

審査の結果の要旨

氏名 安達 弥永

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(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たものである。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、機能解析が進められている。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たことから、今日では、これらの ABC トランスポーターは外因性物質からの生体防御機構の一つとして認識されるに至っている。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、生体防御機構としての ABC トランスポーターは、医薬品開発における障害とみなされる場合もある。

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。

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、検証した。

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, 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適用できることを確認した。

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指摘されていた。したがって、経口薬物の開発において、消化管における MDR1 の輸送能を定量的に評価する手法の確立が望まれていた。

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、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い、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証した。

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ることが示された。

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った。

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。本評価方法は、ヒト小腸における MDR1 発現量の個体間差に基づく吸収性の変動や MDR1 阻害剤併用時における吸収性の変動の予測に適用できることを示唆するものであり、経口薬開発に有用であることを確認した。

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。

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

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ものと推察される。実際，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ことが実験的に確認された。

第三章 抱合代謝物の消化管排出に關与する 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 を用いた検討の結果，正常ラットに比べ E-3040-G の efflux rate は有意に低下したものの，E3040-S，4-MU-G 及び 4-MU-S の efflux rate には，有意差は認められないことが示された。逆に，*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 が有意に低下したことから，*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が同定された。

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解析に対しても有益な情報を与えるものと考えられた。

本研究は ABC トランスポーターを介した薬物輸送研究に対する端緒を開く研究であると考えられ，今後の医薬品開発に貢献できることを提起しており，博士（薬学）の学位に値するものと認めた。