

論文の内容の要旨

論文題目 有機アニオン系化合物の肝取り込みに占める sodium taurocholate cotransporting polypeptide および organic anion transporting polypeptide 1 の寄与

氏名 上月裕一

近年、リード化合物創製のための combinatorial chemistry, high throughput screening 手法の必要性が唱えられ、実践されている。一方、これまで、in vitro の薬効の強さのみを指標にして医薬品の開発を進めていった場合、それらの薬物動態的特性のために開発を断念する例が続出している。こうした経験を通して、開発の早い段階で薬物動態特性の最適化の必要性が唱えられ始めている。開発初期段階における動態予測が重要と思われる対象は、消化管吸収性の予測、肝代謝の予測、胆汁及び尿排泄の予測が考えられる。このうち肝代謝に関しては、ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、ヒト P-450 発現系を用いた in vitro 代謝試験により、消化管吸収性の予測に関しては、ヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞を用いる方法により、ある程度可能となりつつある。一方、胆汁及び尿排泄の予測に関しては、現在そのスクリーニング系は検討段階にある。

胆汁及び尿排泄は、生体の異物の解毒機構として重要な役割を果たしている。一方、多くの医薬品に対し、肝、腎への取り込み、排泄過程に輸送担体の関与が報告されている。更に、肝、腎における輸送担体と医薬品動態の関わりが明らかになっている多くの事例がある。こうした輸送特性を医薬品の開発初期のスクリーニング段階で把握できれば、効率の良い開発が可能になるものと考えられる。そこで、本研究においては、胆汁排泄の最初のステップである、輸送担体を介した肝取り込み過程に焦点をおき、検討を加えた。

近年、薬物の肝取り込み機構が分子レベルで解明されつつある。有機アニオンを取り込む輸送担

体としては、Na⁺非依存性の organic anion transporting polypeptide (oatp1-3), multispecific organic anion transporter (oat2-3), Na⁺依存性の sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) の存在が知られている。更に、clone 化されたこれら輸送担体の cRNA を oocyte に injection する事により、また cDNA を哺乳類細胞に transfection する事により、これら輸送担体の基質認識特異性が明らかになりつつある。しかしながら、薬物の肝取り込みに輸送担体がどの程度寄与しているかに関する研究はほとんどなされていない。輸送担体の寄与を定量的に見積もる方法が確立されれば、医薬品開発の早い段階での薬物動態特性の最適化に向け、有用な情報を与えることができるものと考えられる。そこで本研究においては、初代培養肝細胞及び Ntcp, oatp1 発現細胞を用いて、有機アニオン系化合物の肝取り込みに占める輸送担体の寄与を見積もる方法の確立を行った。

また、医薬品開発の初期の段階において、薬物間相互作用を予測することは、臨床上の副作用を回避する上で非常に重要である。肝、腎への取り込み、排泄過程が輸送担体を介して行われる場合、輸送担体レベルでの相互作用が生じる可能性がある。しかしながら、輸送担体による相互作用の予測に関しては、未だスクリーニング系は検討段階にある。更に、医薬品開発の初期の段階においては、リード化合物及びその一連の構造類似体が候補にあげられる。従来、リード化合物の輸送に対する阻害実験により、類似構造体の輸送特性を予測する方法が提唱されてきている。この方法論は、阻害剤が必ず基質になりうる場合のみ成立するものであるが、その妥当性は実証されていない。そこで本研究においては、Ntcp 及び oatp1 発現細胞への取り込みに対する有機アニオンの阻害効果を検討し、肝細胞と比較することにより、阻害実験を基にして輸送担体の基質認識性を推定できる否か、更には、輸送担体発現細胞を用いた阻害実験から、輸送担体による薬物間相互作用を予測し得るか否かの検討を行った。

1 有機アニオン系化合物の肝取り込みに占める Ntcp の寄与

目的化合物の肝取り込みに Ntcp がどの程度寄与するかを決定するために、目的化合物及びそのほとんどが Ntcp により輸送される事が知られている taurocholate (TC) の、肝細胞及び Ntcp 発現細胞への取り込みを測定し、比較検討を行った。 R_{hep} は目的化合物の肝取り込みクリアランスを TC の肝取り込みクリアランスで除した値、 R_{cos} は発現細胞における同様の値と定義し、 R_{cos} を R_{hep} で除した値を Ntcp の寄与率とした。

最初に、Ntcp 発現細胞のキャラクタリゼーションを行った。Western blot 解析により、発現細胞における Ntcp の分子サイズは、肝臓に比べ減少が認められたが、これは糖鎖の欠落によるものと考えられた。またその発現量は、肝細胞および発現細胞においてほぼ同程度であった。TC の Na⁺依存性の取り込みに対する K_m および V_{max} は、肝細胞および Ntcp 発現細胞で良好な一致を示した ($K_m = 17.7$ vs.

17.4 μM ; $V_{\text{max}} = 1.63$ vs. 1.45 nmol/min/mg protein). これらの結果をもとに, 本発現細胞を用いて Ntcp の寄与率を見積もった. その結果, glycocholate において約 80 %, cholate (CA) において約 40 % であった. 一方, 肝細胞において少なくとも一部は Na^+ 依存性の取り込みが観察されたいくつかの有機アニオンにおいては, Ntcp の寄与はほとんどないことが示された (表 1). 以上の様に, 本方法を用いることにより, 化合物の肝取り込みに占める Ntcp の寄与を決定することができた.

