

論文内容の要旨

論文題目 血液組織関門における Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)による異物排泄の定量的解析

氏名 榎園 淳一

トランスポーターは、薬物の消化管吸収、組織分布および排泄過程において、細胞膜を介した輸送を制御する主要な役割を担っている。薬物の生体膜輸送に関与するトランスポーター分子の同定と、*in vivo*における体内動態的イベント(消化管吸収、組織分布および排泄)における役割を明らかにすることは、薬物の体内動態制御機構を解明する上で重要な検討課題である。本研究では breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)に注目した。BCRPはATP-binding cassette transporter family Gに属するトランスポーターであり、ATPの加水分解と共役して基質を細胞内から細胞外へと排出する。BCRPは多くの組織で発現しており、薬物の体内動態にとって重要な組織である消化管や肝臓、腎臓、血液組織関門では特に高い発現が認められている。多様な化合物群を基質として認識し、抗癌剤やキノロン性抗生物質など種々の医薬品のほか、発癌性物質や抱合代謝物を基質とする。抱合代謝物の中では、特に硫酸抱合体を良い基質とする。*Bcrp*^{-/-}マウスを用いたこれまでの研究により、BCRPは医薬品を含む生体異物の経口吸収性を抑制し、尿中や胆汁中への排泄を促進することが明らかとなっている。

本研究の第一の目的は、BCRPの血液組織関門、特に血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)と血液精巣関門(blood-testis barrier, BTB)を介した生体異物の組織分布制御における役割を明らかにすることである。第一章では、医薬品や食品性発癌性物質、植物性エストロゲンなど様々なBCRP基質について、脳および精巣分布におけるBCRPの影響を*Bcrp*^{-/-}マウスを用いた*in vivo*実験によって評価した。第二章では、第一章で評価した化合物について、BCRPやP-glycoprotein (P-gp)の強制発現細胞を用いた*in vitro*輸送実験を行った。そして、得られた結果を第一章で得た*in vivo*の結果と比較解析することにより、脳や精巣分布においてBCRPの影響を受けやすい化合物の特性を考察した。本研究の第二目的は、硫酸抱合体の輸送におけるBCRPの役割を解明することである。BCRPは硫酸抱合体を良い基質とすることから、sulfotransferase (SULT)によって生成する硫酸抱合代謝物の排泄において重要な役割を担うことが予想される。第三章では、消化管および肝臓での硫酸抱合体の輸送にお

ける BCRP の役割を *Bcrp*^{-/-}マウスを用いて解析した。

本研究により、BCRP の血液組織関門の関門機構としての重要性ならびに第 3 相の異物解毒における役割を明らかにした。

1. BBB および BTB における BCRP の機能解析

BBB と BTB における関門機構としての BCRP の役割を、*Bcrp*^{-/-}マウスを用いて検討した。植物性エストロゲン(daidzein、genistein、coumestrol)、食品性発癌性物質(PhIP、MeIQx)および医薬品(dantrolene、prazosin、triamterene)をそれぞれ野生型マウスと *Bcrp*^{-/-}マウスへ静脈内定速持続投与した。定常状態における血漿、脳および精巣における化合物濃度を定量し、組織-血漿中濃度比(K_p)を野生型マウスと *Bcrp*^{-/-}マウスで比較した。triamterene を除くすべての化合物について、脳と精巣の K_p が *Bcrp*^{-/-}マウスにおいて有意に上昇した。Triamterene については、脳の K_p が *Bcrp*^{-/-}マウスにおいて有意に上昇した。PhIP については、発癌性の原因代謝物である *N*-hydroxyl PhIP についても *Bcrp*^{-/-}マウスにおける有意な脳と精巣の K_p の上昇が認められた。

genistein については、エストロゲンによる有害作用が報告されている精巣上体、卵巣、胎児および胎児脳への分布における BCRP の影響を検討した。卵巣への分布に有意な変化は認められなかったものの、精巣上体、胎児および胎児脳への分布については *Bcrp*^{-/-}マウスにおける有意な上昇が認められた。

以上の結果より、BCRP は関門組織において植物性エストロゲン、食品性発癌性物質および医薬品など様々な生体異物を積極的に汲み出し、脳および精巣への分布を制限することが明らかとなった。genistein については、精巣上体、胎盤および胎児脳への分布についても BCRP によって制限されていることが明らかとなった。

