標的絶対定量的プロテオミクスに基づく Pharmacoproteomics：国際共同研究の重要性

寺崎 哲也

Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP)-based Pharmacoproteomics:
The Importance of International Collaboration

Tetsuya Terasaki

*Membrane Transport and Drug Targeting Laboratory, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University; 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.*

(Received October 17, 2016)

Proteins such as membrane transporters, enzymes, receptors and channels play key roles in drug absorption, distribution, metabolism, and elimination, and also influence efficacy and the likelihood of adverse reactions. Therefore, if we can quantify the activities of these molecules, it may be possible to predict the behavior of candidate drugs in humans in disease states; such methodology would be extremely helpful for efficient drug development. We have developed an *in silico* method to select appropriate peptides within amino acid sequences in order to quantify targeted proteins by LC-MS/MS in selected reaction monitoring (SRM) mode. We have applied this method for the quantification of functional proteins in order to validate various *in vitro* and *in vivo* models. We found fairly good correlation between protein amounts and the enzymatic activities of microsomal cytochrome P450 (CYP) isoforms and uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) in human liver, as well as between protein amounts and the transport activities of multiple transporters in human lung cells. These results suggest that protein quantification can be useful in predicting activity. We have applied this approach to evaluate the usefulness and limitations of an immortalized human brain capillary endothelial cell line (D3 cells) and a P-glycoprotein humanized (*hMDR1*) mouse model by comparing the amounts of functional proteins in the models with those in isolated capillaries from human brain. In order to obtain sufficient human tissue specimens for further studies leading to clinical applications, we believe that international collaboration will be crucial.

Key words—pharmacoproteomics; protein quantification; targeted proteomics; blood-brain barrier

はじめに

細胞や臓器の機能はタンパク質が担っており、機能の本質の理解には、「修飾型を含むタンパク質の発現量に基づく活性の理解」は必須である。輸送担体、酵素、受容体、チャネルなどのタンパク質は薬物の輸送、代謝、排泄、効果、副作用を決定する要素であり、それらの絶対発現量やアミノ酸修飾量や細胞内局在状態や複合体形成状態などを解明することなくして、その生体内活性を予測することは不可能である (Fig. 1)。創薬科学における究極的課題の1つは病態時のヒトに薬物投与後の体内動態と薬効毒性を予測することである。リバーストランス

レーショナルリサーチの成功確率を高めるためには基礎研究と臨床研究を隔てる大きなギャップを埋める必要があり、これらの点についてオルガネラと細胞の違い、細胞と臓器の違い、動物種間の違い、加齢の違い、性の違い、各種病態時の違い、薬物投与時の違いなどを明らかにする必要がある。¹⁾

タンパク質定量用ペプチドをアミノ酸配列に基づいて *in silico* で選択することで遺伝子データベースがあるすべての生物種のタンパク質定量を実現

高速液体クロマトグラフィーを連結した三連四重極型質量分析装置は低分子化合物の高感度定量に適しており、多くの実績がある。従来のプロテオミクス研究は血漿タンパク質など水に可溶性のタンパク質が主流であり、水に難溶性の細胞膜タンパク質などの研究は後回しにされてきた。一方、膜タンパク質は種々の機能を持っており創薬科学において極めて重要であることから、私達は膜タンパク質の配列

東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: terasaki.tetsuya@m.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第136年会シンポジウム S01 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP) Based Pharmacoproteomics: Application of Protein Quantification for Drug Discovery, Development and Therapeutics

から細胞膜貫通領域を除いた部位に着目し、トリプシン消化産物の中から標的タンパク質に特異的な配列のペプチドを選択し、さらに質量分析装置で比較的強いシグナルを出す可能性が高いペプチドを選択する *in silico* 設計法を開発した.²⁾ この方法は、定量したいタンパク質がなくても定量法を確立できる長所がある。遺伝子配列のデータベースが存在するすべての動物種についてタンパク質の定量法の確立が可能になり、定量プロテオミクスの研究速度を飛躍的に加速できるようになった。詳細なプロトコルを公開しており参考願いたい。³⁾

タンパク質の活性予測には mRNA よりもタンパク質の定量が必要

ヒト肝臓ミクロゾームの CYP と UGT についてタンパク質と mRNA を定量し、その薬物代謝活性と比較したところ CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8 は mRNA とタンパクの発現量は良好な相関があったが、それ以外の酵素では相関性が低かった。さらに、ほとんどの酵素において代謝活性と発現量の間にはタンパク質の方が mRNA よりも高い相関性があった。⁴⁾ さらに最近の肺を対象とした研究によって、輸送担体タンパク質の発現量とその輸送活性の間に高い相関性があることが分かった。⁵⁾ これらの結果から、タンパク質の機能の定量的予測には当該タンパク質の発現量の測定が必須であることが示された。

