



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1648号
学位記番号	第331号
氏名	三村 佳久
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	小腸における atenolol 輸送に関わるトランスポーターの探索とフラボノイド類の阻害効果の解析
論文審査担当者	主査： 牧野 利明 副査： 湯浅 博昭, 松永 民秀, 山村 壽男

氏名	みむら よしひさ 三村 佳久
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 331 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 26 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	小腸における atenolol 輸送に関わるトランスポーターの探索とフラボノイド類の阻害効果の解析
論文審査委員	(主査) 教授 牧野 利明 (副査) 教授 湯浅 博昭・教授 松永 民秀・准教授 山村 壽男

論文内容の要旨

【序論】

水溶性 β 遮断薬に分類される atenolol は、分子内に極性基のアミド基等の高極性構造を持つため、水溶性が高く、油水分配係数は 0.015 と低い。また、 pK_a が 9.6 である 2 級アミン構造を有することから、消化管内及び体液中の pH ではプロトンが付加され、カチオンとして存在する。このような特性から、脂質二重膜で構成される細胞膜への分配性は低く、単純拡散による透過性は低いとみられている (Fig. 1)。

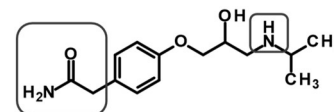


Fig. 1. Structure of Atenolol

atenolol は、脂溶性 β 遮断薬と比べて中枢神経系への移行性が極めて低く、中枢組織への移行による副作用が軽減されているという特徴を有するが、その低膜透過性を反映したものと考えられている。一方で、経口剤として用いられているが、吸収性は高くない (バイオアベイラビリティが 50%程度)。この特徴も、低膜透過性を反映したものとみられ、その吸収は主に paracellular 経路によると考えられている。

一方、近年、atenolol をオレンジジュース (OJ) やアップルジュース (AJ) といったフルーツジュース (FJ) で服用することで、 C_{max} 及び AUC が大幅に低下する相互作用が報告されている。特に、AJ で服用した時の相互作用が強く、水で服用した時と比較して、AUC が 75%低下することが報告されている。このとき、消失半減期は変化しないことから、消失過程において生じている相互作用ではないとみられ、atenolol は非代謝性であるということも踏まえて、腸管での吸収過程の阻害によるものである可能性が指摘されている。

医薬品と FJ の相互作用に関しては、カルシウム拮抗薬 (felodipine 等) のバイオアベイラビリティへのグレープフルーツジュース (GFJ) の影響がよく知られている。この相互作用は、小腸上皮細胞において、GFJ 中に含まれるフラノクマリン類によって、カルシウム拮抗薬の代謝に働くシトクロム P450 (CYP) 3A4 が阻害されることで、バイオアベイラビリティが上昇し、血中濃度の上昇を招くというものである。

その後、小腸上皮細胞刷子縁膜 (管腔側膜) で種々の薬物の吸収 (取り込み) に働く organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2/SLCO1A2) 及び OATP2B1/SLCO2B1 が FJ 中のフラボノイド類によって阻害されることにより吸収低下を招くという、トランスポーター阻害に基づく相互作用も知られるようになった。この相互作用が問題となる薬物としては、atenolol と同じ β 遮断薬である talinolol や celiprolol、ヒスタミン H1 受容体遮断薬である fexofenadine などが報告されている。

FJ による atenolol の吸収低下は、相互作用の特徴としてはトランスポーターの阻害によるものに合致している。そこで、これまで paracellular 経路によると考えられてきている atenolol の腸管吸収について、トランスポーターの関与及びそのトランスポーターを阻害する FJ 成分 (フラボノイド類) の存在を新たな仮説として考え、atenolol の腸管吸収に関わるトランスポーターを探索し、さらにフラボノイド類等による阻害の可能性を探ることに取り組むこととした。

【本論】

1. OCT1 による atenolol 輸送とフラボノイド類の阻害効果の解析

atenolol がカチオン性薬物であることに着目し、小腸での発現が報告されている主要な有機カチオントランスポーターを対象として、atenolol 輸送活性を有するトランスポーターの探索を行った。HEK293 細胞に候補トランスポーターを一過性導入し、 $[^3\text{H}]$ atenolol (100 nM) の細胞内取り込みを評価した。その結果、organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1) を導入した細胞において、mock 細胞と比較して、atenolol の取り込みの著しい増大がみられ (7 倍程度)、OCT1 の高い atenolol 輸送活性が示唆された。

