

明 細 書

発明の名称：

O A T P 1 B 1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングするための方法、及びO A T P 1 B 1 発現量を測定するための方法

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光化合物であるジクロロフルオレセインを用いた、O A T P 1 B 1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングする方法、及びO A T P 1 B 1 発現量を測定するための方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、創薬における肝細胞の役割がますます重要になってきた。肝細胞は、薬物の生体内でのクリアランスの予測や、薬物間相互作用の検討など、薬物の生体内動態の研究において不可欠な存在となっている。肝細胞に存在する、薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄）を左右する様々な代謝酵素やトランスポーターの分子メカニズムが解明されつつある。そのうち特に、有機アニオン系薬物の薬物動態に対する、有機アニオントランスポーター（O r g a n i c A n i o n T r a n s p o r t i n g P o l y p e p t i d e ; O A T P）の役割が注目されている（非特許文献1）。

[0003] O A T Pファミリーは、小腸や腎臓、肝臓など生体内の各所に発現しているが、このうち特に肝細胞に発現するものとして、O A T P 1 B 1（別名：O A T P - C、O A T P 2 又はL S T - 1）、O A T P 1 B 3（別名：O A T P - 8）及びO A T P 2 B 1（別名：O A T P - B）が知られている（非特許文献2 及び3）。O A T P 1 B 1によって肝細胞に取り込まれる基質薬物として、スタチン系薬物やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬などが知られており、また、O A T P 1 B 1の取り込み活性を阻害する阻害剤として、シクロスポリンやリファンピシンなどが知られている（非特許文献2）。

[0004] O A T P 1 B 1の基質薬物とO A T P 1 B 1阻害剤とを併用すると、基質薬物の肝臓への取り込みが少なくなり、血中濃度が上昇してしまうことが知

られている。このため、OATP1B1の取り込み活性に対する阻害作用の有無は、薬物間相互作用を評価する上で非常に重要である。従来、トランスポーターを介した薬物間相互作用を定量的に評価するために、放射線同位体によってラベルした既知の基質を用いた評価方法（RI法）が知られている（特許文献1）。

[0005] RI法は高い感度を得られるが、取り扱いが煩雑で費用も高い。一方、放射線同位体を使わず、蛍光化合物を使用する検出法（蛍光法）もある。例えば、OAT1（Organic Anion Transporter 1）の良好な基質である6-カルボキシフルオレセイン（6-CFL）を利用した評価方法が報告されている（非特許文献4）。

[0006] 蛍光法は操作が簡単で費用もRI法より低く、スループット性に優れているといえる。しかしながら、一般的にある化合物があるトランスポーターの基質になり得るか否かは容易に予測し得ないため、アニオントランスポーターの基質と成り得る蛍光化合物はあまり知られていなかった。また、従来の蛍光基質の中には基質自体が発する蛍光強度が弱く、被検化合物の自家蛍光や蛍光基質の褪色によって検出感度が必ずしもよくないなどの問題点がある。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2006-340610号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Matthew G. Soarsら、Chemico-Biological Interactions、168、（2007）p2-15

非特許文献2：Kathleen M. Giacominiら、Nature Reviews Drug Discovery、Vol. 9、p215-236、2010

非特許文献3：Bonnie Hsiangら、J. Biol. Chem.、

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] したがって、本発明は従来のR1法の問題点を鑑みて、安全で安価で操作が簡単であり、かつ、R1法と同程度の感度で検出できる、蛍光化合物を利用した、OATP1B1の輸送活性を促進又は阻害する化合物のスクリーニング方法、及びOATP1B1発現量を測定するための方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するため、複数の蛍光化合物を用いて、OATPの基質としての適合性を検討した。その結果、ジクロロフルオレセイン(DCF)は、OATP1B1の優れた基質であることを判明し、また、驚くことにDCFを用いてOATP1B1の輸送活性を評価する場合、従来のR1法と同等な結果が得られることを見出し、本発明の完成に至った。

[0011] すなわち、本発明は、ジクロロフルオレセインを用いた、OATP1B1の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングするための方法を提供すること。

[0012] 上記方法は好ましくは、OATP1B1を発現する細胞を用意する工程と、ジクロロフルオレセイン及び被検化合物を細胞と接触させる工程と、細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインの蛍光強度を測定する工程と、測定された蛍光強度が、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも高い場合、被検化合物をOATP1B1の輸送活性を促進する化合物と判定し、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも低い場合、被検化合物をOATP1B1の輸送活性を阻害する化合物と判定する工程とを含む。

[0013] 本発明のスクリーニング方法におけるOATP1B1を発現する細胞は、OATP1B1強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒ

Vol. 274, p37161-37168, 1999
 非特許文献4: Thomas Cihlarら, Analytical Biochemistry 283, p49-55, 2000

ト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択されることが好ましく、また、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞であるか、或いは、配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA によって形質転換された細胞であることが好ましい。

