強度の時間推移による変化を検討した結果、HEK/eLuc/OAT1 細胞を移植した部位では、投与後約 30 分で最大となり、以降は緩やかに減少した (Fig. 15A)。一方、HEK/eLuc 細胞を移植した部位では、いずれの時間においても発光強度は微弱であった。投与後約 30 分における大腿部の発光強度は、HEK/eLuc/OAT1 細胞移植部位では HEK/eLuc 細胞と比較して 29.8 倍の発光強度を示した。さらに各用量の D-luc を投与後 30 分における発光強度について検討した結果、HEK/eLuc/OAT1 細胞移植部位における発光強度は濃度依存的に増加し、検討した最大用量である 100 mg/kg で最大となった (Fig. 15B)。

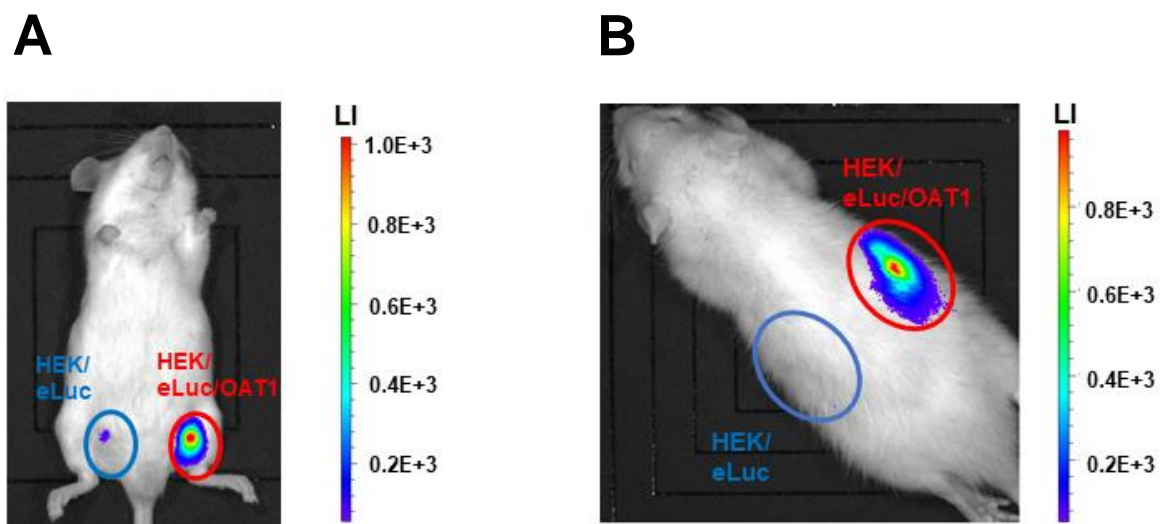


Fig. 14 (A) A representative image of *in vivo* bioluminescence in a living mouse 30 min after administration of D-luc (20 mg/kg, i.p.). (B) A representative image of *in vivo* bioluminescence in a living rat 30 min after administration of D-luc (20 mg/kg, i.p., n = 3). HEK293/eLuc/OAT1 cells (red) and HEK293/eLuc cells (blue) were subcutaneously implanted.

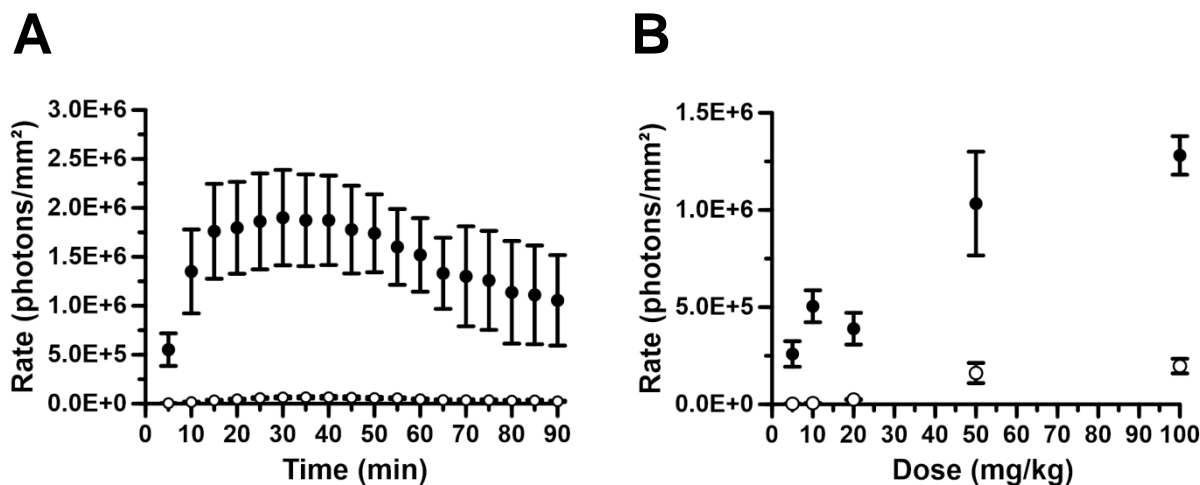


Fig. 15 (A) Time courses of bioluminescence intensities in the right and left femoral regions in mice, where HEK293/eLuc/OAT1 cells (●) and HEK293/eLuc cells (○) were subcutaneously implanted, respectively, after the administration of D-luc (20 mg/kg, i.p.). (B) Concentration dependence of bioluminescence intensities 30 min after the administration of varied doses of D-luc. Data are presented as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3–4).

