

論文の内容の要旨

論文題目 創薬を目指した ABC トランスポーター輸送能評価に関する検討

氏 名 安 達 弥 永

【序論】ATP binding cassette (以下 ABC) トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを駆動力として、広範囲に及ぶ基質を細胞内から細胞外に輸送する膜タンパクである。現在、ヒトにおいては 49 種の isozyme が同定されており、トランスポーターとしては最大の super family を形成している。さらにこれらは配列、構造上の特徴から 7 つの subfamily に分類されている(ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG)。いくつかの ABC トランスポーターは遺伝子疾患の責任因子であることも示されている。

この ABC トランスポーターに関する研究は、ガンにおける多剤耐性因子としての研究に端を発している。すなわち、癌化学療法時に抗癌剤に対する耐性を獲得した細胞には、抗癌剤を排出するトランスポーターが過剰発現しており、この排出作用により細胞内の抗癌剤濃度が低下することが知られていた。株化細胞を用いた研究により、このような排出作用を示す ABC トランスポーターとしてはじめて同定されたのが Multidrug resistance 1 (P-glycoprotein /ABCB1/MDR1) である。次いで、Multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1/MRP1) なる ABC トランスポーターが同定され、現在では、8 種の MRP サブファミリーの存在が明らかにされている。さらに、最近では、MDR, MRP との基質認識性が若干異なる多剤耐性トランスポーター (ABCG2/BCRP) も同定され、機能解析が行われている。その後の研究により、耐性に関与する主な ABC トランスポーターである MDR1, MRP2 及び BCRP は通常の組織にも発現していることが示され、毒性を引き起こす可能性のある外因性物質から、生体を防御する機能を有していると考えられている。

薬物は、その薬効を発現するために標的となる臓器に到達（分布）する必要があるが、容易に薬物が臓器に移行しないようABCトランスポーターによって制限されているとも考えられ、医薬品開発においては、時に障害となる場合がある。

本研究では、薬物の膜透過性の制御に関わっており、薬物動態への関与が大きいと考えられるABCトランスポーターとして、第一にMDR1、次いでMRP2並びにBCRPに焦点をあてた。その上で、「それらが脳と小腸においてどのような機能を有し、その輸送能力は*in vitro*から予測できるのか？」という観点から、ABCトランスポーター輸送能力評価方法の創薬へ応用すべく本研究を行った。

【本論】第一章 薬物の脳移行性におけるMDR1輸送能の評価について

MDR1は薬物の体内動態に深く関与することが知られており、この輸送能力を定量的に理解することは、医薬品の開発とその適正使用に重要であると考えられる。本研究では、*in vitro*実験から見積もられたMDR1の輸送能力から*in vivo*での薬物脳移行性におけるMDR1の関与が外挿出来るか否か、検討を行った。

*In vitro*実験として、12化合物を用いて、MDR1発現細胞とCaco-2細胞の単層膜を介した経細胞輸送実験を行った。また、この12化合物が、ATPの加水分解速度を亢進させるかどうか、MDR1を発現したplasma membraneを用いて検討した。すなわち薬物の輸送とカップルしているATPの加水分解を薬物輸送の指標とした。他方、*in vivo*実験としては、mdr1a/1bノックアウトマウスとコントロールマウスにおける脳対血漿中濃度比(K_p, brain)を求めた。その結果、*in vitro*でのMDR1発現細胞単層膜を介した経細胞輸送実験で算出したflux ratioと*in vivo*実験から求めた $K_p, \text{brain ratio}$ の間には良好な相関関係が見出された。ここで、flux ratioは、MDR1発現細胞におけるapicalからbasalへのfluxをその逆向きへのfluxで除した比と定義した。しかしながら、ATPの加水分解を促進した化合物はMDR1による輸送が確認されたものの、ATPの加水分解を示さないいくつかの化合物でも、MDR1発現細胞を用いた実験ではMDR1により輸送されるという矛盾点も見出された。

結論として、MDR1発現細胞を用いて求めた*in vitro* flux ratioは、*in vivo*でのMDR1輸送能を予測できるパラメーターであることが示された。また、ATP加水分解を指標した*in vitro*実験は、MDR1の基質を開発化合物群から除くためのスクリーニングに用いることが可能であると考えられた。