[0014] 本発明はまた、ジクロロフルオレセインの、O A T P 1 B 1 の発現量の測定における使用を提供する。

[0015] 本発明はまた、被検細胞における O A T P 1 B 1 の発現量を測定するための方法を提供し、該方法はジクロロフルオレセインを被検細胞と接触させる工程と、被検細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインの蛍光強度を測定する工程と、測定された蛍光強度に基づいて、被検細胞における O A T P 1 B 1 発現量を評価する工程とを含む。

[0016] 本発明の測定方法において、対照として O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞を用いて、被検細胞における O A T P 1 B 1 発現量を相対的に評価することが好ましい。上記 O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞が、O A T P 1 B 1 強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択されることが好ましく、また、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞であるか、或いは、配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA によって形質転換された細胞であることが好ましい。

[0017] 本発明はさらに、ジクロロフルオレセインと、O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞とを含むキットの、被検細胞における O A T P 1 B 1 の発現量の測定における使用を提供する。該キットにおける O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞が、O A T P 1 B 1 強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択されることが好ましく、また、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞であるか、

或いは、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAによって形質転換された細胞であることが好ましい。

発明の効果

[0018] OATP1B1の優れた基質と証明されたジクロロフルオレセインを用いることで、安全で安価で操作が簡単であり、かつ、RI法と同程度の感度で、OATP1B1の輸送活性を促進又は阻害する化合物を検出することができる。本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、OATP1B1の基質である薬物の血中濃度などの体内動態をコントロールすることができる」と期待されている。また、本発明のスクリーニング方法によって薬物の相互作用を予測することもできる。

[0019] 本発明はまた、安全で安価で操作が簡単であり、かつ、RI法と同程度の感度で、OATP1B1の発現量を測定するための方法を提供することができる。OATP1B1の発現量の測定は、例えば、肝細胞などのOATP1B1を発現する細胞の活性の評価や、異なるロットの肝細胞の活性の比較において有用であると考えられる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]各種フルオレセイン誘導体の基質性を示す図である。

[図2]OATP1B1によるジクロロフルオレセイン(DCF)の経時的取り込みを示す図である。

[図3]OATP1B1によるDCFの取り込みの速度論的解析を示す図である。

。

[図4]既知のOATP阻害剤によるDCFの取り込みへの影響を示す図である。

。

[図5]DCF法と従来のRI法との K_m 値の比較を示す図である。

[図6]ヒト肝細胞による時間・温度依存的なDCFの取り込みを示す図である。

。

[図7]ヒト肝細胞によるDCFの取り込みの速度論的解析を示す図である。

[図8]ヒト肝細胞へのDCFの取り込みに対するOATP阻害剤の効果を示す

図である。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明における OATP1B1 は、主にヒト肝細胞の細胞膜に発現し、ア

ニオン化合物を細胞内に取り込む活性（輸送活性）を有する有機アニオン
トランスポートアニオン（Organic Anion Transport
ring Polypeptide; OATP）の1種であり、OATP
-C、OATP2又はLST-1とも呼ばれている。OATP1B1 タンパ
ク質として、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるものが挙げられるが、
上記アミノ酸配列において、1又は2以上で9以下のアミノ酸残基の置換、
欠失、又は付加されたアミノ酸配列を含み、OATP1B1の機能を有する
タンパク質をも本発明に含まれる。OATP1B1 タンパク質をコードする
DNAとして、配列番号2に記載の核酸配列からなるものが挙げられるが、
上記核酸配列において、1又は2以上で50以下の塩基の置換、欠失、又は
付加された核酸配列を含み、OATP1B1の機能を有するタンパク質をコ

ードするDNAをも本発明に含まれる。

[0022] 本発明におけるジクロロフルオレセイン（DCF）は、蛍光化合物フルオ
レセインの誘導体であり、市販で入手することができる。DCFが有機アニ
オントランスポートアニオンの基質となり得ることはこれまで知られていない。

[0023] 本発明のスクリーニング方法は、ジクロロフルオレセインを用いた、OA
T P 1 B 1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングするため
の方法であって、好ましくは以下の工程を含むものである。

[0024] 本発明のスクリーニング方法の第1の工程は、OATP1B1を発現する
細胞を用意する工程である。OATP1B1を発現する細胞とは、細胞膜に
OATP1B1を機能的に発現している細胞をいう。機能的に発現している
ことは、OATP1B1がアニオン化合物の輸送活性を有する態様で細胞
膜に発現されていることを意味する。OATP1B1を発現する細胞として
、特に限定されないが、例えば不死化された細胞株でOATP1B1を発現
しているものや、人為的に改変された細胞株でOATP1B1を発現してい

るもの、ウイルスなどによって不死化された細胞株でO A T P 1 B 1を発現しているものなどが挙げられる。また、ヒト由来の細胞株でO A T P 1 B 1を発現しているものや、O A T P 1 B 1を高発現するように遺伝子導入された細胞株も好ましく用いられる。

