

論文内容の要旨

論文題目 抱合体代謝物の肝臓、腎臓および小腸における排泄機構

氏名 後藤 康雅

【序論】

薬物の胆汁中への能動的排泄に関与する輸送担体として P-糖蛋白質 (P-gp) や Mrp2 などが知られている。P-gp は肝、脳や小腸に発現し主に中性および陽性薬物の細胞外への排出に機能している。一方で Mrp2 については、肝、腎および十二指腸に多く発現していることが明らかになっているが、肝以外の臓器における機能は不明である。Mrp2 はグルチオン抱合体、グルコン酸抱合体および多くの有機アニオン系化合物を基質として認識することが知られている。

私の研究は、肝、腎および小腸において有機アニオン系化合物の排出における Mrp2 の寄与を明らかにするため、Mrp2 を遺伝的に欠損した EHBR と SD 系正常ラット(以後 SD)を用いて *in vivo* および *in vitro* 実験により解析することを目的とし、その基質としてエストジオールグルチオン (E₂-17βG) およびジニトロベンゼングルチオン抱合体 (DNP-SG) を用いて検討した。

【本論】

1 肝臓における E₂-17βG および DNP-SG の排泄機構

Vore 等は、胆管側膜ベシクル(CMV)を用いた種々の検討から E₂-17βG の胆汁排泄に P-gp が寄与することを示唆した。これに対し E₂-17βG が Mrp2 の基質になるという別の知見もあり、胆汁排泄におけるこれらの寄与率について定量的な評価を試みた。既に CMV を用いた有

機7=カ類の ATP 依存性輸送から胆汁排泄能力を評価できることが示唆されていることから、SD と EHBR の CMV を用いて $[^3\text{H}]-E_2-17\beta\text{G}$ の取り込みを調べた。SD では ATP 依存性な取り込みが観察され、EHBR ではこれは観察されなかったことから、 $E_2-17\beta\text{G}$ の CMV への取り込みには Mrp2 が寄与していることを確認できた。SD の $E_2-17\beta\text{G}$ の ATP 依存性な取り込みを速度論解析した結果、 K_m 6.3 μM 、 V_{max} 81 pmol/min/mg protein の飽和性輸送であることが示唆された。P-gp の寄与率を評価するためその阻害剤 PSC-833 およびベラパミルによる $[^3\text{H}]-E_2-17\beta\text{G}$ の ATP 依存性な取り込みに対する阻害を検討したところ、それぞれ P-gp の阻害に十分と思われる 5 μM および 100 μM まで影響を与えなかった。この事は $E_2-17\beta\text{G}$ の輸送への P-gp の寄与は小さいことを示唆した。P-gp の寄与を *in vivo* でも検証するため低投与量または胆汁うっ滞誘起量の $[^3\text{H}]-E_2-17\beta\text{G}$ を静注後の胆汁排泄クリアランス ($CL_{bile,p}$) を求めた。SD において高投与量になると $CL_{bile,p}$ に飽和が見られ、胆汁排泄能が低下していることを示した。一方、EHBR では低投与量および高投与量ともに SD に比べて $CL_{bile,p}$ は低下した。また、PSC-833 を同時に投与した場合でも SD の $CL_{bile,p}$ に影響は見られなかった。

以上より、 $E_2-17\beta\text{G}$ の胆汁排泄における P-gp の寄与率は小さく、 $E_2-17\beta\text{G}$ は主に Mrp2 を介して排泄されることが明かとなった。

肝臓における Mrp2 の寄与について、DNP-SG とその逐次代謝物について調べた。種々の検討を行った結果、DNP-SG も主に Mrp2 によって排泄され、その逐次代謝物の一部も Mrp2 に親和性のあることが示唆された。