タンパク質定量によって *in vitro* 実験系の有用性と限界を評価できる

In vitro 培養細胞の機能が臓器レベルをどれだけ反映しているかを評価することは重要な課題である。ヒト単離脳血管とヒト脳毛細血管不死化細胞株 (D3 cell line) について各種輸送担体タンパク質の発現量を測定し、 Na^+/K^+ ATPase の発現量に対する比で比較したところ、GLUT1, MCT1 についてほぼ両者が一致した。^{6,7)} BCRP, MDR1, Claudine 5 などでは単離血管に比べ D3 細胞の方がやや少なく、ENT1 やトランスフェリン受容体は多く発現していた。D3 細胞は大学だけでなく企業を含めて世界で最も多くの研究室で使用されているヒト *in vitro* 血液脳関門モデルであり、この結果によってその有用性と限界を定量的に評価することができた。

タンパク質定量によって遺伝子改変動物の有用性と限界を評価できる

遺伝子改変動物について当該タンパク質のみなら

寺崎哲也

1955 年富山に生まれ、金沢大学薬学部を卒業し、東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了後、東京大学助教授を経て、1996 年から東北大学教授を務める。これまで、Ebert 賞、AAPS Meritorious Manuscript 賞、紫綬褒章、日本薬学会賞、Highly Cited Researchers 2016 などを受賞し、2015 年東北大学 Distinguished Professor の称号を授与される。

Fig. 2. Unbound Drug Concentration Gradient between Brain and Blood Is Generated by Active Transport System in the Blood-Brain Barrier

ず関連タンパク質の発現変動を定量的に評価することはモデル動物の創薬研究への活用において非常に重要である。 *Mdr1a/b* (−/−) や *bcrp* (−/−) や *mdr1a/b* (−/−) *bcrp* (−/−) の gene knockout mouse は P-gp や *bcrp* の基質候補薬物について脳内移行性を *in vivo* で評価する上で有用なモデル動物である。これらのマウス脳毛細血管内皮細胞における当該タンパク質の発現量は検出限界以下であるとともに、種々の abc や *slc* transporter や受容体タンパク質の発現は正常マウスと同じであった。⁸⁾ したがって、当該タンパク質のみの役割を評価できるモデル動物であることが示された。一方、Taconic Artemis 社においてマウス *mdr1a* gene を knockout しヒト *MDR1* gene を導入した C57BL/6 humanized *MDR1* (*hMDR1*) マウスについて私達の研究室で解析したところ、脳毛細血管における *MDR1* タンパク質の発現量は 0.355 fmol/μg protein とヒト脳毛細血管における発現量 6.06 ± 1.69 fmol/μg protein に比べて 17 分の 1 と低かった。⁹⁾ さらに、驚くべきことに gene knockout したにもかかわらず *hMDR1* マウスにおける *mdr1a* の発現量は導入した *MDR1* タンパク質の 6.9 倍も多い 2.45 ± 0.19 fmol/μg protein であった。正常な C57BL/6 マウス脳毛細血管における *mdr1a* の発現量 22.3 ± 2.9 fmol/ug protein と比べると 11% が残っていたことになる。この結果は当該動物を用いた pharmacokinetic の解析結果と一致していた。したがって、*mdr1a* の knock out 方法に問題があったために輸送活性を保持したタンパク質の一部が脳毛細血管

で機能し、knock in 遺伝子のヒト *MDR1* の発現が極めて低かったためにヒト化が成功しなかったことが証明された。⁹⁾ 遺伝子改変動物に限らずモデル実験系の評価において決定的な手法であることが証明された。

タンパク質の発現量とタンパク質当たりの固有活性を測定することで *in vivo* 活性を再構築できる

臓器レベルのタンパク質の活性をその発現量とタンパク質当たりの固有活性に基づいて再構築することは動物のみならずヒトの病態時のタンパク質活性の予測において非常に重要な課題である。*Mdr1a* gene knockout mouse に 11 種類の薬物を投与後の血漿と脳中薬物濃度比を求め、同様に測定した正常 mouse での値に対する比を $K_{p, \text{brain ratio}}$ と定義した。この値は脳内非結合型薬物濃度に対する血漿中非結合型薬物濃度の比率を表し、この濃度勾配は血液脳関門における *mdr1a* の活性によって作られている (Fig. 2)。マウスの血液脳関門の実体である脳毛細血管に発現する *mdr1a* の発現量 ($C_{\text{mdr1a, B-cap}}$) と *mdr1a* 遺伝子導入培養細胞における *mdr1a* の発現量 ($C_{\text{mdr1a, cell}}$) を測定した。さらに *mdr1a* 遺伝子導入培養細胞とその宿主細胞を用いて 11 種類の薬物について apical-to-basal と basal-to-apical の各透過速度の比を測定し、遺伝子導入細胞での測定値に対する宿主細胞での測定値の比率として定義した corrected flux ratio を求めた。これらの値を次式に代入し、各薬物における $K_{p, \text{brain ratio}}$ を再構築した。

$$K_{p, \text{brain ratio}} = 1 + (\text{corrected flux ratio} - 1) \times (C_{\text{mdr1a, B-cap}} / C_{\text{mdr1a, cell}})$$