[0025] 本発明のスクリーニング方法に使用されるO A T P 1 B 1を発現する細胞として、特に、O A T P 1 B 1強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞などのO A T P 1 B 1を発現する初代及び株化・非株化細胞が好ましい。ここで、O A T P 1 B 1強制発現細胞とは、遺伝子工学手法によって、O A T P 1 B 1タンパク質又はペプチドをコードする遺伝子又はヌクレオチドが導入され、O A T P 1 B 1タンパク質又はペプチドを機能的に発現する細胞をいう。このような強制発現細胞は、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞、或いは、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAによって形質転換された細胞であることが好ましい。O A T P 1 B 1の過剰発現は、一過性発現又は安定発現のいずれでもよく、再現性を考慮し、安定発現する細胞のほうが好ましく用いられる。形質転換された細胞も同様に一過性に又は安定に形質転換された細胞のいずれでもよく、再現性を考慮し、安定に形質転換された細胞のほうが好ましく用いられる。

[0026] 強制発現の宿主細胞は特に限定されないが、H E K - 2 9 3細胞などの哺乳類細胞やアフリカツメガエル卵母細胞が取り扱いの簡便さから好適に用いられる。遺伝子導入の手法は、一般的に知られている。例えば、ヒト肝臓cDNAを鋳型として、配列番号2の塩基配列の全長をクローニングできるように適宜なプライマーを用いて、PCRなどによって目的DNAを増幅し、これを適宜な発現プロモータを有するベクターに挿入し、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、又はマイクロインジェクション法などの方法によって細胞に導入する。形質転換された細胞は適宜な選択培地によって選択することができる。

- [0027] 本発明のスクリーニング方法の第2の工程は、ジクロロフルオレセイン及び被検化合物を細胞と接触させる工程である。ジクロロフルオレセイン及び被検化合物を細胞と接触させることとは、細胞の培養液又は緩衝液に両者を同時に又は前後に添加し細胞と接触させることをいう。ジクロロフルオレセインの添加濃度は、 $0.1\ \mu\text{M}$ 以上あれば十分な検出感度を得られるが、例えば $0.1\ \mu\text{M}\sim 1000\ \mu\text{M}$ の範囲内において適宜に調節すればよい。一方、被検化合物の添加量はその化合物によって異なるが、一般的に $1\ \text{nM}\sim 1\ \text{mM}$ の範囲内において適宜に調節すればよい。細胞との接触時間は、1分～30分であればよく、ジクロロフルオレセインの取り込みが直線的に増加する時間範囲であることが好ましい。
- [0028] ジクロロフルオレセイン及び被検化合物を細胞と接触させた後に、細胞内に取り込まれていない蛍光化合物を取り除くために、細胞を洗浄することが好ましい。洗浄は、一般的に、 $1^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ の温度で、PBSやKrebs-Henseleit (KH) などの緩衝液によって、1回～3回洗浄すればよい。
- [0029] 本発明のスクリーニング方法の第3の工程は、細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインの蛍光強度を測定する工程である。細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインは、細胞を可溶化することによって溶液中に回収することができる。細胞の可溶化は例えばNaOH水溶液を用いて処理することが挙げられる。回収したジクロロフルオレセインを含む溶液を、蛍光光度計を用いて、励起波長 $450\ \text{nm}\sim 550\ \text{nm}$ 、蛍光波長 $500\ \text{nm}\sim 600\ \text{nm}$ にて蛍光強度を測定する。測定した蛍光強度を蛍光化合物の量（モル数など）に換算するために、予め検量線を作成することが好ましい。また、取り込まれた蛍光化合物を基準化するために、細胞当たり又は単位タンパク質当たりの蛍光化合物の量に換算することが好ましい。
- [0030] 本発明のスクリーニング方法の第4の工程は、測定された蛍光強度が、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも高い場合、被検化合物をOATP1B1の輸送活性を促進する化合物と判定し、被検化合物が存在しない場

合の蛍光強度よりも低い場合、被検化合物を OATP1B1 の輸送活性を阻害する化合物と判定する工程である。測定された蛍光強度が、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも高い場合、被検化合物の存在によってジクロロフルオロセインがより多く細胞内に取り込まれたことを意味するため、被検化合物が OATP1B1 の輸送活性を阻害すると考えられる。

[0031] OATP1B1 の輸送活性を促進する化合物は、OATP1B1 機能低下を伴う遺伝子多型の正常化に利用される。また、OATP1B1 によって輸送される生体内異物の排泄を促進することができる。一方、OATP1B1 の輸送活性を阻害する化合物は、OATP1B1 の選択的基質と薬物間相互作用を引き起こすため、OATP1B1 輸送活性を阻害しない化合物を選択することで、薬物間相互作用の危険性の少ない医薬品の創出につながる。

