

## 審査の結果の要旨

氏名 後藤 康 雅

薬物の胆汁中への能動的排泄に関与する輸送担体の一つ Mrp2 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 はグルタチオン抱合体、グルタ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。本研究は肝、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 *in vivo* および *in vitro* 実験により明らかにすることを目的とし、その基質として Estradiol- $17\beta$ -G (E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G) および ジニトロベンゾグルタチオン抱合体 (DNP-SG) を用いて検討した。

### 1 肝臓における E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G および DNP-SG の排泄機構

Vore 等は、胆管側膜<sup>+</sup>シム(CMV)を用いた種々の検討から E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G 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 E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G 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。SD と EHBR の CMV を用いて [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G の取り込みを調べたところ、SD では ATP 依存的な取り込みが観察されたが、EHBR ではこれは観察されなかったことから、E<sub>2</sub>-17 $\beta$ 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。P-gp の阻害剤による [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G の ATP 依存的な取り込みに対する影響を検討したところ、その阻害の程度から E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G の輸送に対し 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 [<sup>3</sup>H]-E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G を静注後の胆汁排泄クリアランス (CL<sub>bile,p</sub>) を求めた。SD において高投与量になると CL<sub>bile,p</sub> 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<sub>bile,p</sub> は低下した。また、PSC-833 を同時に投与した場合でも SD の CL<sub>bile,p</sub> に影響は見られなかった。

以上より、E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G の胆汁排泄における P-gp の寄与率は小さく、E<sub>2</sub>-17 $\beta$ G は主に Mrp2 を介して排泄されることが明かとなった。

### 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<sub>perfusate,p</sub>) を求めたところ、CL<sub>bile,p</sub> 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-依存的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

$E_2$ -17 $\beta$ G の腎における Mrp2 の関与を検討したところ、胆汁排泄における Mrp2 の関与は確認できたが、腎排泄における Mrp2 の役割は不明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 [ $^3$ H]- $E_2$ -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、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。また、積分プロットから取り込み過程の性差はないと考えられた。DBSP 併用による  $CL_{urine,p}$  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 によって阻害されうる、再吸収方向のトランスポートに起因すると考えた。また、 $E_2$ -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もわかった。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互い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。分泌クリアランス PS1、反発計数  $\rho$  を固定して、再吸収クリアランス PS2 が 1mL/min/kg の時に、雌におけるコントロール、DBSP 阻害、マンニトール利尿の結果をすべて説明することができた。さらに PS2 を 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、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。

以上、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ト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ト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ト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トとして働く Oatp1 が、腎では再吸収のトランスポートとして働き、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られ、体内動態特性の優れた薬物開発に貢献できる事を提起しており、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。