

審査の結果の要旨

氏名 上月 裕一

近年、薬理活性のみならず薬物動態学的特性の優れた化合物を医薬品開発初期のスクリーニング段階でピックアップしようとする high throughput screening の動きが高まってきている。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にも関わらず、現在そのスクリーニング系は未だ確立していない。そこで本研究においては、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、初代培養肝細胞および 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検討がなされた。併せて、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について検討された。

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

Ntcp を発現させた COS-7 細胞、および初代培養ラット肝細胞への有機アニオンの取り込みを比較することにより、肝取り込みに占める Ntcp の寄与率を、taurocholate (TC) を基準化合物として規格化することにより決定した。最初に、Ntcp 発現細胞の性質が調べられた。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. $17.4 \mu\text{M}$; $V_{max} = 1.63$ vs. $1.45 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg protein}$)。従って、Ntcp の糖鎖は、輸送担体の親和性および輸送活性に影響を及ぼさないことが示唆された。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系化合物 (BSP-SG, E3040 glucuronide, E3040 sulfate, ibuprofen, ouabain) の肝取り込みにおいては, Ntcp の寄与はほとんどないことが示された。

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 17 β -estradiol-d-glucuronide (E₂17 β G) を基準化合物とし, Ntcp と同様の検討がなされた。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。E₂17 β 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 μ M) 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, oatp1 の糖鎖は, 輸送担体の親和性および輸送活性に影響を及ぼさないことが示唆された。これらの結果をもとに, 本発現細胞を用いて 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系化合物 (ibuprofen, pravastatin, ouabain, DNP-SG, E3040 glucuronide) の肝取り込みにおいては, oatp1 の寄与はほとんどないことが示された。

以上示した方法論が肝臓に発現している主要な輸送担体の全てに対して適用されるならば, 当該化合物の肝取り込みに種々の輸送担体の寄与を決定することが可能になるとと思われる。

3. 肝細胞および 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

Ntcp および oatp1 を発現させた COS-7 細胞を用いて, それぞれの代表的基質である TC, E₂17 β G の取り込みに対する有機アニオン (胆汁酸を含む) の阻害効果を検討し, 肝細胞と比較した。その結果, 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 E₂17 β G の取り込みは, oatp1 の寄与はほとんどない BQ-123, pravastatin, indomethacin を含む 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受け, 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。

以上より、初代培養肝細胞および 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する事が示された。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最適化に向け、有用な知見を与えることができ、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと考えられた。