[0032] 本発明はまた、ジクロロフルオロセインの OATP1B1 の発現量の測定における使用を提供する。該ジクロロフルオロセインは、OATP1B1 の発現量の測定に使用される旨、たとえば OATP1B1 の発現量の測定方法などが記載された取扱説明書などと一緒に包装されることが好ましい。

[0033] 本発明の被検細胞における OATP1B1 の発現量を測定するための方法は、ジクロロフルオロセインを被検細胞と接触させる工程と、被検細胞内に取り込まれたジクロロフルオロセインの蛍光強度を測定する工程と、測定された蛍光強度に基づいて、被検細胞における OATP1B1 発現量を評価する工程とを含む。これらの工程は上述の各工程に準ずる。測定された蛍光強度は、まず検量線に基づいて蛍光化合物の量に換算され、その後、細胞当たり又は単位タンパク質当たりの化合物量に基準化されることが好ましい。こうして得られる基準化したデータは他の細胞と比較することができるため、OATP1B1 発現量が相対的に多いもしくは少ない細胞の選択に利用され

得る。

[0034] 本発明の測定方法において、対照としてOATP1B1を発現する陽性細

胞を用いて、被検細胞におけるOATP1B1発現量を相対的に評価するこ
とが好ましい。OATP1B1を発現する陽性細胞が、OATP1B1強制

発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト

凍結肝細胞、及びサントイチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択されるこ

とが好ましく、また、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

を細胞膜に過剰発現している細胞であるか、或いは、配列番号2に記載の塩

基配列からなるDNAによって形質転換された細胞であることが好ましい。

[0035] 本発明はまた、ジクロロフルオレセインと、OATP1B1を発現する陽

性細胞とを含むキットの、被検細胞におけるOATP1B1の発現量の測定

における使用を提供する。該キットにおけるOATP1B1を発現する陽性

細胞が、OATP1B1強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝

細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサントイチ培養ヒト肝細胞

からなる群より選択されることが好ましく、また、配列番号1に記載のアミ

ノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞であるか、或

いは、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAによって形質転換された

細胞であることが好ましい。

[0036] 上記キットは、他に細胞を培養する培地、細胞に添加するあるいは細胞を

洗浄する緩衝液、タンパク質の量を測定するための試薬などを含んでもよい

。

実施例

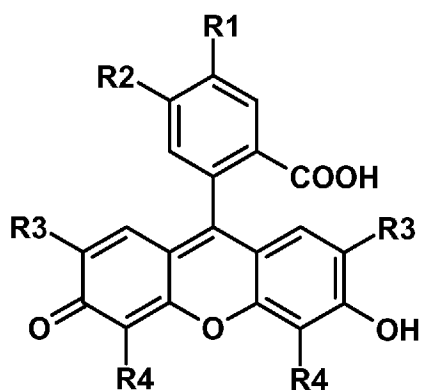
[0037] (実施例1 各種フルオレセイン誘導体の基質性の検討)

下記のフルオレセイン誘導体である各種蛍光色素について、OATPの基

質としての適合性を検討した。

[0038]

[化1]



[表1]

フルオレセイン誘導体	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
フルオレセイン (FL)	H	H	H	H
ジクロロフルオレセイン (DCF)	H	H	Cl	H
カルボキシジクロロ フルオレセイン (CDCF)	R ₁ =COOH、R ₂ =H又は R ₁ =H、R ₂ =COOH		Cl	H
オレゴングリーン (Oregon Green)	H	H	F	H
5-カルボキシ フルオレセイン (5-CFL)	COOH	H	H	H
6-カルボキシ フルオレセイン (6-CFL)	H	COOH	H	H
カルセイン (Calcein)	H	H	H	CH ₂ N(CH ₂ COOH) ₂
ビスカルボキシエチル カルボキシフルオレセイン (BCECF)	R ₁ =COOH、R ₂ =H又は R ₁ =H、R ₂ =COOH		(CH ₂) ₂ COOH	H

[0039] ヒト肝臓 total RNA (Invitrogen社) を鋳型に、以下のプライマーを使用し、RT-PCR法により OATP1B1、OATP1B3、及び OATP2B1 の cDNA (それぞれ配列番号 2、3 及び 4 に示す) をクローニングした。