### 第3節 考察

本節では、OAT1 を利用することにより、従来の方法に比較し、マウスおよびラットを用いた *in vivo* 生物発光イメージングを高感度を実施することに成功した。

本検討で用いた D-luc の投与量 (20 mg/kg) は、従来、標準的に用いられている投与量の 1/10 以下である [86]。以前の報告では、この投与量で行った *in vivo* 生物発光イメージングでは、発光強度は 15 分で最大となり、それ以降は急激に減少するため、30 分以降では十分な発光が認められなくなることが示されている [87]。本検討では、OAT1 を利用することにより、90 分の時点においても十分な発光強度が得られている。

現在、*in vivo* 生物発光イメージングではマウスがモデル動物として主体的に利用されている。これは、マウス以上の大きさの小動物では皮膚が厚く、生体外部へ生物発光が透過する際に皮膚が障壁となるためである [88]。しかし、本検討では OAT1 を用いることにより、従来の 1/10 以下の D-luc 投与量においてもラットを用いたイメージングに成功することができた。

## 第2章 小括

本章では、細胞内への D-luc の積極的な取り込みを媒介し、D-luc-eLuc 反応を増強するトランスポーターの探索とその生物発光イメージングへの応用について検討した。候補として有機アニオントランスポーターを取り上げ、これらの一過性発現が HEK/eLuc 細胞における D-luc-eLuc 反応に与える影響について検討し、OAT1 および OAT3 の発現により、D-luc 添加時における発光強度が顕著に増大することを見出した。OAT1 を一過性発現させた HEK293 細胞における D-luc の細胞内取り込みを評価した結果、著しい細胞内への D-luc の蓄積が認められた。速度論的解析より、D-luc の輸送は飽和性を示し、 $K_m$  値は  $0.23 \mu\text{M}$  であった。また、この値は、HEK/eLuc/OAT1 細胞における OAT1 を介した 6-CF 取り込みに対する D-luc の  $K_i$  値と同等であった。したがって、OAT1 は D-luc を良好な基質として認識し、細胞内へ濃縮的に輸送することで、D-luc-eLuc 反応を増強することが示唆された。HEK/eLuc/OAT1 細胞における発光強度の解析より、定常状態における生物発光反応の見かけの  $K_m$  値が  $0.36 \mu\text{M}$  と算出され、eLuc に対する D-luc の  $K_m$  値 ( $80 \mu\text{M}$ ) よりも、上記の OAT1 に対する  $K_m$  値に近いこと、その反応における律速段階は、D-luc の酸化反応ではなく、OAT1 による D-luc の取り込み過程であることが示唆された。

さらに、HEK/eLuc 細胞を移植したマウスおよびラットを用いた *in vivo* 生物発光イメージングの検討より、D-luc 低投与量の条件下であっても、OAT1 を導入することで HEK/eLuc 細胞を高感度にイメージングすることに成功した。

したがって、eLuc 細胞に D-luc トランスポーターとして機能する OAT1 を高発現させることにより、高感度な *in vivo* 生物発光イメージングが可能となり、より詳細な Luc 細胞の追跡や体内動態の解析に利用できると思われる。

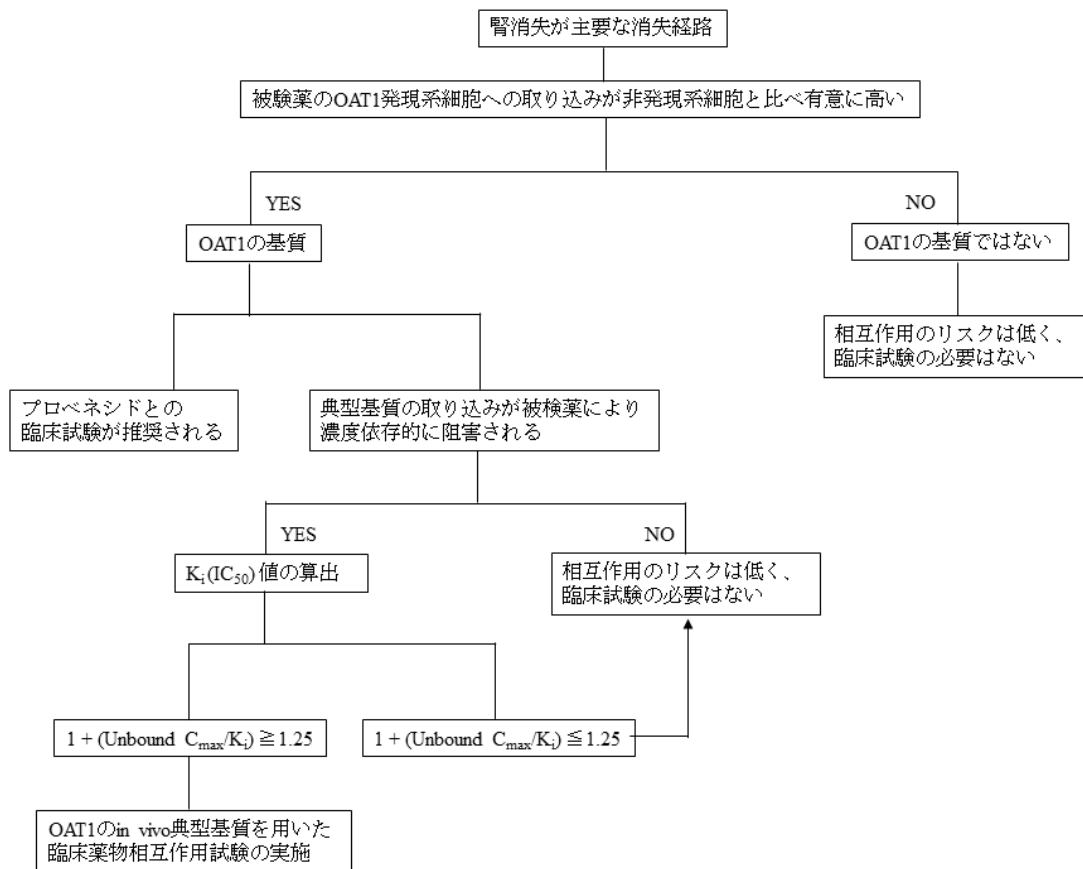
## 第3章 生物発光イメージングを利用した OAT1 を介した薬物間相互作用の評価

### 3-1 概論

医薬品は実際の医療の現場において単剤で使用されることは稀であり、常にいくつかの医薬品と併用して用いられている。その中で問題となっているのが、併用薬との薬物間相互作用である。薬物間相互作用とは、複数の医薬品を併用した際に、薬物動態の変動、薬効の増強や副作用の発生等の問題が起こることである。したがって、薬物間相互作用を適切に評価することは、臨床上で起こりうる有害事象の回避に繋がると期待される。最近では、医薬品開発の前臨床段階（あるいはその初期段階）において薬物間相互作用の評価を行うことが推奨されている [89-92]。