11 種類 (quinidine, loperamide, digoxin, risperidone, indinavir, dexamethasone, vinblastine, paclitaxel, verapamil, loratadine, diazepam) の薬物について、いずれも *in vivo* の値と再構築した値はほぼ一致した。¹⁰⁾ さらに、カニクイサルを用いて 6 種類 (quinidine, loperamide, indinavir, paclitaxel, verapamil, diazepam) の薬物について検討した。ただし、脳スライスを用いて定常状態における脳スライス中薬物に対するメディウム中薬物の濃度比から脳内非結合率を測定し、平衡透析法を用いて血漿非結合率を測定した。これらの値を用いてサルの血漿に対する脳内の薬物濃度比 ($K_{p, \text{brain}}$)、血漿中に対する脳内の非結合型薬物濃度比 ($K_{p, \text{uu brain}}$) について再構築したところ、実測値と一致した。¹¹⁾ この結果は霊長類であるサルにおいても *in vivo* の P-gp の活性を再構築することができたことを示す。さらに、自然発症てんかんマウス (EL mutant mouse) と pentylenetetrazole-kindled てんかんマウス、phenytoin 投与マウスについて単離した脳毛細血管中の *mdr1a* タンパク質量を測定したところ、各々 16.4 ± 0.7 , 14.8 ± 0.6 , 22.1 ± 0.6 (fmol/ μg protein) であった。正常マウスでは 11.5 ± 0.1 (fmol/ μg protein) であり、いずれも *mdr1a* が誘導されていた。各モデル動物に verapamil 投与後の $K_{p, \text{brain}}$ を測定し、*mdr1a* の活性が正常と同じであると仮定して $K_{p, \text{brain}}$ を再構築したところ、いずれも実測値と一致していた。¹²⁾ これらの結果は、正常動物だけでなく病態動物や霊長類においても *in vivo* のタンパク質の活性をタンパク質の発現量に基づいて再構築できることを証明したものである。ヒトの病態時の予測へ大きく近づいたと考えられ、リバーストランスレーショナルリサーチをさらに加速することが期待される。

おわりに

本総説で紹介した成果の一部は^{4,7-9)} 国際共同研究によって得られたものであり、日本国内でも積極的に共同研究を行っているが入手が困難な疾患組織やヒト化モデルを対象とした研究の幅を広げることができる。現在、欧米 7 カ国 14 施設と共同研究体制を構築して脳腫瘍、てんかん、アルツハイマー病などにおける pharmacoproteomics 研究を展開中である。わが国の学術成果を世界に発信し国際的プレゼンスを高めるためには世界が求める独自の研究手法

を開発し研究展開することが大切である。

利益相反 タンパク質の定量に適したペプチドを *in silico* で設計する手法に関する特許は東北大学特許として登録されており筆者は発明者の一人である。筆者が取締役を務める Proteomedix Frontiers 社は東北大学 TLO に対して当該特許実施料を支払っている。本総説で紹介したすべての成果は同社の事業と無関係に得られたものである。引用文献 5 の成果は筆頭著者が社会人博士課程学生として筆者の研究室に在籍中に得られた成果の一部である。

REFERENCES

- 1) Ohtsuki S., Uchida Y., Kubo Y., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3547–3559 (2011).
- 2) Kamiie J., Ohtsuki S., Iwase R., Ohmine K., Katsukura Y., Yanai K., Sekine Y., Uchida Y., Ito S., Terasaki T., *Pharm. Res.*, **25**, 1469–1483 (2008).
- 3) Uchida Y., Tachikawa M., Obuchi W., Hoshi Y., Tomioka Y., Ohtsuki S., Terasaki T., *Fluids Barriers CNS*, **10**, 21 (2013).
- 4) Ohtsuki S., Schaefer O., Kawakami H., Inoue T., Liehner S., Sato A., Ishiguro N., Kishimoto W., Ludwig-Schwellinger E., Ebner T., Terasaki T., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 83–92 (2012).
- 5) Sakamoto A., Suzuki S., Matsumaru T., Yamamura N., Uchida Y., Tachikawa M., Terasaki T., *J. Pharm. Sci.*, **105**, 876–883 (2016).
- 6) Uchida Y., Ohtsuki S., Katsukura Y., Ikeda C., Suzuki T., Kamiie J., Terasaki T., *J. Neurochem.*, **117**, 333–345 (2011).
- 7) Ohtsuki S., Ikeda C., Uchida Y., Sakamoto Y., Miller F., Glacial F., Decleves X., Scherrmann J. M., Couraud P. O., Kubo Y., Tachikawa M., Terasaki T., *Mol. Pharm.*, **10**, 289–296 (2013).
- 8) Agarwal S., Uchida Y., Mittapalli R. K., Sane R., Terasaki T., Elmquist W. F., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1164–1169 (2012).
- 9) Sadiq M. W., Uchida Y., Hoshi Y., Tachikawa M., Terasaki T., Hammarlund-Udenaes M., *PLoS One*, **10**, e0118638 (2015).
- 10) Uchida Y., Ohtsuki S., Kamiie J., Terasaki T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**, 579–588

-
- (2011).
- 11) Uchida Y., Wakayama K., Ohtsuki S., Chiba M., Ohe T., Ishii Y., Terasaki T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **350**, 578–588 (2014).
- 12) Uchida Y., Ohtsuki S., Terasaki T., *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1719–1726 (2014).