

氏名（本籍）	<small>ふるや たかひと</small> 古屋 貴人（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 286 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 教授 井上 勝央 教授 市田 公美 教授 瀬田 康生

論文内容の要旨

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・画像化する技術として分子イメージングに注目が集まっている。この技術には、放射性標識体を用いた **SPECT** および **PET**、核磁気共鳴を用いた **MRI**、**GFP** やルシフェラーゼ遺伝子を用いた光イメージングなどがあり、これらは、がんの浸潤や血管新生、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、さらには創薬における薬物動態の評価などに応用されている。その中でも、特に高い関心を集めているのは、ホタルやウミシイタケ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光イメージングである。この発光イメージングは、簡便性かつ低コストであり、蛍光イメージングで必須となる励起光の照射が不要であるため、励起光による組織傷害やバックグラウンド干渉を回避できる。

発光イメージングの光源として、**D-luciferin (D-luc)** と昆虫由来のルシフェラーゼの組み合わせが最も頻用されている。例えば、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、あるいはそれ自体を発現する遺伝子改変マウスを用いて、高用量の **D-luc** 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。現在、この技術に基づいて、がん、感染症、**DDS** および再生医療等に関する研究など、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。

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。多くの場合、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。しかし、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り、生理的条件下 (pH 7.4) においては、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。

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、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。

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

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、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、臓器間で差があることが指摘されている。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す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が、その分子実態は明らかでない。

そこで本章では、D-luc が生理的 pH において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として存在することに着目し、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、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。なお、ルシフェラーゼとして高い pH 安定性と発光強度を有するヒカリコメツキムシルシフェラーゼ (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) を検討に用いた。

HEK/eLuc 細胞における生物発光強度は、細胞外に D-luc を添加することにより増加し、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機能的解析

第 1 章において、ルシフェラーゼ発現細胞内への 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が示唆された。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。

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、SLC22A family と SLCO family が知られている。これら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。そこで本章では、これら有機アニオントランスポーターが濃縮的な D-luc の細胞内に取り込みを促進することにより、D-luc-eLuc 反応が促進されると仮定し、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。

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たところ、OAT1 および OAT3 で有意な発光強度の増大が確認された。最も活性の高かった OAT1 を HEK293 細胞に一過性発現させ、D-luc の細胞内取り込みを直接評価したところ、OAT1 を介した D-luc の顕著な細胞内集積が認められた。速度論的解析より、OAT1 による D-luc 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-carboxyfluorescein 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。さらに、OAT1 が安定発現する 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。また、OAT1 安定発現株である HEK/eLuc/OAT1 細胞を用いて、マウスおよびラットにおける生物発光イメージングを行った結果、いずれの動物種においても、OAT1 を利用することにより、従来の方法に比較し、高感度にイメージングできることに成功した。

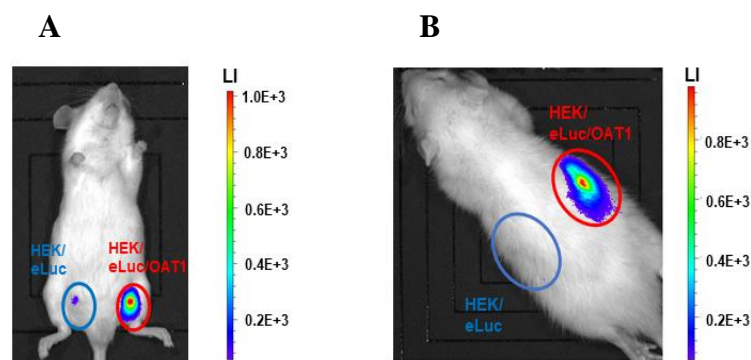


Fig. 1 (A) A representative image of *in vivo* bioluminescence in a living mouse 30 min after administration of D-luc (20 mg/kg, i.p.). (B) A representative image of *in vivo* bioluminescence in a living rat 30 min after administration of D-luc (20 mg/kg, i.p., n = 3). HEK293/eLuc/OAT1 cells (red) and HEK293/eLuc cells (blue) were subcutaneously implanted.

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

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、発光強度が顕著に増大することを明らかにした。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。

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 IC₅₀ 値を算出することができた。さらに、その IC₅₀ 値は報告値とほぼ一致したことから、この生物発光による評価系を用いれば、簡便に OAT1 を介した薬物間相互作用を評価できると考えられる。すなわち、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 (あるいは同様に D-luc 輸送活性を有する OAT3) 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。

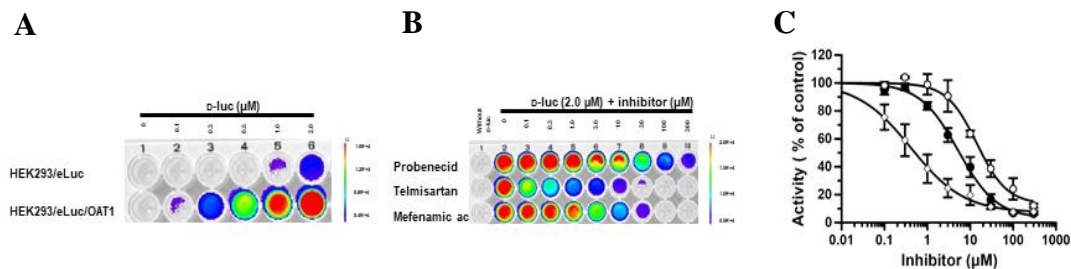


Fig. 2 Inhibitory effect of specific OAT1 inhibitors on the BL. (A) A representative image of BL in the presence of varied D-luc concentrations (0.1–2 μM) (B) A representative image of BL in the presence of varied concentrations of inhibitors. (C) The IC₅₀ values for probenecid, mefenamic acid, and telmisartan were 13.9 ± 2.8 , 5.43 ± 0.82 , and 0.89 ± 0.16 μM, respectively. Data are presented as the mean \pm S.E. (n = 3). BL intensities in (C)–(E) were measured by using IVIS system.