従来、薬物間相互作用の評価対象は、シトクロム P450 を中心とした薬物代謝酵素であったが [91-96]、最近では、それらを介した相互作用に加え、トランスポーター介在性の相互作用の潜在性・重要性が指摘されている [90]。薬物の体内動態に関わるトランスポーターの多くは、基質認識性が大きく、様々な薬物を基質あるいは阻害剤として認識するため、互いの薬物の体内動態を変動させることがある。例えば、強心配糖体である digoxin と抗不整脈薬である quinidine を併用した際、quinidine が P 糖タンパク質 (P-gp) を阻害することにより、digoxin の血中濃度が上昇することが古くから知られている [97]。また、脂質異常症治療薬である pitavastatin と免疫抑制剤である cyclosporine の併用により、pitavastatin の肝取り込みに関わる OATP の阻害により、pitavastatin の AUC が 10 倍以上に増大することが報告されている [98]。このようなトランスポーター介在性の薬物間相互作用の評価の重要性から、2012 年～2014 年に、米国食品医薬品局 (FDA) [99]、欧州医薬品庁 (EMA) [100]、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) [90] により、医薬品開発段階における薬物間相互作用のリスク評価に関するガイダンス・ガイドラインが示され、7つの薬物トランスポーター (P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2) が評価対象として指定されている。

PMDA のガイドラインでは、重篤な相互作用リスクが疑われる場合、最終的にヒトにおける薬物相互作用試験の実施が必要となるが、そのリスク評価は基本的に対象トランスポーターを発現する培養細胞を用いた *in vitro* 試験で行われる。例として OAT1 に対する評価における decision tree を Scheme 1 に示す [90] [101]。



Scheme 1 Decision tree of OAT1 mediated drug-drug interaction [89]

*In vitro* 試験にあたっては、医薬品候補化合物（被験薬）の発現細胞への取り込みのほかに、典型基質および典型阻害薬を用いた検討も行われる。これらの過程で薬物トランスポーターと強く相互作用する被験薬は薬物間相互作用のリスクが高いと判断されるため、そのリスクを回避するためには、医薬品候補化合物を絞り込んでいく医薬品開発の初期段階から、薬物トランスポーターとの相互作用を評価することが望ましい。しかし、多くの医薬品候補化合物個々について評価するのは困難かつ高コストであるため、そのようなニーズに対応するためには迅速かつ簡便な薬物間相互作用評価システムの構築が必要となる。

一方、第2章の検討により、HEK/eLuc細胞にOAT1を発現させることにより、細胞内D-luc濃度が上昇し、発光強度が有意に増大することを明らかとした。本章では、この成果を、OAT1を介した薬物間相互作用の評価系として応用利用できる可能性を考え、*in vitro*におけるOAT1を介した生物発光のイメージングと、その画像解析に基づく各種阻害剤による生物発光の阻害効果について検討を行った。

### 3-2 実験方法

#### In vitro 生物発光イメージング

HEK/eLuc 細胞および HEK/eLuc/OAT1 細胞 ( $4.0 \times 10^4$  cells/well) を poly-L-lysine でコーティングした白色 96 well マイクロタイタープレートに播種した。1 日後、各 well の細胞を 0.1 mL の取り込み緩衝液で 5 分間プレインキュベーションし、その後、D-luc あるいは D-luc と阻害剤 (probenecid (Wako Pure Chemical Industries), telmisartan (Tokyo Chemical Industry), mefenamic acid (Sigma)) を含む 0.1 mL の取り込み緩衝液で置換することにより、*in vitro* 生物発光イメージングを開始した。生物発光は、IVIS ルミナシ리즈 III (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) を用いて、 $12.5 \times 12.5$  cm (FOV), small binning, 20 s exposure time の設定で観測した。

### 3-3 結果

Fig. 16 に D-luc 添加時における HEK/eLuc/OAT1 細胞から生じた生物発光のイメージングによる画像データを示す。HEK/eLuc/OAT1 細胞の発光強度は、細胞外 D-luc 濃度の増加とともに増加した (Fig. 16A)。また、 $2 \mu\text{M}$  で、HEK/eLuc/OAT1 細胞では発光強度がプラトーに達し、HEK/eLuc 細胞では発光強度はごくわずかにしか観測されなかった。さらに、OAT1 により増強された発光強度は、OAT1 特異的阻害剤によって用量依存的に阻害された (Fig. 16B, C)。OAT1 介在性の発光強度に対する probenecid、mefenamic acid および telmisartan の  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ文献で報告された  $\text{IC}_{50}$  値と同等の  $13.9 \pm 2.8$ 、 $5.43 \pm 0.82$  および  $0.89 \pm 0.16 \mu\text{M}$  であった ( $11.2 \mu\text{M}$  [85]、 $1.09 \mu\text{M}$  [102] および  $0.27 - 0.36 \mu\text{M}$  [103])。