表 1 有機アニオン系化合物の Na^+ 依存性の肝取り込みに占める Ntcp の寄与率

Compound	$\text{CL}_{\text{uptake}}$ (Hepatocyte) ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	R_{hep}	$\text{CL}_{\text{uptake}}$ (COS-7) ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	R_{cos}	Contribution of Ntcp (%)
TC	60.8	1.00	80.9	1.00	100
GCA	26.4	0.434	28.4	0.351	81
CA	18.0	0.296	9.30	0.115	39
BSP-SG	22.0	0.362	ND	ND	ND
E3040 sulfate	18.9	0.311	ND	ND	ND
E3040 glucuronide	3.79	0.0623	ND	ND	ND
ibuprofen	14.3	0.235	ND	ND	ND
ouabain	1.16	0.0191	ND	ND	ND

2 有機アニオン系化合物の肝取り込みに占める oatp1 の寄与

oatp1 に対しても Ntcp と同様の検討を進めた. Western blot 解析により, 発現細胞における oatp1 の分子サイズは, 肝臓に比べ減少が認められたが, これは糖鎖の欠落によるものと考えられた. またその発現量は, 肝臓の 1/7 程度であった. 17β -estradiol-d-glucuronide ($\text{E}_217\beta\text{G}$) の取り込みの K_m は, 肝細胞および発現細胞でほぼ同程度 (12.3 vs. 20.4 μM) であったが, V_{max} は発現細胞で肝細胞の 1/7 程度であった (1.30 vs. 0.175 nmol/min/mg protein). 従って, これらの結果をもとに, 本発現細胞を用いて, Ntcp と同様の方法論に基づき, $\text{E}_217\beta\text{G}$ を基準化合物とし, oatp1 の寄与率を見積もった. その結果, TC および CA で 50–60 % 以上, estrone-3-sulfate および E3040 sulfate で 20–30 % であった. 一方, 肝細胞において Na^+ 非依存性の取り込みが観察されたいくつかの有機アニオンにおいては, oatp1 の寄与はほとんどないことが示された (表 2). 以上の様に, 本方法を用いることにより, 化合物の肝取り込みに占める oatp1 の寄与を決定することができた.

3 肝細胞及び Ntcp, oatp1 発現細胞への取り込みに対する有機アニオン系化合物の阻害効果

肝細胞及び Ntcp 発現細胞による TC の取り込みは, 9 種の胆汁酸及び Ntcp の寄与はほとんどない indomethacin, BQ-123 を含む 5 種の有機アニオンにより, 両細胞系ともにほぼ同程度に濃度依存的な阻害を受け, 阻害効果は両細胞系で良好な相関を示した. 同様に, 肝細胞及び oatp1 発現細胞による $\text{E}_217\beta\text{G}$ の取り込みは, oatp1 の寄与はほとんどない BQ-123, pravastatin, indomethacin を含

表 2 有機アニオン系化合物の Na⁺非依存性の肝取り込みに占める oatp1 の寄与

Compound	CL _{uptake} (Hepatocyte) (μL/min/mg protein)	R _{hep}	CL _{uptake} (COS-7) (μL/min/mg protein)	R _{cos}	Contribution of oatp1 (%)
E ₂ 17βG	63.1	1.00	19.0	1.00	100
TC	12.8	0.203	2.33	0.123	60
CA	39.8	0.631	6.24	0.329	52
Estrone-3-sulfate	77.7	1.23	6.30	0.332	27
E3040 sulfate	29.1	0.461	1.80	0.0947	21
E3040 glucuronide	5.61	0.0889	ND	ND	ND
ibuprofen	24.5	0.388	ND	ND	ND
pravastatin	6.20	0.0983	ND	ND	ND
ouabain	2.80	0.0444	ND	ND	ND
DNP-SG	1.30	0.0206	ND	ND	ND

む 15 種の有機アニオンにより、両細胞系ともにほぼ同程度に濃度依存的な阻害をうけ、阻害効果は良好な相関を示した。以上より、Ntcp, oatp1 の基質とはならないいくつかの化合物においても、これら輸送担体による取り込みを肝細胞と同程度に阻害し、阻害実験を基に輸送担体の基質認識性を推定できないことが明らかとなった。一方、肝細胞及び発現細胞において同程度の阻害が認められたことから、輸送担体発現細胞を用いた阻害実験から、輸送担体による薬物間相互作用を予測し得るものと考えられた。

【結論】

初代培養肝細胞及び Ntcp, oatp1 発現細胞を用いて、目的化合物と基準化合物の輸送速度を比較する事により、肝取り込みに占める各輸送担体の寄与率を見積もる方法を提唱し、有機アニオン系化合物を用いて実践した。本方法は、医薬品の肝取り込みに占める寄与率を決定できる有用な方法であるものと考えられる。

また、Ntcp あるいは oatp1 の基質とはならないいくつかの化合物においても、これら輸送担体による取り込みを肝細胞と同程度に阻害し、阻害実験を基に輸送担体の基質認識性を推定できないことが明らかとなった。一方、肝細胞及び発現細胞において同程度の阻害が認められたことから、輸送担体発現細胞を用いた阻害実験から、輸送担体による薬物間相互作用を予測しうる事が示された。

以上、本研究により、医薬品開発の初期段階での薬物動態特性の至適化に向け、有用な知見を与えることができた。