2. BBB および BTB における BCRP の機能についての *in vivo-in vitro* 比較解析

第一章で *in vivo* 試験を行った 8 化合物について、マウス *Bcrp* と、マウス BBB に発現している P-gp 分子種 *Mdr1a* の強制発現細胞を用いた輸送試験を行った。単層培養した細胞を介した双方向の経細胞輸送を評価し、基底膜側(basal)から頂側膜側(apical)への透過クリアランスと apical から basal への透過クリアランスの比(flux ratio)を求めた。トランスポーター強制発現細胞における flux ratio とコントロール細胞における flux ratio との比を corrected flux ratio (CFR)とし、トランスポーターによる輸送活性の指標とした。また、前章の結果より *Bcrp*^{-/-}マウスにおける K_p 値と野生型マウスにおける K_p 値の比(K_p ratio)を算出し、脳と精巣への分布における BCRP の影響の大きさの指標とした。

評価した 8 化合物はいずれもマウス Bcrp の基質であった。8 化合物のうち MeIQx、PhIP、prazosin および triamterene はマウス Mdr1a の基質であった。マウス Bcrp 強制発現細胞を用いて求めた CFR と K_p ratio の間には、明確な正の相関が認められなかった。一方、マウス Mdr1a 強制発現細胞を用いて求めた CFR と K_p ratio の間には負の相関が認められた。マウス Bcrp の選択的基質と、マウス Bcrp と Mdr1a の共通基質の pKa を比較した結果、マウス Bcrp の選択的基質がいずれも生理的 pH において酸性化合物であるのに対し、マウス Bcrp と Mdr1a の共通基質は生理的 pH において塩基性か中性化合物であった。

以上の結果より、BCRP は P-gp と基質が重複しており、共通基質については BCRP と P-gp がともに異物排泄に働くために、BCRP の影響が低下すると考えられた。しかし、酸性の BCRP 基質は P-gp の基質となりにくく、BCRP によって主に排泄を受けることが示唆された。

3. 硫酸抱合体の輸送における BCRP の機能解析

消化管および肝臓での硫酸抱合体の輸送における BCRP の役割を *Bcrp*^{-/-}マウスを用いて評価した。消化管については、BCRP と SULT の機能および発現の分布を比較した。Western blotting 法によって測定した BCRP 蛋白の発現量は回腸において最も高く、他の部位の約 2 倍であった。消化管各部位の反転腸管を用いて 4-methylumbelliferone sulfate の輸送活性を指標に測定した BCRP の活性は、回腸>大腸>空腸の順で大きかった。また、消化管各部位の反転腸管を用いて測定した 4-methylumbelliferone の硫酸抱合代謝活性は大腸において特に高かったのに対し、グルクロン酸抱合代謝活性は十二指腸と空腸で高く、下部では低かった。消化管には *Sult1a1/2*、*1b1*、*1d1* および *2b1* の mRNA が検出された。*Sult1* ファミリーの *Sult1a1/2*、*1b1* および *1d1* は発現量が回腸において最も高く、*Sult2b1* の発現量は消化管の各部位で同程度であった。BCRP および SULT の発現量と活性はともに消化管の上部より下部において高いことが明らかとなった。この分布の類似性は、両者の協同した生体異物解毒作用において重要と考えられる。

minoxidil の活性代謝物である minoxidil sulfate について、小腸から管腔側へ排出輸送における BCRP の影響を検討した。反転腸管法によって測定した minoxidil sulfate の管腔側への排出クリアランスは、*Bcrp*^{-/-}マウスにおいて野性型マウスの約 2 分の 1 に低下した。minoxidil sulfate の小腸管腔側への輸送における BCRP の関与が明らかとなった。

PhIP を投与した後の、未変化体および代謝物の血漿中濃度および胆汁中排泄量を野性型マウスと *Bcrp*^{-/-}マウスで比較した。血漿中濃度に変化が認められたのは 4-PhIP sulfate のみ

であり、*Bcrp*^{-/-}マウスにおける血漿中濃度は野生型マウスの約6倍であった。4'-PhIP sulfateの胆汁中排泄量は*Bcrp*^{-/-}マウスにおいて有意に低下し、これが4'-PhIP sulfateの有意な血漿中濃度上昇の原因と考えられた。BCRPは硫酸抱合体の胆汁排泄に関与し、硫酸抱合体の血漿中濃度に大きな影響を及ぼし得ることが明らかとなった。

troglitazoneによって惹起される肝内胆汁鬱滞作用の原因代謝物と考えられる troglitazone sulfate について、胆汁中排泄におけるBCRPの関与を検討した。troglitazone sulfateをマウスへ静脈内定速持続投与したときの胆汁中排泄クリアランスは、*Bcrp*^{-/-}マウスにおいて野生型マウスの約3分の1に低下した。BCRPはtroglitazone sulfateの胆汁中排泄に関与していることが明らかとなった。