O A T P 1 B 1 用プライマー

センスプライマー：C G T C C G A C T T G T T G C A G T T G（配列番号 5）

アンチセンスプライマー：A A C A C A G A A G C A G A A G T G G C（配列番号 6）

O A T P 1 B 3 用プライマー

センスプライマー：T A A C A T C A G A A A A A G G A T G G A C T T G（配列番号 7）

アンチセンスプライマー：T G C A A T G T T A G T T G G C A G C A（配列番号 8）

O A T P 2 B 1 用プライマー

センスプライマー：C T G A G A A G A T T T G C T T C C T C（配列番号 9）

アンチセンスプライマー：A C T G C T G T G G C T G C T A C T C T（配列番号 10）

[0040] 得られた各遺伝子を p c D N A 3. 1（I n v i t r o g e n 社）に組み込んだ発現ベクターを、L i p o f e c t a m i n 2 0 0 0（I n v i t r o g e n 社）を用いて、リポフェクション法により H E K - 2 9 3 細胞に導入した。H y g r o m y c i n 含有選択培地にて培養し、O A T P 1 B 1、O A T P 1 B 3 及び O A T P 2 B 1 をそれぞれ強制発現する H E K - 2 9 3 細胞を作製した。

[0041] 上記細胞を 4×10^5 細胞／ウェルになるようにポリ-D-リジンコートディッシュに蒔いた。培地を K H バッファーに置換し、D M S O に溶解した各種蛍光色素を K H バッファー中の最終濃度が $1 \mu\text{M}$ となるようにそれぞれの H E K - 2 9 3 細胞に添加し、 37°C にて 5 分間培養した。その後、氷冷した K H バッファーを用いて細胞を 3 回洗浄した後、 0.1N N a O H 水溶液によって細胞を可溶化し、細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した（励起波長 490nm 、蛍光波長 515nm ）。

[0042] 取り込まれた蛍光化合物の定量のために、予め単位蛍光化合物当たりの蛍光強度を示す検量線を作成した。この検量線に基づき、測定された蛍光強度を各ウェル当たりの蛍光化合物 ($\text{pmol}/\text{ウェル}$ 又は $\mu\text{L}/\text{ウェル}$) に変換し、これを、可溶化された細胞の総タンパク質量 (mg タンパク質/ ウェル) で除する (基準化する) ことにより、単位タンパク質当たりの蛍光化合物量に変換した (pmol/mg タンパク質 又は $\mu\text{L}/\text{mg}$ タンパク質)。

[0043] 結果は図1(a)に示した。図1(a)から明らかなように、他の色素とトランスポーターとの組み合わせに比べて、ジクロロフルオレセイン (DCF) と OATP1B1 との組み合わせが著しく高い取り込み量を示した。DCF は OATP1B1 の優れた基質であることを示唆している。参考のため、上記と同様な方法で、各種フルオレセイン誘導体の OAT1 及び OAT3 に対する基質性も検討した。その結果は図1(b)に示した。図1(b)から、非特許文献4記載のとおり、6-CFL は OAT1 の良好な基質であることが証明されたが、DCF は OAT1 及び OAT3 のいずれの良好な基質でもないことも明らかになった。この結果からも、DCF と OATP1B1 との組み合わせは特異的なものであることが証明された。

[0044] (実施例2 OATP1B1によるDCFの経時的取り込み)

実施例1と同じように、OATP1B1を強制発現するHEK-293細胞を用意し、 4×10^5 細胞/ ウェル になるようにポリ-D-リジンコートディッシュに蒔いた。培地をKHバッファーに置換し、DMSOに溶解したDCFをKHバッファー中の最終濃度がそれぞれ0.1 μM 、1 μM 、及び10 μM となるように細胞に添加し、37℃にて0分～30分間培養した。1分間、5分間、10分間及び30分間の時点においてそれぞれサンプリングし、氷冷したKHバッファーを用いて細胞を3回洗浄した後、0.1N NaOH水溶液によって細胞を可溶化し、実施例1と同様に細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した (励起波長490nm、蛍光波長515nm)。

[0045] 結果は図2に示した。図2からOATP1B1を強制発現するHEK-2

93細胞によるDCFの細胞内への取り込み量は、経時的に増大し、かつ、添加された蛍光色素の濃度に依存していることが判った。

[0046] (実施例3 OATP1B1によるDCFの取り込みの速度論的解析)

実施例1と同じように、OATP1B1を強制発現するHEK-293細胞を用意し、 4×10^5 細胞/ウェルになるようにポリ-D-リジンコートディッシュに蒔いた。培地をKHバッファーに置換し、DMSOに溶解したDCFをKHバッファー中の最終濃度がそれぞれ $0.1 \mu\text{M}$ ～ $100 \mu\text{M}$ となるように細胞に添加し、 37°C にて5分間培養した。 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$ 、及び $100 \mu\text{M}$ の取り込み量をプロットし、取り込み速度をミカエリス・メンテンプロットによって分析した。

[0047] 結果は図3に示した。 K_m 及び V_{max} は下記のミカエリス・メンテン式 (Michaelis-Menten kinetics) によって計算した。その結果、 $V_{max} = 131.6$ (pmol/分/mgタンパク質)、 $K_m = 7.22$ (μM) である。なお、いずれの結果も4回の測定の平均値である。DCFはOATP1B1の良好な基質であることが判った。

$$v = V_{max} \cdot S / (K_m + S)$$

[0048] (実施例4 既知のOATP阻害剤によるDCFの取り込みへの影響)