2 小腸における DNP-SG の排泄機構

小腸にも Mrp2 の発現が示唆されていたが、薬物の輸送に Mrp2 がどの程度寄与しているかについては全く不明であった。そこで CDNB を静注後、消化管内に排泄される DNP-SG を検討したところ、SD と EHBR で顕著な差が観察された。DNP-SG の小腸排泄クリアランス ($CL_{perfusate,p}$) を求めたところ、 $CL_{bile,p}$ と同様に SD と EHBR で有意な差が見られ、EHBR は SD ラットに比べ約 1/5 に低下した。Mrp2 の関与をさらに裏付けるため、ラット十二指腸、空腸、回腸、結腸の反転腸管法を用い各部位毎の透過クリアランスを算出し SD と EHBR を比較したところ、十二指腸および空腸において両種間に差が確認された。各部位における Mrp2 の mRNA は SD の十二指腸および空腸にて高く、EHBR でこれらが 1/10 以下に減少していた。これら Mrp2 の発現部位は、反転腸管において EHBR で DNP-SG の輸送低下の見られた部位と対応した。方向性のある輸送を評価する目的で空腸における輸送の方向性を Ussing chamber を用い検討したところ、SD では漿膜側から粘膜側への輸送が逆方向に比べ約 1.5 倍高いこと、また漿膜側から粘膜側への輸送は、SD の方が EHBR よりも約 2 倍高いことが観察された。ATP 枯渇剤は粘膜側から漿膜側への排泄には影響を与えないのに対し、漿膜側から粘膜側への排泄はコントロールに比べ約 1/2 に低下させ、DNP-SG がエネルギー依存性な輸送によって排泄されることを示唆した。

以上の結果より、ラット小腸においても胆汁排泄と同様に Mrp2 が DNP-SG の消化管上皮細胞から管腔側への排泄に機能していることが示された。

3 腎臓における $E_2-17\beta G$ および DNP-SG の排泄機構

CDNB を静注後の DNP-SG の尿排泄クリアランス ($CL_{urine,p}$) は、絶対値も低く、ばらつきが大きかった。

腎臓における Mrp2 の寄与について種々検討している際に、雌ラットを用いることにより $E_2-17\beta G$ の尿中排泄が大きく上昇することがわかった。そこで雌ラットを用いた定常状態試験により Mrp2 の関与を検討したところ、 $CL_{bile,p}$ は SD と EHBR で明確な差が観察され、胆汁排泄における Mrp2 の関与が確認できたが、 $CL_{urine,p}$ には両ラットで差はなかった。このことより、腎排泄における Mrp2 の役割はマイナーなものであると考えられた。一方、雌に比べて雄の $CL_{urine,p}$ は両種ともに非常に小さく、顕著な性差があることが明らかになった。

雄および雌 SD に [3H]- $E_2-17\beta G$ を静注後の胆汁排泄において、若干の性差は見られたが、尿排泄は雌が雄に比べてはるかに大きく顕著な性差が認められた。 $CL_{urine,p}$ は、雌が雄より少なくとも 250 倍以上高かった。一方、糸球体ろ過能 GFR や血漿非結合型分率 f_u には、ほとんど性差は認められなかった。 $f_u \cdot GFR$ は、雌で $CL_{urine,p}$ に近い一方、雄ではそれよりはるかに小さく、雄に再吸収が起こっていることを示唆した。以上の速度論的解析により尿細管再吸収機構の存在が強く示唆されたが、一方で、この $CL_{urine,p}$ の性差が血液側からの腎上皮細胞への取り込みに起因する可能性も考えられたので、*in vivo* で血液側からの初期取り込みを測定した。積分プロットの傾き（組織取り込みクリアランスに相当）は、腎臓をはじめ他臓器でも性差が認められず、取り込み過程の性差ではないと考えられた。再吸収が関与すれば、 $CL_{urine,p}$ の小さい雄ラットで再吸収能力が大きく、雌ラットで小さいことになる。また、 $E_2-17\beta G$ が有機アニオンで水溶性が高いことを考えると受動輸送により再吸収が生じるとは考えにくく、トランスポーターによる再吸収が考えられる。そこで、有機アニオン系トランスポーターの阻害剤である DBSP を用い、再吸収を阻害することを試みた。DBSP 併用による $CL_{bile,p}$ の低下は、血管側膜に発現する Oatp1 による肝取り込み、Mrp2 による胆汁排泄の阻害と考えられた。一方、 $CL_{urine,p}$ は、DBSP 存在下で雄だけが上昇し、尿排泄性差が消失した。このことから $E_2-17\beta G$ の尿排泄性差は DBSP によって阻害される、再吸収方向のトランスポーターに起因すると考えた。ただし、代謝の性差の懸念から尿中放射活性を TLC 解析したところ、 $E_2-17\beta G$ 以外の放射活性は低く、代謝の性差や DBSP による影響は認められなかった。 $E_2-17\beta G$ の代謝酵素として β グルクロニダーゼが考えられ、この阻害剤 SA1, 4L を 4 時間前から持続注入し、 $E_2-17\beta G$ を同時投与した。定常状態 $CL_{urine,p}$ は SA1, 4L が入っても雄で依然検出限界以下であり、この時の腎臓ホモジネート中 β グルクロニダーゼ活性は SA1, 4L 処理ラット腎臓で顕著に低下し、阻害剤の効果が認められた。一方で DBSP は活性を阻害しなかった。従って、 $E_2-17\beta G$ の代謝では腎クリアランスの性差を説明できないことがわかった。以上より雄のみに再吸収過程にトランスポーターが存在し、その結果、雄で再吸収が進み、雌では再吸収がない分、尿中排泄が大きいという仮説が成り立つ。腎臓では管腔側に発現することが知られる Oatp1 の発現を調べたところ、肝では雄と雌、SD と EHBR の差は認められず、腎では雄に比べ雌の発現は非常に少ないことを確認することができた。また、去勢雄ラットで Oatp1 が減少し、雌にテストステロンを 1 週間投与することにより Oatp1 の発現上昇が見られた。以上の結果は、Oatp1 の発現が性ホルモンにより調節されていることを示した。次に $E_2-17\beta G$ の腎クリアランスの変動を検討したところ、 $CL_{bile,p}$ に影響はなかったものの、 $CL_{urine,p}$ において、雄去勢