引き続き、OCT1 安定発現 MDCKII 細胞を作製し、詳細な輸送解析を行った。OCT1 に対する atenolol の Michaelis 定数 (K_m) は 3.08 mM と得られ、atenolol は OCT1 の低親和性基質であることが示唆された。また、OCT1 による atenolol 輸送は従来から知られている基質の輸送と同様に、中性域よりも酸性域で低く、中性域指向の pH 依存性を示した。また、膜電位依存性 (細胞内を負の膜電位環境での輸送活性上昇) の点でも既知の OCT1 の特性と一致していた。

さらに、OCT1 による atenolol 輸送に対する各種フラボノイド類の阻害効果が見出された。特に、AJ 等の FJ に含まれるアグリコンである phloretin、quercetin、hesperetin、及びそれぞれの配糖体である phlorizin、quercetin-3 β -D-glucoside (Q-D-glc)、hesperidin は同等に強い阻害効果を示した (Fig. 2)。これらのうち、AJ 中に含まれる phloretin 及び quercetin の阻害効果の詳細な解析を行った結果、阻害様式は非競合阻害であり、 K_i はそれぞれ 38.0 μM 及び 48.0 μM と得られた (Fig. 3)。

atenolol 吸収に対する阻害作用が特に強いとみられる AJ の成分に着目すると、phloretin や quercetin は、AJ 中ではほとんどが phlorizin や Q-D-glc といった配糖体の形で存在し、それぞれの濃度は 37 μM 及び 3 μM 程度である。これらの配糖体は、小腸上皮細胞刷子縁膜表面の lactase-phlorizin hydrolase によって速やかに加水分解され、ほぼすべてが小腸管腔内でアグリコンになることが知られている。よって、小腸管腔内での phloretin 濃度は 30 μM 程度に達していると推察される。この濃度は、OCT1 に対する phloretin の IC_{50} (28.4 μM) 及び K_i (38.0 μM) とほぼ等しいことから、AJ を飲用した際に、phloretin は小腸において OCT1 阻害を引き起こし得ると考えられる。一方、Q-D-glc 由来の quercetin 濃度は低く、 IC_{50} (35.3 μM) 及び K_i (48.0 μM) を大きく下回るとみられるが、Q-D-glc 以外の配糖体 (単糖であるガラクトース、キシロース、アラビノースが 3 位に結合した配糖体) からの quercetin も含めて、付加的に OCT1 阻害に関与する可能性はあると考えられる。

OCT1 は、一般には小腸上皮細胞の側底膜に局在している可能性が高いと考えられている。その場合、atenolol の吸収過程では、上皮細胞内から血液側への排出輸送への関与が想定される。一方、OCT1 が刷子縁膜に存在する可能性を指摘する報告もある。その場合、腸管腔内から上皮細胞内への取り込み輸送への関与が想定されるが、OCT1 の atenolol 輸送活性は酸性条件で低下するため、OCT1 の機能特性としては、酸性環境が維持されている上皮細胞表面からの取り込み輸送には不向きである。したがって、atenolol 吸収における OCT1 の役割としては、刷子縁膜での取り込み輸送への関与の可能性を排除はしきれないが、側底膜での排出輸送に関与している可能性のほうが大きいと考えられる。なお、各種フラボノイド類の小腸上皮細胞内への移行性は不明であるが、アグリコンについては、糖が付加していないため、一般的に水溶性は高くなく、細胞内へ移行しやすいと推察される。そのため、小腸上皮細胞内においても、腸管腔内濃度に近い濃度で存在し、OCT1 阻害を生じる可能性はあると考えられる。