実施例1と同じように、OATP1B1を強制発現するHEK-293細胞を用意し、 4×10^5 細胞/ウェルになるようにポリ-D-リジンコートディッシュに蒔いた。DCF (0.1% DMSO中；最終濃度： $3 \mu\text{M}$) 及び所定の濃度の既知のOATP1B1阻害剤を細胞に添加し、 37°C にて5分間培養した。既知のOATP1B1の阻害剤としては、リファンピシン (Rif； $10 \mu\text{M}$)、プロモスルフォフタレイン (BSP； $10 \mu\text{M}$)、シクロスポリンA (Cys A； $10 \mu\text{M}$)、Estradiol-17 β -D-glucuronide (EG； $10 \mu\text{M}$ 及び $30 \mu\text{M}$)、及びエストロン-3-硫酸 (ES； $10 \mu\text{M}$ 及び $30 \mu\text{M}$) を使用した。培養後、氷冷したKHバッファーを用いて細胞を3回洗浄した後、 0.1N NaOH水溶

液によって細胞を可溶化し、実施例 1 と同様に細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した (励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm)。

[0049] 結果は図 4 に示した。図 4 から、既知の OATP1B1 阻害剤を添加しない対照と比較し、阻害剤を添加した細胞において DCF の取り込みが減少したことが判った。すなわち、HEK-293 細胞による DCF の取り込みは既知の OATP1B1 阻害剤によって阻害された。この阻害は、阻害剤である *Est radi o l -17β-D-g l u c u r o n i d e*、及びエストロン-3-硫酸の濃度に依存的であることも判明した。DCF の取り込みは HEK-293 細胞に発現している OATP1B1 によるものであることが証明された。

[0050] (実施例 5 DCF 法と従来の RI 法との K_i 値の比較)

実施例 1 と同じように、OATP1B1 を強制発現する HEK-293 細胞を用意し、 4×10^5 細胞/ウェルになるようにポリ-D-リジンコートプレートに時いた。DCF 法では、実施例 4 と同じように DCF (0.1% DMSO 中；最終濃度：3 μ M) 及び所定の濃度の既知の OATP 阻害剤を細胞に添加し、37°C にて 5 分間培養し、細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した (励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm)。従来の RI 法では、ラベルした *Est radi o l -17β-D-g l u c u r o n i d e* (EG) を使用した。DCF と同じように EG (0.1% DMSO 中；最終濃度：0.01 μ M) 及び所定の濃度の既知の OATP 阻害剤を細胞に添加し、37°C にて 5 分間培養した。その後、氷冷した KH₂PO₄ を用いて細胞を 3 回洗浄した後、0.1N NaOH 水溶液によって細胞を可溶化し、1N HCl 水溶液にて中和した後、細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。阻害剤として下記の表に示した化合物を使用した。DCF 法及び従来の RI 法のそれぞれの K_i 値を計算し、相関を確認した。

[0051]

[表2]

	化合物	K_i (μ M)	
		DCF	EG
1	ES	0.079	0.078
2	BSP	0.092	0.073
3	シクロスポリンA	0.18	0.13
4	リファンピシン	0.26	0.29
5	リトナビル	0.62	0.55
6	タクロリムス	1.27	0.89
7	エリスロマイシン	6.99	4.14
8	タウロコール酸	8.68	17.5
9	ケトコナゾール	15.6	12.2
10	ベラパミル	21.8	23.9
11	プロベネシド	41.9	73.4
12	シメチジン	>300	>300
13	メトトレキサート	>300	>300

[0052] 結果は図5に示した。図5から判るように、DCF法の K_i 値と従来のRI法の K_i 値とは非常に良い相関を有している($R^2=0.9797$)。このことから、DCFを用いたOATP1B1の阻害活性の評価は可能であり、かつ、従来のRI法と同等な確度で阻害定数を算出できることが証明された。

[0053] (実施例6 ヒト肝細胞への時間・温度依存的なDCFの取り込み)

ヒト凍結肝細胞及び融解用培地であるCryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM)はInvitrogen社より購入した。37℃の水浴でヒト凍結肝細胞を融解させた後、あらかじめ37℃に温めておいたCHRMに肝細胞を添加した。室温で遠心後、上清を捨て、肝細胞に氷冷したKHバッファーを加え、 1×10^6 細胞/mLとなるように肝細胞懸濁液を調製し、氷上に保存した。また、DCFをKHバッファー中の最終濃度が20 μ Mとなるように溶解し、DCF溶液を調製した。反応開始前に、肝細胞懸濁液を37℃の水浴で2分間温め、あらかじめ37℃に温めておいたDCF溶液を肝細胞懸濁液と等量添加し反応を開始した。同様に、4℃においても、氷上に保存した肝細胞懸濁

