

## 審査結果の要旨

氏名 廣内 幹和

肝臓に取り込まれた薬物は代謝酵素、抱合酵素によって解毒代謝を受け、循環血中、あるいは胆汁中へと排泄される。肝臓の実細胞である肝細胞の血管側膜には生体異物の取り込みに働くトランスポーターである OATP1B1 や OATP1B3、OAT2、OCT1 が、胆管側膜には胆汁中への排泄に働く ABC トランスポーター、MDR1、BCRP、MRP2 が発現しており、肝細胞における異物排泄メカニズムとして重要な役割を担っている。一方、血管側膜における排出過程も、薬物の血中からの消失の律速段階を規定する重要な要因であるが、この過程におけるトランスポーターに関する知見はほとんど得られていなかった。近年、肝細胞の血管側膜には ABC トランスポーターである MRP3、MRP4 が発現していることが示された。MRP3 は、グルクロン酸抱合体を含む種々有機アニオン系薬物や一価の胆汁酸などを良好な基質とする。ラットでは胆汁うっ滞時において発現が誘導されることから、胆汁うっ滞時に胆汁中に排泄できない胆汁酸や生体異物を循環血中に排泄することで、肝臓への蓄積を防ぐ生体防御機構の一つと考えられていた。しかし、マウスやヒトにおいては、MRP3 は恒常的に肝血管側膜に高発現していることが明らかとされ、正常時においても血液中への異物排泄を行っていると考えられる。MRP4 は抗ウイルス薬などの核酸アナログをはじめとする種々有機アニオン類や胆汁酸などを良好な基質とする。また、重度の胆汁うっ滞を主症状とする進行性家族性肝内胆汁うっ滞 (PFIC) 患者の肝臓で MRP4 の発現が誘導されることから、生理的に MRP4 は、MRP3 とともに血管側への胆汁酸の排泄トランスポーターとして機能すると考えられている。これまで肝胆系輸送機構の *in vitro* 評価系として、取り込み側トランスポーター OATP1B1、排泄側トランスポーター MRP2 を極性細胞である MDCK II 細胞のそれぞれ basal 側、apical 側に同時に発現させた double transfectant が構築されている。この *in vitro* モデルは MRP3、MRP4 をはじめとした肝臓から循環血中への排出を考慮していない。そこで本研究において、肝血管側膜に発現する MRP3、MRP4 について、肝血管側膜における排出輸送を評価できる *in vitro* 評価系を目指して研究が行われた。次に、この評価系と *in vivo* との対応を明らかにするために、Mrp3 (-/-) マウスを用いた *in vivo* 実験が行われた。

### 1. OATP1B1/MRP2 double transfectant に MRP3 および MRP4 を発現させた triple transfectant の構築とその機能評価

MRP3、MRP4 による有機アニオンの肝臓中から循環血中への排出を評価する *in vitro* モデルとして、double transfectant に recombinant adenovirus を感染させ、MRP3 または MRP4 を発現させた triple transfectant が構築された。MRP3、MRP4 はともに basal 膜に局在し、MDCK II 細胞に発現させた全てのトランスポーターが肝細胞と同じ膜局在を示す発現系が得られた。本細胞を用いて、種々化合物

の経細胞輸送が測定された。グルクロン酸抱合体である E<sub>2</sub>17βG, E3040G, TGZ-G、抗癌剤である SN38, MTX, ACE 阻害薬である temocaprilat、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pravastatin, pitavastatin は、double transfectant においては vector 細胞と比較して、有意に大きな basal apical への経細胞輸送が観察された。E<sub>2</sub>17βG, E3040G, TGZ-G, MTX, SN38, temocaprilat は、MRP3 triple transfectant において、basal apical への方向性輸送が double transfectant と比較して有意に低下していることが示された。SN38 を除く全ての化合物について、MRP2 発現膜ベシクルと MRP3 発現膜ベシクルでの ATP 依存的な取り込みが確認され、MRP3 の方がより高い輸送活性を示した。また、E<sub>2</sub>17βG, SN38, MTX は MRP4 triple transfectant において、basal apical への方向性輸送が double transfectant と比較して有意に低下しており、全ての化合物で MRP2 発現膜ベシクルと MRP4 発現膜ベシクルでの ATP 依存的な取り込みが確認され、MRP4 の方がより高い輸送活性を示した。一方、例えば、E3040G や TGZ-G は MRP4 の基質となるにも関わらず、MRP4 の triple transfectant において basal apical への方向性輸送が double transfectant と同程度であった。すなわち、ベシクル実験により MRP3 や MRP4 の基質となった場合でも、apical 側の MRP2 との相対的輸送活性により、triple transfectant における方向性輸送の変動を説明できることが示された。これらのことから、triple transfectant が MRP3 および MRP4 の肝臓中から循環血中への排出を考慮に入れた *in vivo* 胆汁排泄能を評価できる *in vitro* 実験系となりうることが示唆された。