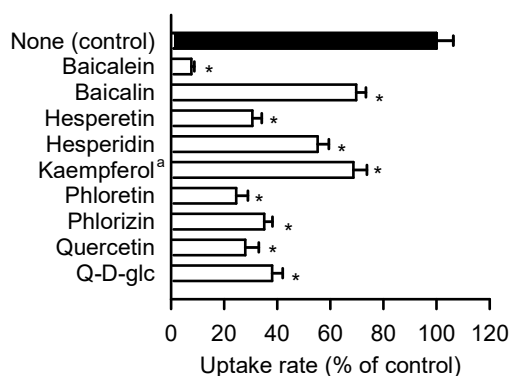


Fig. 2. Effect of Various Flavonoids on Atenolol Uptake by OCT1 Stably Expressed in MDCKII Cells

The specific uptake of $[^3\text{H}]$ atenolol (100 nM) was evaluated for 3 min at 37°C and pH 7.4 in the presence of a flavonoid (10 μM for kaempferol^a and 100 μM for the others) or in its absence. Q-D-glc, quercetin-3 β -D-glucoside. The control value of specific uptake rate was 204 fmol/min/mg protein. Data are presented as means \pm S.E. (n = 4). * p < 0.05 compared with control.

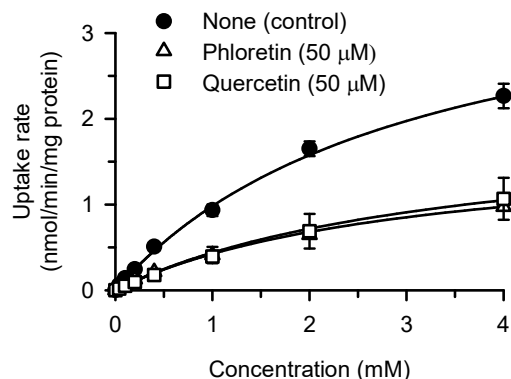


Fig. 3. Kinetic Analysis of Atenolol Transport by OCT1 Stably Expressed in MDCKII Cells

The rate of specific atenolol uptake by OCT1 was evaluated for 3 min at 37°C and pH 7.4 at varied concentration of atenolol in the absence of flavonoids or in the presence of phloretin (50 μM) or quercetin (50 μM). The data are presented as mean \pm S.E. (n = 3).

2. PMAT による atenolol 輸送とフラボノイド類の阻害効果の解析

先に atenolol 輸送活性が見出された OCT1 は、小腸上皮細胞の側底膜での輸送に関与している可能性が高いと考えられたため、引き続き、刷子縁膜で働くトランスポーターの探索を試みた。その結果、HEK293 細胞一過性発現系において、pH 6.0 の条件下で、plasma membrane monoamine transporter (PMAT/SLC29A4) を導入した細胞での³H]atenolol (100 nM) の取り込みが mock 細胞での取り込みの 24 倍程度に達することが見出され、PMAT が高い atenolol 輸送活性を有することが示唆された。

引き続き、PMAT 安定発現 MDCKII 細胞を作製し、詳細な輸送解析を行った。PMAT に対する atenolol の K_m は 0.907 mM であり、OCT1 と比較して PMAT のほうが、若干ではあるが、atenolol に対して高い親和性を示した。また、PMAT による atenolol 輸送は、従来から知られている PMAT の基質の輸送と同様に、中性域よりも酸性域で高く、酸性指向の pH 依存性を示した。また、膜電位依存性（細胞内が負の膜電位環境での輸送活性上昇）の点でも、既知の PMAT の特性と一致していた。PMAT は、小腸上皮細胞の刷子縁膜に局在することが報告されている。また、その pH 依存性及び膜電位依存性の特性は、酸性の上皮細胞表面の環境からの atenolol の効率的な細胞内取り込み輸送に適するものである。これらの点から、PMAT が小腸上皮細胞刷子縁膜での atenolol の細胞内取り込み輸送に働いている可能性が高いと考えられる。

PMAT による atenolol 輸送は、OCT1 の場合と同様に phloretin 及び quercetin によって強く阻害された。しかし、PMAT では、OCT1 とは異なり、配糖体よりもアグリコンによって強く阻害される傾向が見られた。また、AJ に含まれる各種有機酸の影響についても検討を行ったが、阻害効果はほとんど見られなかったことから、atenolol と AJ の相互作用には、主に phloretin や quercetin が関与していることが示唆された (Fig. 4)。

phloretin 及び quercetin による阻害効果について詳細に検討を行った結果、phloretin は PMAT による atenolol 輸送を競合的に阻害することが明らかとなった (Fig. 5)。一方で、quercetin の阻害効果には、アロステリックな機構の関与が示唆された。これらの特性は、OCT1 に対する phloretin 及び quercetin の阻害特性とは異なるものであった。