液に、あらかじめ氷上に保存したDCF溶液を肝細胞懸濁液に等量添加し、反応を開始した。37℃及び4℃にてそれぞれ0分～5分間肝細胞を培養した。0.5分間、2分間、及び5分間の時点においてそれぞれサンプリングし、オイルスピン法（たとえば、Yoshihisa SHITARAら、JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS、304:610-616、2003）により肝細胞をDCF溶液から分離した。具体的には、肝細胞培養液80μLを50μLオイル（比重1.015；Sigma-Aldrich）及び、オイル層の下にある100μLの2N NaOH水溶液が入った遠心チューブに添加し、10,000gで20秒間遠心した。これにより、肝細胞はオイル層を通過し、2N NaOH水溶液にて可溶化した。続いて、実施例1と同様に細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した（励起波長490nm、蛍光波長515nm）。

[0054] 結果は図6に示した。4℃では肝細胞膜表面のトランスポーターが機能しないため、測定された蛍光化合物DCFの取り込み量は、トランスポーターを介さない取り込み（膜表面への非特異的結合、もしくは受動拡散）と考えられる。37℃ではトランスポーターが機能するため、37℃と4℃とのDCFの取り込み量の差は、トランスポーター（OATP1B1及びそれ以外のトランスポーター）を介した取り込み量であると考えられる。図6から、37℃ではトランスポーターを介したヒト肝細胞内へのDCFの取り込み量は、経時的に増大することが判った。

[0055] （実施例7 ヒト肝細胞によるDCFの取り込みの速度論的解析）

実施例6と同様にヒト肝細胞を用意し、 1×10^6 細胞/mLになるように肝細胞懸濁液を調製した。DCFをKHバッファー中の最終濃度がそれぞれ2μM、6μM、20μM、60μM、200μM、600μM、及び2000μMとなるように溶解した。反応開始前に肝細胞懸濁液を37℃の水浴で2分間温め、あらかじめ37℃に温めておいたDCF溶液を肝細胞懸濁液に等量添加し、反応を開始した。37℃にてそれぞれ0分～5分間肝細胞を

培養し、0.5分間、2分間、及び5分間の時点においてそれぞれサンプリングし、オキシルスピノ法により肝細胞をDCF溶液から分離した。肝細胞は2N NaOH水溶液にて可溶化し、実施例1と同様に細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した(励起波長490nm、蛍光波長515nm)。上記濃度でのそれぞれの取り込み量をプロットし、取り込み速度を受動拡散の定数項を含むミカエリス・メンテンプロットによって分析し、さらに、取り込み速度と取り込まれた蛍光化合物との相関をイーテュー・ホフスライナープロットによって分析した。

[0056] 結果は図7の(a)及び(b)に示した。図7の(b)において、DCF

の高濃度側(取り込み速度の高い側)で取り込みの飽和が認められた。このことから、ヒト肝細胞によるDCFの取り込みはトランスポーターによるものと考えられる。また、速度論的解析においては、下記の受動拡散の定数項を含むミカエリス・メンテン式によって K_m 、 V_{max} 及び P_{diff} を計算した。

その結果、 $K_m=38.55\mu M$ 、 $V_{max}=117.52pmol/min/10^6$ 細胞、 $P_{diff}=2.20\mu L/min/10^6$ 細胞であった。この K_m は、実施例3のOATP1B1を強制発現する細胞を用いた解析結果($K_m=7.22\mu M$)と値が近いこと、及び、実施例1に示したように、DCFはヒト肝細胞に発現するOATPトランスポーターのうちOATP1B1が最も高い輸送活性を示したことから、ヒト肝細胞によるDCFの取り込みは主にOATP1B1によるものと推測される。

$$v = V_{max} \cdot S / (K_m + S) + P_{diff} \cdot S$$

[0057] (実施例8 ヒト肝細胞へのDCFの取り込みに対するOATP阻害剤の

効果)

実施例6と同様にヒト肝細胞を用意し、 1×10^6 細胞/mLになるように肝細胞懸濁液を調製した。DCFをKHバッファー中の最終濃度がそれぞれ $20\mu M$ 、 $2000\mu M$ となるように溶解した。 $20\mu M$ のDCFを含むKHバッファーに所定の濃度の既知のOATP1B1阻害剤のDMSO溶液を添加し阻害剤溶液とした。既知のOATP1B1の阻害剤としては、フロモ