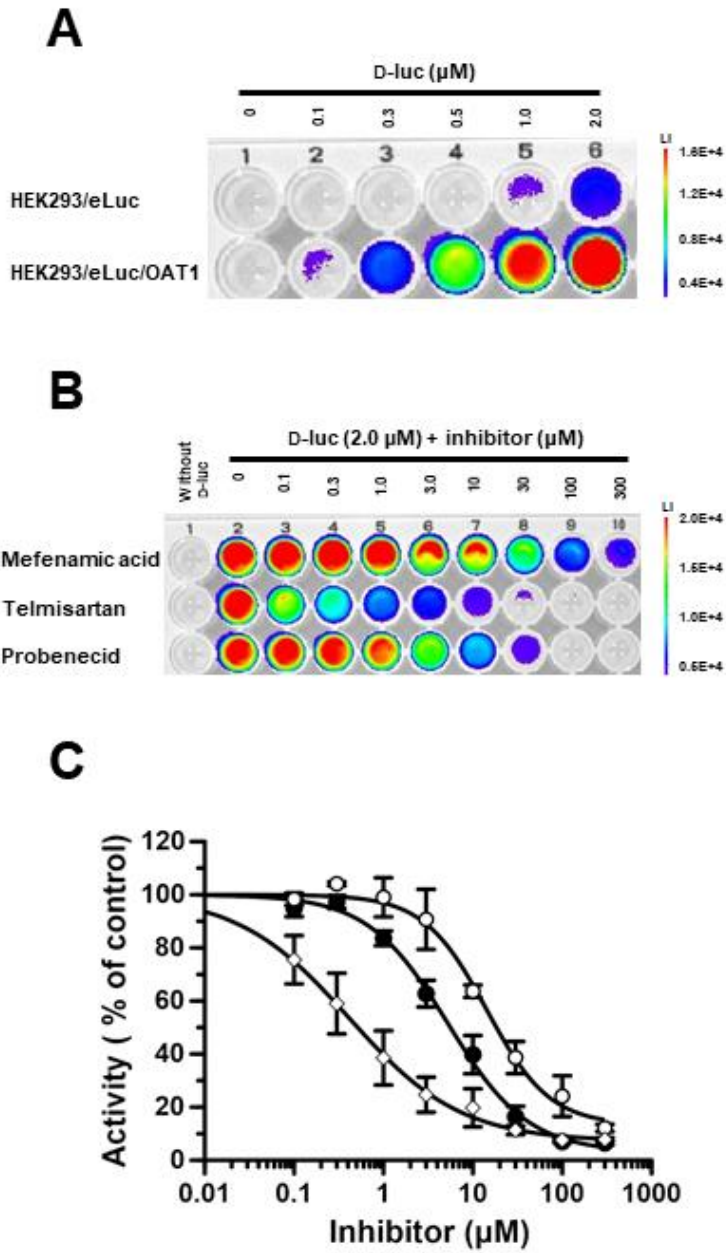


Fig. 16 Inhibitory effect of specific OAT1 inhibitors on the BL. (A) A representative image of BL in the presence of varied D-luc concentrations (0.1–2  $\mu$ M) (B) A representative image of BL in the presence of varied concentrations of inhibitors. (C) The  $IC_{50}$  values for probenecid, mefenamic acid, and telmisartan were  $13.9 \pm 2.8$ ,  $5.43 \pm 0.82$ , and  $0.89 \pm 0.16$   $\mu$ M, respectively. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). BL intensities in (C)–(E) were measured by using IVIS system.

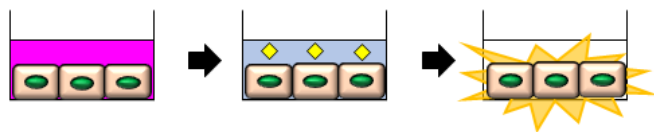
### 3-4 考察

本章では、D-luc-eLuc 反応による生物発光を指標に、OAT1 を介した薬物間相互作用の評価の可否について検討した。HEK/eLuc/OAT1 細胞における *in vitro* 生物発光は IVIS を使用することによって容易にイメージング可能であった。また、OAT1 阻害剤の添加による阻害効果も同様にイメージングでき、画像解析の結果から IC<sub>50</sub> 値を算出することも可能であった。さらに、D-luc-eLuc 反応に対するそれらの IC<sub>50</sub> 値は、以前の報告値とほぼ一致した。これらの結果は、OAT1 を介した D-luc-eLuc 反応に対する被験薬の阻害効果をイメージングし、画像解析することで、被験薬と OAT1 との相互作用及び OAT1 を介した薬物間相互作用の可能性を評価できることを示唆している。

一般に、典型基質を用いる従来の評価過程では、放射性同位元素で標識した基質あるいは LC-MS/MS による測定を前提とした基質を利用して、それらの細胞内への蓄積量を定量しなければならないため、複数の処理ステップを踏む必要がある (Fig. 17)。経験的には、1 サンプルの評価 (取り込みおよび測定) に要する時間は、おおよそ 15 分~1 時間である。一方、この生物発光による評価系を用いれば、D-luc を含む取り込み緩衝液に被験薬を加え、OAT1 と eLuc を発現する細胞に添加するだけで、OAT1 に対する被験薬の効果を数秒以内に評価することが可能である。本法は、現在までに報告されている薬物トランスポーターの機能評価法の中で、ダイナミックレンジが極めて大きく、最も簡便かつ迅速な評価方法と位置付けられる。

以上より、トランスポーター介在性の D-luc-eLuc 反応に基づく発光強度の評価は、OAT1 (おそらく OAT3 においても) を介した薬物間相互作用を評価するための高感度かつ迅速な非侵襲性のハイスループットスクリーニングシステムの開発にも役立つことが期待される。

#### Bioluminescence assay



#### Uptake assay



Fig. 17 Measurement procedures of bioluminescence assay and uptake assay

### 第3章 小括

本章では、生物発光イメージングを用いることにより、OAT1 を介した薬物間相互作用の評価系への応用の可能性およびその画像解析に基づく各種阻害剤による生物発光の阻害効果について検討を行った。HEK/eLuc/OAT1 細胞における生物発光は IVIS を使用することによって容易にイメージング可能であり、各種 OAT1 阻害剤の添加による阻害効果も同様にイメージングでき、画像解析の結果から IC<sub>50</sub> 値を算出することができた。さらに、その IC<sub>50</sub> 値は、以前の報告値とほぼ一致したことから、D-luc-eLuc 反応に基づく発光強度の評価は、OAT1 を介した薬物間相互作用を評価するための高感度かつ迅速な非侵襲性のシステムの構築に応用できる可能性が示唆された。

## 総括

本研究では、D-luc の物理化学的性質に着目し、D-luc の細胞膜透過過程におけるトランスポーターの関与を仮定し、細胞や組織における D-luc の細胞内以降に関わるトランスポーターの同定、および D-luc を細胞内に積極的に取り込み D-luc-ルシフェラーゼ反応を増強するトランスポーターの探索を行った。さらに、D-luc を輸送するトランスポーターを活用した *in vivo* 生物発光イメージングについて検討した。

第 1 章では、HEK/D-luc 細胞における D-luc-eLuc 反応への阻害剤および遺伝子導入の影響を検討し、モノカルボン酸トランスポーターである MCT1 が内因性の主要な D-luc トランスポーターであることを見出した。このことは、D-luc の細胞内への移行過程においてトランスポーターの重要性を示すとともに、生体内での D-luc の分布に MCT1 が関与する可能性を示唆するものである。