PMAT に対する phloretin の IC_{50} (33.0 μ M) 及び K_i (50.7 μ M) は、OCT1 の場合と同様に AJ 飲用時に想定される phloretin の小腸内濃度 (30 μ M 程度) とほぼ等しい。したがって、小腸において、phloretin による PMAT 阻害が生じ得ると考えられる。quercetin については、やはり OCT1 の場合と同様で、AJ 飲用時に想定される Q-D-glc 由来の小腸内濃度 (3 μ M) は IC_{50} (116.3 μ M) を大きく下回るが、他の quercetin 配糖体からの quercetin も含めて、付加的に PMAT 阻害に関与する可能性はあると考えられる。

3. atenolol の経細胞輸送への OCT1 及び PMAT の関与

これまでの検討により、OCT1 及び PMAT が atenolol の腸管吸収に関与し、また、phloretin 及び quercetin によるその阻害が AJ による atenolol の吸収阻害の原因となっている可能性が示唆された。しかし、刷子縁膜での小腸上皮細胞内への取り込み輸送から側底膜での血管側への排出輸送へと続く一連の吸収過程における両トランスポーターの役割は、十分には明確になっていない。

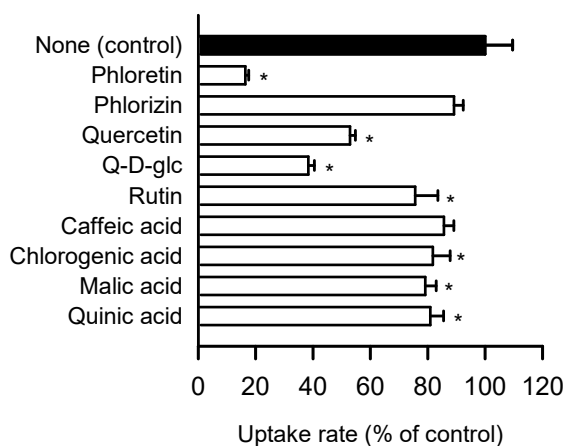


Fig. 4. Effect of Various Compounds on Atenolol Uptake by PMAT Stably Expressed in MDCKII Cells

The specific uptake of ³H]atenolol (100 nM) was evaluated for 3 min at 37°C and pH 6.0 in the presence of a test compound (100 μ M) or in its absence. Q-D-glc, quercetin-3 β -D-glucoside. The control value of specific uptake rate was 214 fmol/min/mg protein. Data are presented as means \pm S.E. (n = 4). * p < 0.05 compared with control.

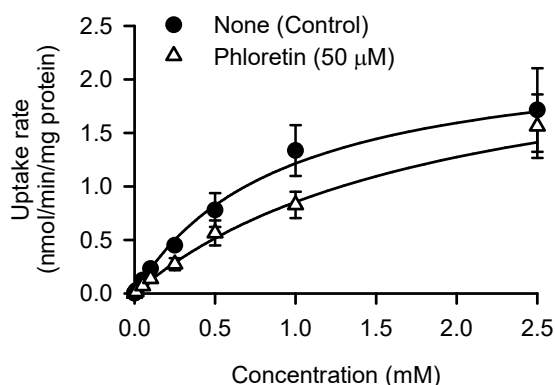


Fig. 5. Kinetic Analysis of Atenolol Transport by PMAT Stably Expressed in MDCKII Cells

The rate of specific atenolol uptake by PMAT was evaluated for 3 min at 37°C and pH 6.0 at varied concentration of atenolol in the absence of flavonoid or in the presence of phloretin (50 μ M). The data are presented as mean \pm S.E. (n = 3).