## 2. MRP3, MRP4 の肝臓から循環血中への排出の関与

MRP3 triple transfectant において MRP3 による basal 側からの排出の関与がみられた MTX や種々グルクロン酸抱合体をはじめとするいくつかの有機アニオンについて、*in vivo* においても Mrp3 が肝臓から循環血中への排泄に関与しているかを明らかにすることを目的として、Mrp3 (-/-)マウスを用いた *in vivo* 実験が行われた。

MRP3 triple transfectant において方向性輸送の低下がみられた化合物は temocaprilat を除いて、Mrp3 (-/-)マウスにおいて血漿中濃度が低下している傾向がみられた。temocaprilat は MRP3 の triple transfectant においては最も方向性輸送の低下率が低かった化合物であり、MRP3 triple transfectant における MRP3 が、実際の *in vivo* における Mrp3 の発現量と比較し、過剰に発現しているために、*in vitro* 系においては差が見えている可能性も考えられる。また、pravastatin は triple transfectant 評価系において、方向性輸送の低下に有意差が確認できず、*in vivo* においても Mrp3 (-/-)マウスでの血中濃度の低下は観察されなかった。

ヒト肝サンプルから細胞膜画分を調製し、ヒト肝細胞膜における MRP3, MRP4 の蛋白発現量と triple transfectant における MRP3, MRP4 の蛋白発現量を Western blot 法により比較した。MRP3 についてはヒト肝サンプルと triple transfectant の band 密度がほぼ同程度であったのに対し、MRP4 については triple transfectant と比べ、ヒト肝サンプルの band 密度が著しく低かった (Fig. 5)。MRP4 triple

transfectant では basal apical への方向性輸送が低下する基質化合物が複数見つかったが、triple transfectant では *in vivo* と比較し、過剰に発現しているため、*in vivo* における寄与率は *in vitro* から予測されるよりも低いことが予想される。

以上本研究では、MDCK II 細胞を宿主細胞として、肝取り込みトランスポーター (OATP1B1)、肝胆管側排泄トランスポーター (MRP2)、肝血管側排泄トランスポーター (MRP3) を発現させた triple transfectant が構築された。*in vitro* 系の MRP3 triple transfectant において basal apical 方向の経細胞輸送が、double transfectant に比べて有意な減少が見られた化合物については、Mrp3 (-/-) マウスで低い血漿中濃度が示され、*in vivo* においても Mrp3 が肝臓から血液中への排出トランスポーターとして重要な役割をしている事が確認された。本系は、これまで困難であった、薬物の肝臓から血管側への排出輸送を評価できる *in vitro* モデル系となるものと考えられる。また、種々グルクロン酸抱合体だけでなく、MTX のような有機アニオン系薬物においても、肝臓から循環血中への排泄に Mrp3 が大きく関わっていることが明らかとなった。薬物やその代謝物の体内動態、およびそれらの肝腎振り分け機構についての重要な知見を与えるものであると考えられる。更に、肝血管側の排出クリアランスを *in vivo* で評価し、*in vitro* と *in vivo* の相関を定量的に補正していくことで、より精密な予測が *in vitro* 輸送実験から可能になるものと考えられる。

同様に、MRP4 triple transfectant が構築された。MRP4 triple transfectant において、basal apical 方向の経細胞輸送の低下が観察される化合物も見出された。しかし、正常時の肝臓の Mrp4 における有機アニオン類の肝臓から循環血中への排出の関与は小さいと考えられた。胆汁うっ滞など病態時では、MRP3 や MRP4 の肝血管側膜での発現誘導が起こることが報告されており、MRP3 や正常時には寄与が小さかった MRP4 の機能がさらに重要になってくる可能性も考えられる。

以上のように、本研究では、肝血管側膜に発現するトランスポーター MRP3、MRP4 の機能解析を可能とする *in vitro* モデルを構築し、さらに、Mrp3 が種々グルクロン酸抱合体だけでなく、MTX のような有機アニオン系薬物の体内動態にも影響を与えることを明らかとした。現在までに肝血管側膜を介した薬物の肝臓から血中への排出についての詳細な研究はほとんどないことから、本研究は、肝血管側膜に発現するトランスポーターの体内動態における重要性を示した大変興味深い研究であり、また構築された *in vitro* モデル系はそのようなトランスポーターの機能解析を容易に可能とする新たなモデル系であると考えられ、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。