第二章 薬物の消化管吸収におけるMDR1輸送能の評価について

MDR1の基質となる薬物が経口投与された場合、消化管においてMDR1により排出を受けることにより、吸収性に個人差が生じたり、MDR1阻害剤との同時併用による吸収性が変化する可能性がある。したがって、消化管におけるMDR1の輸送能を評価することは、経口薬物の開発において、重要であると考えられている。本研究では、第一章に続き、消化管でのMDR1輸送能が、*in vitro*実験より評価可能であるか否か検討した。

消化管における MDR1 の輸送能を評価するために、12 のテスト化合物を用いて、マウス *in situ* 小腸灌流実験を行い、*mdr1* ノックアウトマウスならびに正常マウスの permeability surface area (PS) product を算出した。また、この小腸での *mdr1* 輸送能が *in vitro* 実験から予測できるかどうか検討するため、MDR1 発現 LLC-PK1 細胞ならびにコントロール細胞 (LLC-PK1) を経細胞輸送実験を行った。

In situ 小腸灌流実験の結果、*mdr1* の影響によって PS product が変化することが明らかとなった。その影響の受けやすさは以下の順であった。

Quinidine > ritonavir > loperamide, verapamil, daunomycin > digoxin, cyclosporine A > dexamethasone, vinbrastine

また、小腸での *mdr1* 輸送能は、*in vitro* 実験から見積もった MDR1 輸送能と有意な相関関係にあることが示された。

以上の結果より、*in vivo* での消化管吸収における MDR1 の関与は、MDR1 発現細胞を用いた *in vitro* 経細胞輸送実験から定量的に予測しうることを示された。このような評価方法は、ヒト小腸における MDR1 の発現量の個体間差に基づく吸収性の変動や多剤併用時に吸収性がどの程度変動しうるかを予測するためのツールとして、医薬品開発に適用できる可能性が示された。

第一章と第二章の検討から、*in vitro* における MDR1 の輸送能力は以下の式で定義でき、これらのパラメーターが *in vivo* における MDR1 の輸送能力と比較すべきであることを理論的に示した。

$$\text{in vitro index} = 1 + \frac{PS_{P-gp}}{PS_{\text{non } P-gp}}$$

この式から明らかなように、第二項目の分母は、複雑な透過過程の存在により大きくなることが予測される。したがって、小腸のように複数のトランスポーターが存在しているような臓器においては、*in vitro* と *in vivo* 間の相関性が低くなるものと考察できる。

第三章 抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターの解析

本研究では、小腸においてグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を管腔側に排出するトランスポーターの重要性を調べるために、遺伝的に *mnp2* を欠損した Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) と breast cancer resistance protein (Bcrp1 / Abcg2) ノックアウトマウスを用いた小腸灌流実験を行った。

EHBR 及び Bcrp1 ノックアウトマウスの空腸を、4-methylumbelliferone (4MU) 及び 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) を含む灌流液で灌流し、outflow 中の代謝物濃度から、各化合物のグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の efflux rate を算出した。

EHBR を用いた検討では、正常ラットに比べ E-3040-G の efflux rate が有意に低下したものと

の, E3040-S, 4-MU-G 及び 4-MU-S の efflux rate には, 有意差は認められなかった。また, bcrp1 ノックアウトマウスを用いた検討では, E3040-G, 4-MU-G 及び 4-MU-S の efflux rate が有意に低下した。

結論として, bcrp1 は, グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の排出に, より重要な機能を有していることが明らかとなった。これらの現象は, 小腸での抱合代謝酵素と排出トランスポーターの協調的な異物排出作用と捉えることが可能であり, 消化管での吸収性に影響を与える重要な ABC トランスポーターの機能を同定できたものと考えている。

以上, 一連の研究の中で, pharmacokinetics 理論に基づくモデル化を行い, ABC トランスポーターによる輸送現象を理論的に整理した。その結果, 本研究で構築した MDR1 輸送能力の予測, 消化管での MRP2 や BCRP の機能解析などの方法論は, 中枢をターゲットとした薬物の開発や経口医薬品のバイオアベイラビリティ改善に応用できることに加え, ABC トランスポーターを介した薬物間相互作用や体内動態の個体間変動のメカニズムの解析に対しても有益な情報を与えるものと考えられた。