PMATは刷子縁膜での取り込み輸送に働いている可能性が高いが、OCT1については、側底膜での排出輸送に働いている可能性が高い一方で、刷子縁膜での取り込み輸送への関与の可能性も排除しきれない。そこで、極性細胞であるMDCKII細胞にOCT1及びPMATを安定共発現させた上皮様モデル細胞を作製し、atenololの経細胞輸送を検討することにした。なお、OCT1及びPMATの細胞内局在の観察のために、FLAGタグを付加したPMAT(FLAG-PMAT)、GFPタグを付加したOCT1(GFP-OCT1)を用いた。

FLAG-PMAT及びGFP-OCT1の安定共発現MDCKII細胞及び、比較のために作製したFLAG-PMATあるいはGFP-OCT1の単独発現MDCKII細胞において、western blot解析により各トランスポーター(タンパク質)が発現していることが確認された。次に、FLAG-PMAT及びGFP-OCT1安定共発現MDCKII細胞をTrans-well上で培養して極性化させ、両トランスポーターの細胞内局在を蛍光免疫染色法により観察した。その結果、FLAG-PMATは刷子縁膜に局在し、GFP-OCT1は側底膜に局在していた。しかし、GFP-OCT1の刷子縁膜への分布は観察されなかった。よって、PMATは先の報告のとおり刷子縁膜に局在することが示唆された。また、OCT1の膜局在特性については、Köingらの報告と一致し、側底膜に局在することが示唆された。

各細胞をTrans-well上で培養して分化させ、apicalからbasal方向への $[^3\text{H}]$ atenolol(100 nM)の経細胞輸送の評価を行った。その結果、FLAG-PMAT単独発現細胞においてmock細胞と比較して高い経細胞輸送がみられた。したがって、刷子縁膜に発現するFLAG-PMATがatenololの細胞内取り込みに働き、経細胞輸送において重要な役割を果たすことが示唆された。しかし、GFP-OCT1の共導入によって、それ以上のatenololの経細胞輸送の上昇は見られず、側底膜に発現するGFP-OCT1のatenolol排出輸送活性を確認することはできなかった(Fig. 6)。atenololの2級アミンのpKaは9.6であり、細胞内のpHでは大部分の分子がプロトン付加されカチオンとして存在している。よって、脂質二重膜で構成される細胞膜の透過性は低く、単純拡散によって排出されるとは考えにくい。このため、FLAG-PMATを導入した場合のatenololの経細胞輸送においては、MDCKII細胞に内因性に発現している未知のトランスポーターが側底膜での排出輸送に関与している可能性が考えられる。また、その排出輸送活性が高いレベルにあるため、GFP-OCT1の排出輸送機能が検出し難い状況にあった可能性が考えられる。一方、GFP-OCT1単独発現細胞では、atenololの経細胞輸送は低く、mock細胞での輸送と同程度であった。FLAG-PMAT単独発現細胞の場合と異なり、atenolol輸送を上昇させる効果がみられなかったことから、OCT1については、刷子縁膜への局在が観察されなかったことと対応し、機能面でも刷子縁膜でのatenolol取り込み輸送への関与がないことが確認された。なお、paracellular経路のマーカであるmannitolの透過も検討した結果、FLAG-PMAT及びGFP-OCT1の導入の影響は見られなかった。これにより、FLAG-PMAT単独発現細胞及びFLAG-PMAT/GFP-OCT1安定共発現細胞で見られたatenololの経細胞輸送の上昇において、細胞間隙経路の透過の増大の関与はないことが確認された。また、別途、FLAG-PMAT及びGFP-OCT1がタグを付加していないPMAT及びOCT1と同程度のatenolol輸送活性を有することを確認した。

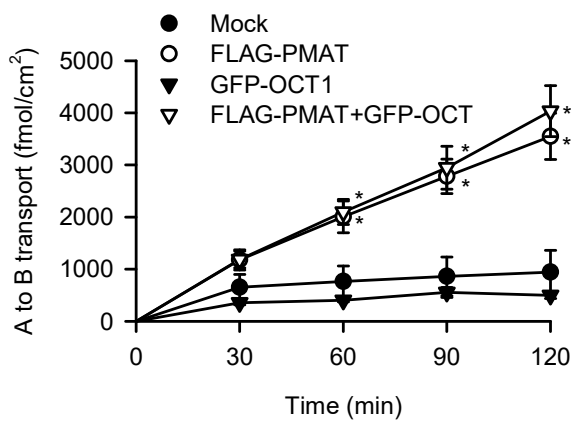


Fig. 6. Transcellular Transport of Atenolol across the Polarized MDCKII Cells Stably Expressing FLAG-PMAT and GFP-OCT1

Transcellular transport of $[^3\text{H}]$ atenolol (100 nM) in MDCKII cells stably expressing FLAG-PMAT and GFP-OCT1, or either of them. The pH values were 6.0 and 7.4, respectively, for the apical and the basal medium; * $p < 0.05$ compared with the value for mock cells at each time point. Data are presented as means \pm S.E. ($n = 3$).