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 の細胞内移行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。

その結果、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行うことができ、生物発光イメージングの感度および精度を格段に向上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。今後、本手法を応用することで、トランスポーターを介した医薬品相互作用の高感度かつ迅速な評価が可能となり、医薬品開発の初期段階において薬物間相互作用の回避が可能となることが期待されるとともに、近未来に登場するであろう iPS 細胞などの細胞医薬品等の追跡や体内動態のリアルタイム解析が可能になることが期待される。

【研究結果の掲載誌】

1. Biochemical and Biophysical Research Communications 495 (2018) 2152-2157.

論文審査の結果の要旨

本申請論文は、D-luciferin (D-luc) と昆虫由来ルシフェラーゼとの反応を利用した生物発光イメージングの感度の向上を目的として、D-lucの細胞膜透過機構、およびD-lucを高効率に輸送するトランスポーターの探索とその応用について検討し、その研究成果をまとめたものである。

現在、マウスなどの小動物個体における特定遺伝子の発現様式や細胞挙動をリアルタイムかつ非侵襲的に可視化・画像化する手法として、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用した光イメージングが利用されており、特に、D-lucはその主要なルシフェリン基質として繁用されている。実際のイメージングでは、ルシフェラーゼを発現する細胞を移植した動物やルシフェラーゼを特定組織で発現する遺伝子改変マウス等を用い、それら実験動物へD-lucを投与した際に生じる生物発光を高感度CCDカメラにて検出し、そのシグナル強度の解析により遺伝子発現あるいは細胞数等に関する評価を行うのが一般的である。最近では、その検出感度を増強するために、発光酵素や基質の改変等が試みられているが、現在までのところ、D-lucの体内動態特性を把握し、その分子機構に基づき感度を向上させる試みはほとんどなされていない。そのような背景のもと、申請者は、細胞内及び組織中へのD-lucの移行に関わる細胞膜透過過程について検討し、以下のようなD-lucを用いた生物発光イメージングに関する新たな知見を3章に亘ってまとめている。

第1章では、D-lucの細胞内移行に関わるトランスポーターとしてMCT1（モノカルボン酸トランスポーター1）を同定し、D-lucを用いた生物発光イメージングにおけるD-lucの細胞膜透過過程の重要性を述べている。申請者は、生理的条件下においてD-lucがモノカルボン酸イオンとして存在することに着目し、現在までモノカルボン酸トランスポーターとして機能が同定されているトランスポーターを対象に、ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ（eLuc）を安定発現したHEK293細胞（eLuc細胞）における、それらトランスポーターmRNAの発現やD-luc添加時の生物発光に対する特異的阻害剤の影響を検討した。その結果、HEK293細胞に発現する既知のモノカルボン酸トランスポーターはMCT1のみであり、細胞外D-lucの細胞内移行に伴う化学発光は、MCT1の特異的阻害剤により減弱し、MCT1の一過性発現により増大することを見出した。MCT1は、ヒトやげっ歯類において、筋肉を含む様々な臓器に高発現するトランスポーターであることから、*in vivo*におけるD-lucの体内分布において重要であると考察している。

第2章では、D-lucに対して高い輸送能を有するトランスポーターとしてOAT1を同定するとともに、OAT1を導入したeLuc発現がD-luc存在下において著しい生物発光を示すことを見出し、生物発光イメージングにおけるOAT1の利用の有用性を述べている。OAT1はD-lucを細胞内に濃縮的に集積し、その輸送親和性は極めて高いことが示された。また、OAT1を発現したeLuc細胞における生物発光の速度論的解析により、eLuc-D-luc反応の律速過程は細胞膜透過過程であることが示されたことから、OAT1の発現量の増大が生物発光強度の増強に有効であると述べている。さらに、ルシフェラーゼを発現する細胞にOAT1を導入することで、実験動物を用いた*in vivo*における細胞追跡が可能になると考察している。

第3章では、第2章でのD-lucの膜透過過程が反応系の律速であるとの知見をもとに、各種薬物のOAT1発現eLuc細胞における生物発光に対する阻害効果が、OAT1を介したD-luc輸送に対する阻害効果として評価できることを実証している。日米欧3極における医薬品開発においては、医薬品候補化合物に関する薬物間相互作用試験を、CYPsなどの代謝酵素だけでなく、主要な薬物トラ

ンスポーターに対しても実施することが求められてきており、OAT1はその評価対象に指定されている。したがって、本生物発光イメージング手法は、医薬品候補化合物とOAT1との相互作用を評価するためのスクリーニング系として利用可能であると述べている。

以上の研究成果は、D-lucを用いた生物発光イメージングの分子基盤および高感度化や技術応用に向けた新しい知見を提供するものであり、特に今後、薬剤学領域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予測、体内動態の把握に基づく細胞医薬品の開発に繋がるものと期待される。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。