第 2 章では、第 1 章で得られた D-luc の細胞膜透過過程にトランスポーターが関与するという知見に基づき、細胞内への D-luc の積極的な取り込みを媒介し、D-luc-eLuc 反応を増強するトランスポーターの探索とその生物発光イメージングへの応用について検討した。各種ヒト有機アニオン性トランスポーターを HEK/eLuc 細胞に一過性発現させ、D-luc 添加時における生物発光を測定した結果、OAT1 および OAT3 の発現により、発光強度が顕著に増大することが示された。OAT1 を一過性発現させた HEK 細胞において、著しい D-luc の細胞内蓄積が認められ、その取り込みの速度論的解析より、D-luc は OAT1 に対する良好な基質 ( $K_m = 0.23 \mu\text{M}$ ) であることが明らかとなった。本知見は、OAT1 の安定発現株である HEK/eLuc/OAT1 細胞における 6-CF 取り込みに対する D-luc の強力な阻害効果 ( $K_i = 0.50 \mu\text{M}$ ) からも確認された。以上より、D-luc は OAT1 に対する高親和性の基質であることが明らかとなり、OAT1 は D-luc を細胞内へ濃縮的に輸送することで、D-luc-eLuc 反応を増強することが示唆された。また、HEK/eLuc/OAT1 細胞における発光強度の解析より、D-luc を添加した際の生物発光強度を規定する律速段階は、eLuc による D-luc の酸化反応ではなく、OAT1 による D-luc の取り込み過程であることが示唆された。さらに、HEK/eLuc 細胞を移植したマウスおよびラットを用いて *in vivo* 生物発光イメージングを行った結果、OAT1 を利用することにより、*in vivo* 生物発光イメージングを非常に感度良く行うことに成功した。

第 3 章では、*in vitro* における生物発光イメージングが、OAT1 を介した新規薬物相互作用システムの構築に繋がると考え、その可能性を検討した。HEK/eLuc/OAT1 細胞において、D-luc 濃度依存的な発光強度の増大および OAT1 特異的阻害剤の効果をイメージングすることができた。その画像データを解析して得られた OAT1 特異的阻害剤の  $IC_{50}$  値は、以前の報告値とほぼ一致したことから、D-luc-eLuc 反応に基づく生物発光イメージングは、OAT1 を介した薬物間相互作用を評価するための高感度かつ迅速な非侵襲性のシステムの構築に応用できる可能性が示唆された。

本研究では、トランスポーターを利用することにより、**D-luc-eLuc** 反応をより効率的にし、生物発光イメージングの感度および精度を亢進させることに成功した。これにより、従来では困難であった生体深部や体積が大きな動物個体でイメージングを行える可能性が示唆された。さらには、この技術により、近未来に登場するであろう **iPS** 細胞医薬品等の細胞医薬品の体内動態追跡を可能になることを期待する。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導、御助言を賜り、研究のみならず、将来に関する数多くの相談に対しても親身に応えてくださり、温かな言葉をかけてくださいました恩師、東京薬科大学 薬学部 井上 勝央教授に深なる敬意を表します。

本研究を遂行するにあたり、広い視野から鋭く的確な御指導、御助言を賜りました東京薬科大学 薬学部 白坂 善之准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究室に配属するきっかけを与えてくださり、研究の楽しさを御教授くださいました日本薬科大学 薬学部 瀧沢 裕助教に厚くお礼申し上げます。

本研究以外にも研究を行うにあたり、様々な角度からの御指導を頂きました東京薬科大学 薬学部 岸本 久直助教に心より御礼申し上げます。

最後に、私事ではありますが、常に私を信じ、寄り添い、有意義で充実した学生生活を送るために心砕き、支えてくださった家族、両親に心から感謝いたします。

そして末筆ではございますが、東京薬科大学 薬物動態制御学教室の皆様への感謝と共に、皆様のこれからの御多幸と御健勝をお祈り申し上げます。

平成 30 年 1 月

## 参考文献

- [1] M. Suzuki, H. Doi, T. Hosoya, Y. Watanabe, In vivo molecular imaging by positron emission tomography (PET) and its application to drug design and diagnosis, *Seibutsu Butsuri*. 44 (2004) 265–270.
- [2] R. Weissleder, U. Mahmood, Molecular imaging, *Radiology*. 219 (2001) 316–333.
- [3] S.S. Gambhir, Molecular imaging of cancer with positron emission tomography, *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 683–693.
- [4] J. Culver, W. Akers, S. Achilefu, Multimodality molecular imaging with combined optical and spect/pet modalities., *J. Nucl. Med.* 49 (2008) 169–172.
- [5] A.F. Chatziioannou, Molecular imaging of small animals with dedicated pet tomographs, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 29 (2002) 98–114.
- [6] M. Ono, Molecular imaging by pet/spect, *Yakugaku Zasshi*. 129 (2009) 279–287.
- [7] M. L. James, S.S. Gambhir, A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications, *Physiol. Rev.* 92 (2012) 897–965.
- [8] I. Aoki, R. Bakalova, Molecular imaging using drug delivery system, *Drug Deliv. Syst.* 23 (2008) 61–68.
- [9] J. W. M. Bulte, In vivo mri cell tracking: clinical studies, *Am. J. Roentgenol.* 193 (2009) 314–325.
- [10] D. M. Chudakov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 605–613.
- [11] C.H. Contag, M.H. Bachmann, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 (2002) 235–260.
- [12] 山岡哲二, 橘洋一, 細胞移植と分子イメージング, *人工臓器*. 37 (2008) 179–181.
- [13] S. B. Kim, Y. Umezawa, H. Tao, Molecular imaging probes based on bioluminescence and fluorescence, *Bunseki Kagaku*. 58 (2009) 435–446.
- [14] E. S. Nakasone, H. A. Askautrud, T. Kees, J.-H. Park, V. Plaks, A. J. Ewald, M. Fein, M. G. Rasch, Y.-X. Tan, J. Qiu, J. Park, P. Sinha, M. J. Bissell, E. Frengen, Z. Werb, M. Egeblad, Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance, *Cancer Cell*. 21 (2012) 488–503.
- [15] D. A. Sipkins, D. A. Cheresch, M. R. Kazemi, L. M. Nevin, M. D. Bednarski, K. C. P. Li, Detection of tumor angiogenesis in vivo by  $\alpha\beta 3$ -targeted magnetic resonance imaging, *Nat. Med.* 4 (1998) 623–626.
- [16] P. D. Shreve, Y. Anzai, R. L. Wahl, Pitfalls In oncologic diagnosis with fdg pet imaging: physiologic and benign variants, *Radiographics*. 19 (1999) 61–77.
- [17] M. Bergstr, M, A. Grahn, N, B. L. Ngstr, Positron emission tomography microdosing: a new