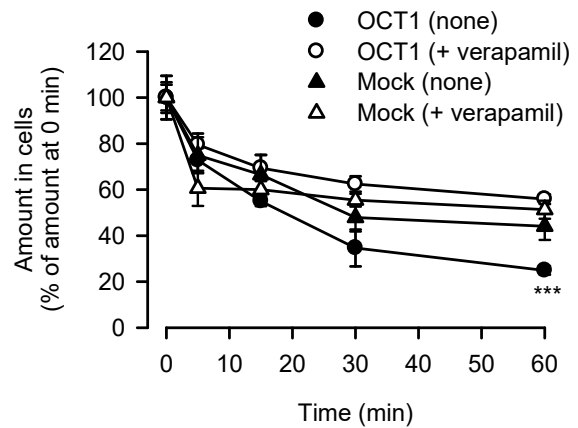


Fig. 7. Time Course of Atenolol Efflux by OCT1 Stably Expressed in MDCKII Cells

The cells were pretreated in Hanks' solution containing $[^3\text{H}]$ atenolol (100 nM) at 37°C and pH 7.4. After 30 min, the cells were washed three times with ice-cold buffer and then incubated in substrate-free Hanks' solution for indicated periods at 37°C and pH 7.4; *** $p < 0.05$ compared with the value for mock (none) at each time point. Data are presented as means \pm S.E. ($n = 4$).

atenolol の経細胞輸送における OCT1 の関与を確認できなかったが、OCT1 の atenolol 輸送機能をさらに探るため、OCT1 単独発現細胞を用い、細胞内に蓄積させた atenolol に対する排出輸送活性を検討することにした。実験は、24 well プレートに播種した細胞を用いて行った。あらかじめ³H]atenolol (100 nM) を細胞内に取り込ませたのち、³H]atenolol を含まないバッファー中で細胞をインキュベーションすることによって³H]atenolol を流出させ、細胞内に残存した³H]atenolol 量を定量することで、OCT1 の排出輸送活性の評価を試みた。その結果、atenolol の細胞内量は、mock 細胞及び OCT1 発現細胞において時間の経過とともに低下し、atenolol の流出がみとめられた。インキュベーション溶液中に、OCT1 の阻害剤である verapamil (100 μM) を添加したところ、OCT1 発現細胞においてのみ atenolol の細胞内残存量の上昇（流出の低下）がみとめられた。各細胞における atenolol の残存量を 0 分における残存量に対する割合として表すと、OCT1 発現細胞における細胞内 atenolol 量の低下は、mock 細胞での低下と比較して速やかであり、verapamil 添加により mock 細胞での細胞内量の推移とほぼ等しくなった。OCT1 の atenolol 排出輸送機能により、OCT1 発現細胞において atenolol 流出が上昇し、それが 100 μM の verapamil (OCT1 阻害剤) によりほぼ完全に阻害されたものと考えられる。これにより、OCT1 が atenolol 排出輸送機能を持つことが確認できた (Fig. 7)。

以上より、小腸においては、刷子縁膜の PMAT による細胞内取り込みと、それに続く側底膜の OCT1 による細胞外排出により、atenolol の吸収経路が構成されていることが示唆された。

【結論】

本研究では、FJ により atenolol の腸管吸収阻害を生じる相互作用の機序の解明を目指して、atenolol 輸送に関わるトランスポーターの探索とフラボノイド類の阻害効果の解析に取り組み、以下の知見を得ることができた。