モデルで顕著に上昇し、雌とほぼ同等のレベルにまで上昇した。逆に雌にテストステロンを投与した場合、 $CL_{bile,p}$ に影響がなかったものの、 $CL_{urine,p}$ はテストステロン投与群で顕著な減少が見られ、雄のコントロールと同様、検出限界以下のレベルにまで低下した。以上、Oatp1 の腎における発現レベルと $E_2-17\beta G$ の腎クリアランスがリバーサルに変動することがわかり、再吸収における Oatp1 の関与が強く示唆された。これまで得られた実験データを、再吸収過程の性差だけで説明可能かを検証するために数学モデルに基づいた解析を行った。血液中の $E_2-17\beta G$ は糸球体濾過を受け、尿細管における分泌 PS1、再吸収 PS2 を受け排泄される。本モデルを用い、PS1 および反発計数 ρ を固定し、種々の PS2 における腎クリアランスを尿流速の関数として計算し、これまでに得られた雌のコントロール、DBSP 共存下の雌雄、マニトール利尿時の雌の値をプロットした。雄コントロールおよびマニトール利尿時の腎クリアランスの結果は定量限界以下となりプロットされていない。PS1 を 10mL/min/kg、 ρ を 0.99 に固定して、PS2 が 1mL/min/kg の時に、雌におけるコントロール、DBSP 阻害、マニトール利尿の結果をすべて説明することができた。この条件で、Oatp1 による再吸収クリアランスを表す PS2 を雌より 200 倍以上高くすると、腎クリアランスは検出限界以下にまで下がること、また、雄に DBSP を投与した場合、PS2 のみが低下すると考え、雌レベルにまで腎クリアランスが上昇することも simulation することができた。

【結論】

肝、腎および小腸における $E_2-17\beta G$ および DNP-SG の排泄機構を検討したところ、 $E_2-17\beta G$ の胆汁排泄機構について、P-gp の寄与は小さく、主に Mrp2 により排泄されることを明らかにした。また、DNP-SG を用いた検討から Mrp2 が小腸(特に空腸)においても排泄トランスポーターとして働くことを明らかにした。腎においてはこれら化合物の排泄に Mrp2 の寄与は小さいこと、一方で Oatp1 が再吸収トランスポーターとして雄ラットで機能し、その結果、 $E_2-17\beta G$ の排泄に顕著な性差が認められることを示唆した。従って、DBSP のような Oatp1 の阻害剤を用いて再吸収を阻害すれば、尿排泄を大きく上昇させることが可能であることを示唆した。腎排泄において、Mrp2 の寄与を積極的に支持する結果は得られなかったが、薬の種類によっては、Mrp2 の関与の可能性は充分あり今後の研究が必要と考えられる。

小腸において Mrp2 が排泄トランスポーターとして働き得ることは、薬物のバイオアベイラビリティに Mrp2 が関与する可能性を示唆し、また、肝では取り込みトランスポーターとして働く Oatp1 が、腎では再吸収のトランスポーターとして働き、かつその発現および再吸収能が性ホルモンの支配下にあることが明らかとなった。これらの知見は今後の医薬品開発に重要な知見を与える情報であると考えている。