スルフォフタレイン (BSP; 最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、リファンピシン (Rif; 最終濃度 $10 \mu\text{M}$)、及びシクロスポリンA (CysA; 最終濃度 $10 \mu\text{M}$) を使用した。また、阻害剤を添加しない陽性対照、OATP1B1 阻害剤を添加せずに 4°C にて検討する陰性対照 (4度)、及び、阻害剤の代わりに高濃度 (最終濃度 $1000 \mu\text{M}$) のDCFを添加したもの (DCF (1000)) については、所定の濃度のDCFを含むKHバッファーに、DMSOを添加した。反応開始前に、肝細胞懸濁液を 37°C の水浴で2分間温め、あらかじめ 37°C に温めておいたDCFを含む溶液を肝細胞懸濁液に等量添加し、反応を開始した。 37°C にてそれぞれ0分～5分間肝細胞を培養し、0.5分間、2分間、及び5分間の時点においてそれぞれサンプリングし、オイルスピン法により肝細胞をDCF溶液から分離した。肝細胞を 2N NaOH 水溶液にて可溶化し、実施例1と同様に細胞内に取り込まれた蛍光色素の蛍光強度を測定した (励起波長 490nm 、蛍光波長 515nm)。

[0058] 結果は図8に示した。図8における阻害剤を添加しない陽性対照と 4°C での取り込み量との差は、トランスポーターを介したDCFの取り込み量であると考えられる。これに対して、 $1000 \mu\text{M}$ のDCFを添加したものは、 4°C での取り込みと同程度の蛍光強度を示しており、トランスポーターを介した取り込みは観察されなかった。これは、 $1000 \mu\text{M}$ のDCFによってトランスポーターが飽和したためと考えられる。また、OATP1B1 阻害剤であるBSP、Rif、及びCysAによって、DCFの取り込みが 4°C での取り込みと同程度まで減少したことが判った。すなわち、ヒト肝細胞によるDCFの取り込みは既知のOATP1B1 阻害剤によって阻害された。このことから、ヒト肝細胞へのDCFの取り込みは、主にOATP1B1 によるものと確認された。

産業上の利用可能性

[0059] OATP1B1 の優れた基質と証明されたジクロロフルオレセインを用いることで、安全で安価で操作が簡単であり、かつ、RI法と同程度の感度で、OATP1B1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物を検出することがで

きる。本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、OATP 1B1の基質である薬物の血中濃度などの体内動態をコントロールすることができると期待されている。また、本発明のスクリーニング方法によって薬物の相互作用を予測することもできる。

[0060] 本発明はまた、安全で安価で操作が簡単であり、かつ、R1法と同程度の感度で、OATP1B1の発現量を測定するための方法を提供することができ、OATP1B1の発現量の測定は、例えば、肝細胞などのOATP1B1を発現する細胞の活性の評価や、異なるロットの肝細胞の活性の比較に有用であると考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] ジクロロフルオレセインを用いた、O A T P 1 B 1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングするための方法。
- [請求項2] O A T P 1 B 1 を発現する細胞を用意する工程と、
 ジクロロフルオレセイン及び被検化合物を前記細胞と接触させる工程と、
 細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインの蛍光強度を測定する工程と、
 前記測定された蛍光強度が、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも高い場合、前記被検化合物をO A T P 1 B 1 の輸送活性を促進する化合物と判定し、被検化合物が存在しない場合の蛍光強度よりも低い場合、前記被検化合物をO A T P 1 B 1 の輸送活性を阻害する化合物と判定する工程と
 を含む、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記O A T P 1 B 1 を発現する細胞が、O A T P 1 B 1 強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択される、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記O A T P 1 B 1 を発現する細胞が、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項5] 前記O A T P 1 B 1 を発現する細胞が、配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAによって形質転換された細胞である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項6] ジクロロフルオレセインの、O A T P 1 B 1 の発現量の測定における使用。
- [請求項7] 被検細胞におけるO A T P 1 B 1 の発現量を測定するための方法であって、

ジクロロフルオレセインを前記被検細胞と接触させる工程と、

前記被検細胞内に取り込まれたジクロロフルオレセインの蛍光強度を測定する工程と、

前記測定された蛍光強度に基づいて、前記被検細胞における O A T P 1 B 1 発現量を評価する工程と

を含む、方法。

[請求項8]

対照として O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞を用いて、被検細胞における O A T P 1 B 1 発現量を相対的に評価する、請求項 7 に記載の方法。

[請求項9]

前記陽性細胞が、O A T P 1 B 1 強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンボイチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択される、請求項 8 記載の方法。

[請求項10]

前記陽性細胞が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞である、請求項 8 記載の方法。

[請求項12]

ジクロロフルオレセインと、O A T P 1 B 1 を発現する陽性細胞とを含むキットの、被検細胞における O A T P 1 B 1 の発現量の測定における使用。

[請求項13]

前記陽性細胞が、O A T P 1 B 1 強制発現細胞、不死化ヒト肝細胞、ヒト初代培養肝細胞、ヒト遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、及びサンボイチ培養ヒト肝細胞からなる群より選択される、請求項 12 記載の使用。

[請求項14]

前記陽性細胞が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質を細胞膜に過剰発現している細胞である、請求項 12 記載の使用。

[請求項15]

前記陽性細胞が、配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA によ

って形質転換された細胞である、請求項 1 2 記載の使用。