1. 小腸上皮細胞側底膜に発現する OCT1 が atenolol 輸送活性を有することを見出した。また、OCT1 による atenolol 輸送が AJ 中に含まれる主要なフラボノイド類である phloretin 及び quercetin によって強く阻害されることが見出された。なお、両フラボノイドによる OCT1 阻害は非競合阻害であり、配糖体がアグリコンと同等の阻害活性を示すという特徴も見出された。特に、phloretin の K_i 及び IC_{50} は、AJ 飲用時に想定される phloretin の腸管腔内濃度と同等であり、atenolol の吸収阻害を引き起こす可能性があることが示唆された。
2. 小腸上皮細胞刷子縁膜に発現する PMAT が atenolol 輸送活性を有することを見出した。OCT1 の場合と同様に、PMAT による atenolol 輸送は phloretin 及び quercetin によって強く阻害された。また、やはり同様に、phloretin の K_i 及び IC_{50} は AJ 飲用時に想定される phloretin の腸管腔内濃度と同等であり、atenolol の吸収阻害を引き起こす可能性があることが示唆された。しかし、PMAT に対して、phloretin は競合阻害様式で作用し、quercetin はアロステリック効果を伴うとみられる阻害様式を示した点で、OCT1 に対する阻害の特徴とは異なった。また、配糖体よりもアグリコンが強い阻害活性を有する傾向が見られた点でも、OCT1 に対する阻害の特徴とは異なった。
3. PMAT 及び OCT1 は、それぞれ刷子縁膜での細胞内取り込み、及び、側底膜での細胞外排出に働き、atenolol の吸収経路を構成していることが示唆された。

以上の知見は、FJ 成分のトランスポーターへの作用に起因して吸収阻害を生じる薬物相互作用の理解を進展させ、また、関連の医薬品の使用の最適化を図るうえで役立つものと考えられる。また、今後、有機カチオン性薬物の腸管吸収における PMAT 及び OCT1 の役割の解明の進展を期待したい。

【基礎となる報文】

1. [Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H: Functional identification of organic cation transporter 1 as an atenolol transporter sensitive to flavonoids. *Biochemistry and Biophysics Reports*, **2**, 166-171 \(2015\).](#)
2. [Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H: Functional identification of plasma membrane monoamine transporter \(PMAT/SLC29A4\) as an atenolol transporter sensitive to flavonoids contained in apple juice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **106**, 2592-2598 \(2017\).](#)
3. [Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H: Evaluation of transcellular transport of atenolol in polarized MDCKII cells stably expressing human PMAT and OCT1. Manuscript in preparation.](#)

論文審査の結果の要旨

水溶性 β 遮断薬に分類される atenolol は、単純拡散により腸管から吸収されると考えられてきている。しかし、近年、フルーツジュースと共に服用することによる atenolol の吸収低下が報告され、atenolol の腸管吸収にトランスポーターが関与し、そのトランスポーターをフラボノイド類等のフルーツジュース中成分が阻害するという可能性が浮かび上がってきた。本研究は、このような背景の下で、atenolol 吸収に関わるトランスポーターの探索及びフラボノイド類の阻害効果の解析に取り組んだものである。

atenolol 輸送活性を持つトランスポーターの探索の結果、小腸上皮細胞の刷子縁膜（腸管腔側膜）に発現する PMAT 及び側底膜（血管側膜）に発現する OCT1 が見出され、それぞれが刷子縁膜での細胞内取込及び側底膜での細胞外排出に働くことで atenolol の吸収経路が構成されていることが示唆された。さらに、両トランスポーターによる atenolol 輸送が phloretin 等のフラボノイド類によって強く阻害されることを見出された。一方で、OCT1 に対してはフラボノイド類の配糖体がアグリコンと同等の阻害活性を示すが、PMAT に対しては配糖体よりもアグリコンが強い阻害活性を示す点等、フラボノイド類の阻害特性の両トランスポーター間での差異も明らかとなった。

以上のように、atenolol の腸管吸収に関わるトランスポーターとして PMAT 及び OCT1 を見出し、さらに両トランスポーターに対する phloretin 等のフラボノイド類の阻害特性を明らかにすることができた。これらは、atenolol 及び関連医薬品の吸収機構及びフラボノイド類による相互作用の理解を進展させ、その使用法の最適化を図るうえでの基盤となる、価値ある成果である。論文での表現も妥当であり、博士論文として合格であると判定する。