- concept with application in tracer and early clinical drug development, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59 (2003) 357–366.
- [18] S. Nishimura, Positron emission tomography as a research tool for translational science, *Folia Pharmacol. Jpn.* 141 (2013) 136–140.
- [19] Y. Fujita, Y. Hanada, H. Sayama, M. Inami, T. Fujimura, K. Sudoh, Translational research in drug discovery — current issues and perspectives, *Folia Pharmacol. Jpn.* 148 (2016) 296–301.
- [20] R. A. Trivedi, C. Mallawarachi, J.-M. U-King-Im, M. J. Graves, J. Horsley, M. J. Goddard, A. Brown, L. Wang, P. J. Kirkpatrick, J. Brown, J. H. Gillard, Identifying inflamed carotid plaques using in vivo uspio-enhanced mr imaging to label plaque macrophages., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1601–1606.
- [21] M. Hoehn, D. Wiedermann, C. Justicia, P. Ramos-Cabrer, K. Kruttwig, T. Farr, U. Himmelreich, Cell tracking using magnetic resonance imaging, *J. Physiol.* 584 (2007) 25–30.
- [22] R. Y. Tsien, B. J. Bacskaï, S. R. Adams, Fret for studying intracellular signalling, *Trends Cell Biol.* 3 (1993) 242–245.
- [23] R. M. Clegg, Fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995) 103–110.
- [24] 秋元秀俊, 安東頼子, 近江谷克裕, 発光タンパク質による光イメージング,  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/49/2/49\\_2\\_070/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/49/2/49_2_070/_pdf)
- [25] Y. Magata, Small animal imaging studies and their prospects, *Folia Pharmacol. Jpn.* 147 (2016) 161–167.
- [26] A. Sato, B. Klaunberg, R. Tolwani, In vivo bioluminescence imaging,  
<http://www.ingentaconnect.com/content/aalas/cm/2004/00000054/00000006/art00005>
- [27] Y. Higuchi, Development of optical imaging to visualize dynamics of cells in vivo, *Drug Deliv. Syst.* 28 (2013) 17–23.
- [28] S. B. Kim, R. Fuji, Recent advances in molecular imaging technologies with luciferases, *J. Japan Soc. Colour Mater.* 88 (2015) 407–411.
- [29] Y. T. Lim, S. Kim, A. Nakayama, N. E. Stott, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging,  
<http://dx.doi.org/10.1162/15353500200302163>. (2003).
- [30] V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. V Wang, R. Weissleder, Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 313–320.
- [31] T. Kuchimaru, S. Iwano, M. Kiyama, S. Mitsumata, T. Kadonosono, H. Niwa, S. Maki, S. Kizaka-kondoh, A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging, *Nat. Commun.* 7 (2016) 11856.
- [32] R. Shinde, I and Julie perkins, H. Contag, Luciferin derivatives for enhanced in vitro and in vivo bioluminescence assays, *Biochemistry*, 2006, 45 (37), pp 11103–11112.



- [33] K. R. Harwood, D. M. Mofford, G. R. Reddy, S. C. Miller, Identification of mutant firefly luciferases that efficiently utilize aminoluciferins, *Chem. Biol.* 18 (2011) 1649–1657.
- [34] W. Wu, J. Su, C. Tang, H. Bai, Z. Ma, T. Zhang, Z. Yuan, Z. Li, W. Zhou, H. Zhang, Z. Liu, Y. Wang, Y. Zhou, L. Du, L. Gu, M. Li, Cybluc: an effective aminoluciferin derivative for deep bioluminescence imaging, *Anal. Chem.* 89 (2017) 4808–4816.
- [35] G. Choy, P. Choyke, S. K. Libutti, Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research, <http://dx.doi.org/10.1162/15353500200303142>. (2003).
- [36] B. W. Rice, M. D. Cable, M. B. Nelson, In vivo imaging of light-emitting probes, *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 432.
- [37] T. Furukawa, Z.-H. Jin, IX. Advantages of ri and fluorescence in imaging, *Radioisotopes.* 58 (2009) 487–497.
- [38] T. C. Doyle, S. M. Burns, C. H. Contag, In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection, *Cell. Microbiol.* 6 (2004) 303–317.
- [39] V. R. Viviani, A. C. R. Silva, G. L. O. Perez, R. V. Santelli, E. J. H. Bechara, F. C. Reinach, Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 254–260.
- [40] K. Niwa, Y. Ichino, S. Kumata, Y. Nakajima, Y. Hiraishi, D. Kato, V. R. Viviani, Y. Ohmiya, Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases, *Photochem. Photobiol.* 86 (2010) 1046–1049.
- [41] A. J. Silva Neto, V. Scorsato, F. G. C. Arnoldi, V. R. Viviani, *Pyrearinus termitilluminans* larval click beetle luciferase: active site properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 1748.
- [42] Y. Nakajima, T. Yamazaki, S. Nishii, T. Noguchi, H. Hoshino, K. Niwa, V. R. Viviani, Y. Ohmiya, Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging, *Plos One.* 5 (2010) e10011.
- [43] D. M. Karl, O. Holm-Hansen, Effects of luciferin concentration of the quantitative assay of ATP using crude luciferase preparations, *Anal. Biochem.* 75 (1976) 100–112.
- [44] H. Pham-The, T. Garrigues, M. Bermejo, I. González-Álvarez, M. C. Monteagudo, M. Á. Cabrera-Pérez, Provisional classification and *in silico* study of biopharmaceutical system based on Caco-2 cell permeability and dose number, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 2445–2461.
- [45] M. Fujikawa, R. Ano, K. Nakao, R. Shimizu, M. Akamatsu, Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 4721–4732.
- [46] G. Corti, F. Maestrelli, M. Cirri, N. Zerrouk, P. Mura, Development and evaluation of an in

- vitro method for prediction of human drug absorption: ii. demonstration of the method suitability, *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 354–362.
- [47] A. Ishida, T. Yoshikawa, T. Nakazawa, T. Kamidate, Enhanced firefly bioluminescence assay of atp in the presence of atp extractants by using diethylaminoethyl-dextran, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 236–241.
- [48] C. E. Badr, B. A. Tannous, Bioluminescence imaging: progress and applications, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 624–633.
- [49] G. D. Luker, J. P. Bardill, J. L. Prior, C. M. Pica, D. Piwnica-Worms, D. A. Leib, Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice., *J. Virol.* 76 (2002) 12149–12161.
- [50] X. Wang, M. Rosol, S. Ge, D. Peterson, G. Mcnamara, H. Pollack, D. B. Kohn, M. D. Nelson, G. M. Crooks, Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging., *Blood.* 102 (2003) 3478–3482.
- [51] A. Rehemtulla, L. D. Stegman, S. J. Cardozo, S. Gupta, D. E. Hall, C. H. Contag, B. D. Ross, Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging, *Neoplasia.* 2 (2000) 491–495.
- [52] F. Berger, R. Paulmurugan, S. Bhaumik, S. S. Gambhir, Uptake kinetics and biodistribution of <sup>14</sup>c-d-luciferin—a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35 (2008) 2275–2285.
- [53] J.-Q. Wang, K. E. Pollok, S. Cai, K. M. Stantz, G. D. Hutchins, Q.-H. Zheng, PET imaging and optical imaging with d-luciferin [<sup>11</sup>c]methyl ester and d-luciferin [<sup>11</sup>c]methyl ether of luciferase gene expression in tumor xenografts of living mice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 331–337.
- [54] B. Sarkadi, C. Özvegy-Laczka, K. Németh, A. Váradi, Abcg2 - a transporter for all seasons, *Febs Lett.* 567 (2004) 116–120.
- [55] Y. Zhang, J. P. Bressler, J. Neal, B. Lal, H.-E. C. Bhang, J. Lathera, M.G. Pomper, Abcg2/bcrp expression modulates d-luciferin based bioluminescence imaging, *Cancer Res.* 67 (2007) 9389–9397.
- [56] J. S. Kumar, B.-R. Wei, J. P. Madigan, R. M. Simpson, M. D. Hall, M. M. Gottesman, Bioluminescent imaging of ABCG2 efflux activity at the blood-placenta barrier, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20418.
- [57] J. Bakhsheshian, B. R. Wei, K. E. Chang, S. Shukla, S. V. Ambudkar, R. M. Simpson, M. M. Gottesman, M. D. Hall, Bioluminescent imaging of drug efflux at the blood-brain barrier mediated by the transporter abcg2, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 20801–20806.
- [58] L. Cheung, D. M. T. Yu, Z. Neiron, T. W. Failes, G. M. Arndt, J. I. Fletcher, Identification of

- new mrp4 inhibitors from a library of fda approved drugs using a high-throughput bioluminescence screen, *Biochem. Pharmacol.* 93 (2015) 380–388.
- [59] F. G. M. Russel, J. B. Koenderink, R. Masereeuw, Multidrug resistance protein 4 (mrp4/abcc4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 200–207.
- [60] M. Hiyama, H. Akiyama, K. Yamada, N. Koga, Theoretical study of firefly luciferin  $pK_a$  values-relative absorption intensity in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.* 89 (2013) 571–578.
- [61] H. N. Po, N. M. Senozan, The henderson-hasselbalch equation: its history and limitations, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1499.
- [62] V. R. Viviani, A. Uchida, W. Viviani, Y. Ohmiya, The influence of ala243 (gly247), arg215 and thr226 (asn230) on the bioluminescence spectra and ph-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases, *Photochem. Photobiol.* 76 (2002) 538.
- [63] A. P. Halestrap, N. T. Price, The proton-linked monocarboxylate transporter (mct) family: structure, function and regulation., *Biochem. J.* 343 2 (1999) 281–299.
- [64] A. P. Halestrap, M. C. Wilson, The monocarboxylate transporter family-role and regulation, *Iubmb Life.* 64 (2012) 109–119.
- [65] J. Pérez-Escuredo, V. F. Van hée, M. Sboarina, J. Falces, V. L. Payen, L. Pellerin, Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 2481–2497.
- [66] A. P. Halestrap, The monocarboxylate transporter family-structure and functional characterization, *Iubmb Life.* 64 (2012) 1–9.
- [67] M. A. Castro, C. Angulo, S. Brauchi, F. Nualart, I. I. Concha, Ascorbic acid participates in a general mechanism for concerted glucose transport inhibition and lactate transport stimulation, *Pflügers arch. - Eur. J. Physiol.* 457 (2008) 519–528.
- [68] M. Gerlinger, C. R. Santos, B. Spencer-Dene, P. Martinez, D. Endesfelder, R. A. Burrell, M. Vetter, M. Jiang, R. E. Saunders, G. Kelly, K. Dykema, N. Rioux-Leclercq, G. Stamp, J. J. Patard, J. Larkin, M. Howell, C. Swanton, Genome-wide rna interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies mct4 as a warburg effect metabolic target, *J. Pathol.* 227 (2012) 146–156.
- [69] M. J. Ovens, A. J. Davies, M. C. Wilson, C. M. Murray, A. P. Halestrap, AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters mct1 and mct2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7–10, *Biochem. J.* 425 (2010) 523–530.
- [70] B. Nancolas, R. B. Sessions, A. P. Halestrap, Identification of key binding site residues of mct1 for ar-c155858 reveals the molecular basis of its isoform selectivity., *Biochem. j.* 466 (2015) 177–188.

- [71] Y. Zhang, M. Pullambhatla, J. Laterra, M. G. Pomper, Influence of bioluminescence imaging dynamics by d-luciferin uptake and efflux mechanisms, <http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00005>. (2012).
- [72] D. Gartzke, G. Fricker, Establishment of optimized mdck cell lines for reliable efflux transport studies, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 1298–1304.
- [73] I. Tamai, H. Takanaga, T. Ogihara, H. Higashida, H. Maeda, Y. Sai, A. Tsuji, Participation of a proton-cotransporter, mct1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1995) 482–489.
- [74] S. Bröer, B. Rahman, G. Pellegri, L. Pellerin, J. L. Martin, S. Verleysdonk, B. Hamprecht, P.J. Magistretti, Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (mct 1) expressing xenopus laevis oocytes. expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30096–102.
- [75] B.-T. Lee, K-H; Byun, S S; Paik, J-Y; Lee, S Y; Song, S H; Choe, Y S; Kim, Cell uptake and tissue distribution of radioiodine labelled D-luciferin: implications for luciferase based gene expression, *Nuclear Medicine Communications*, [http://journals.lww.com/nuclearmedicinecomm/abstract/2003/09000/cell\\_uptake\\_and\\_tissue\\_distribution\\_of\\_radioiodine.9.aspx](http://journals.lww.com/nuclearmedicinecomm/abstract/2003/09000/cell_uptake_and_tissue_distribution_of_radioiodine.9.aspx)
- [76] A. Sewing, B. Wiseman, A.C. Lloyd, H. Land, High-intensity raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21cip1, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 5588–5597.
- [77] T. Sekine, Molecular identification of the multispecific organic anion transporter family(the oat family): the role in the pharmacokinetics and toxicokinetics, *Folia Pharmacol. Jpn.* 117 (2001) 177–186.
- [78] H. Koepsell, H. Endou, The slc22 drug transporter family, *Eur. J. Physiol.* 447 (2004) 666–676.
- [79] M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch, Oatps, oats and octs: the organic anion and cation transporters of the slco and slc22a gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1260–1287.
- [80] G. Burckhardt, Drug transport by organic anion transporters (oats), *Pharmacol. Ther.* 136 (2012) 106–130.
- [81] T. Sekine, S. H. Cha, H. Endou, The multispecific organic anion transporter (oat) family, *Eur. J. Physiol.* 440 (2000) 337–350.
- [82] P. S. Patrick, S. K. Lyons, T. B. Rodrigues, K. M. Brindle, Oatp1 enhances bioluminescence by acting as a plasma membrane transporter for d-luciferin, *Mol. Imaging Biol.* 16 (2014) 626–634.
- [83] G. A. Kullak-Ublick, M. G. Ismail, B. Stieger, L. Landmann, R. Huber, F. Pizzagalli, K. Fattinger, P. J. Meier, B. Hagenbuch, Organic anion-transporting polypeptide b (oatp-b) and its functional comparison with three other oatps of human liver, *Gastroenterology.* 120 (2001)

525–533.

- [84] T. Cihlar, E. S. Ho, Fluorescence-based assay for the interaction of small molecules with the human renal organic anion transporter 1, *Anal. Biochem.* 283 (2000) 49–55.
- [85] T. Kawasaki, Y. Takeichi, M. Tomita, Y. Uwai, F. Epifano, S. Fiorito, V. A. Taddeo, S. Genovese, T. Nabekura, Effects of phenylpropanoids on human organic anion transporters hoat1 and hoat3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489 (2017) 375–380.
- [86] S. T. Adams, S. C. Miller, Beyond d-luciferin: expanding the scope of bioluminescence imaging in vivo, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 21 (2014) 112–120.
- [87] 住商ファーマインターナショナル株式会社, よくあるご質問 (FAQ) | IVIS Imaging System | 製品情報 | 創薬研究機器・装置 | 住商ファーマインターナショナル株式会社, (n.d.). <http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/products/xenogen/faq.html>
- [88] Y. Wang, R. Hu, W. Xi, F. Cai, S. Wang, Z. Zhu, R. Bai, J. Qian, Red emissive aie nanodots with high two-photon absorption efficiency at 1040 nm for deep-tissue in vivo imaging, *Biomed. Opt. Express.* 6 (2015) 3783.
- [89] 前田和哉, 樋坂章博, 斎藤嘉朗, 永井尚美, 久米俊行, 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案) について, *薬剤学.* 74 (2014) 406–413.
- [90] K. Yoshida, P. Zhao, L. Zhang, D. R. Abernethy, D. Rekić, K. S. Reynolds, A. Galetin, S.-M. Huang, In vitro-in vivo extrapolation of metabolism- and transporter-mediated drug-drug interactions-overview of basic prediction methods., *J. Pharm. Sci.* 106 (2017) 2209–2213.
- [91] M. Nakajima, From the viewpoint of drug metabolism research, *Yakugaku Zasshi.* 137 (2017) 697–705.
- [92] K. M. Giacomini, S.-M. huang, D. J. Tweedie, L. Z. Benet, K. L. R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K. M. Hillgren, K. A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R. B. Kim, C. A. Lee, M. Niemi, J. W. Polli, Y. Sugiyama, P. W. Swaan, J. A. Ware, S. H. Wright, S. Wah Yee, M. J. Zamek-Gliszczynski, L. Zhang, L. Zhang, Membrane transporters in drug development, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 215–236.
- [93] T. Lynch, A. Price, The effect of cytochrome p450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects, [https://faculty.sharepoint.illinoisstate.edu/jfrieese/che-344/siteassets/pages/default/cytochrom p450 metabolism article.pdf](https://faculty.sharepoint.illinoisstate.edu/jfrieese/che-344/siteassets/pages/default/cytochrom%20p450%20metabolism%20article.pdf)
- [94] S. F. Manzi, M. Shannon, Drug interactions—a review, *Clin. Pediatr. Emerg. Med.* 6 (2005) 93–102.
- [95] R. Yuan, S. Madani, X.-X. Wei, K. Reynolds, S.-M. Huang, Evaluation of cytochrome p450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions., *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 1311–9.
- [96] A. P. Li, P. Maurel, M. J. Gomez-Lechon, L. C. Cheng, M. Jurima-Romet, Preclinical evaluation of drug—drug interaction potential: present status of the application of primary

- human hepatocytes in the evaluation of cytochrome p450 induction, *Chem. Biol. Interact.* 107 (1997) 5–16.
- [97] P. R. Reid, A. G. Meek, Digoxin -- quinidine interaction., *Johns Hopkins Med. J.* 145 (1979) 227–229.
- [98] M. Hirano, K. Maeda, Y. Shitara, Y. Sugiyama, Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via oatp1b1., *Drug Metab. Dispos.* 34 (2006) 1229–1236.
- [99] S.-M. Huang, In vitro metabolism- and transporter- mediated drug-drug interaction studies guidance for industry, (2009).  
<http://www.fda.gov/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/default.htm>
- [100] E. medicines agency, guideline on the investigation of drug interactions, (2012).  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_gb/document\\_library/scientific\\_guideline/2012/07/wc500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/scientific_guideline/2012/07/wc500129606.pdf)
- [101] D. Tweedie, J. W. Polli, E. G. Berglund, S. M. Huang, L. Zhang, A. Poirier, X. Chu, B. Feng, Transporter studies in drug development: experience to date and follow-up on decision trees from the international transporter consortium, *Clin. Pharmacol. Ther.* 94 (2013) 113–125.
- [102] P. Duan, S. Li, N. Ai, L. Hu, W. J. Welsh, G. You, Potent inhibitors of human organic anion transporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 3340–3346.
- [103] A. G. Hotchkiss, t. Gao, U. Khan, L. Berrigan, M. Li, L. Ingraham, R. M. Pelis, Organic anion transporter 1 is inhibited by multiple mechanisms and shows a transport mode independent of exchange., *Drug Metab. Dispos.* 43 (2015) 1847–54.