

審査結果の要旨

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* の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研究課題である。申請者は breast cancer resistance protein (BCRP/*ABCG2*)に注目し、研究を行った。BCRP は ATP-binding cassette transporter (ABC) family G に属する ABC 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。多様な構造的特徴を持つ化合物群を基質として認識し、かつ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、血液組織関門に高発現しているという、生体異物の体内動態を制御する上で適した特徴を持っている。*Bcrp*^{-/-}マウスを用いた過去の報告により、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。しかしながら、BCRP は血液組織関門の管腔側に発現し、脳から血液方向への輸送を行うと期待されるものの、そのことが明確に実証された例はほとんどなかった。

申請者の本研究における目的は二つある。第一の目的は、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)における BCRP による異物排泄の重要性を明らかにすることであり、第一章と第二章に述べられている。第一章では、BCRP の影響を *Bcrp*^{-/-}マウスを用いた *in vivo* 実験により、*Bcrp*^{-/-}マウスで組織中濃度が大きく変化する化合物を探索し、医薬品や食品性発癌性物質、植物性エストロゲンなどを見いだした。第二章では、第一章で見いだ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* 輸送実験を行い、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って、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ている。申請者の第二の目的は、硫酸抱合体の輸送における BCRP の役割を明らかにすることであり、第三章に述べられている。これは、BCRP が硫酸抱合体を良い基質とすることから、体内で硫酸抱合体を生成する sulfotransferase (SULT) との機能協関に注目した研究である。*Bcrp*^{-/-}マウスを用いた *in vivo* 実験によって、消化管と肝臓での硫酸抱合体輸送における BCRP の重要性を示唆する結果を得ている。研究の詳細を以下に示す。

第一章 BBB および BTB における BCRP の機能解析

従来、*Bcrp*^{-/-}マウスにおいても、*Bcrp* 発現臓器である脳や精巣の組織中濃度が増加する

わけではなく、関門機構の一つとしての重要性は疑問視されていた。申請者は、*Bcrp*⁺マウスに種々の化合物を静脈内定速持続投与し、*in vivo* で組織中濃度が増加する化合物群の探索を行った。その結果、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)など様々な BCRP 基質が、*Bcrp*⁺マウスで組織中濃度が増加することを見いだした。triamterene 以外の化合物については、脳と精巣の両方の 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。さらに、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。もともと血液組織関門機構が存在しないと言われている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の脳および精巣への分布を制限することを明らかとした。特に、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を明らかとした。

第二章 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* の強制発現細胞を用いた輸送試験を行い、*in vitro* におけるマウス *Bcrp* による輸送活性と、*in vivo* における脳と精巣への分布に対する BCRP の影響を定量的に比較した。しかしながら、両者の間に明確な相関は認められず、*in vitro* で測定された *Bcrp* による輸送速度は化合物間で同程度であるのに対して、*in vivo* で評価を行った 8 化合物の *Bcrp*⁺マウスにおける脳と精巣分布の変動は化合物により異なっていた。申請者は、化合物ごとに *Bcrp* の寄与率が異なることを *in vivo* と *in vitro* が乖離する要因と考えた。マウスの BBB に発現している P-gp 分子種である *Mdr1a* に着目し、マウス *Mdr1a* の強制発現細胞を用いた輸送試験を行った。その結果、daidzein、genistein、coumestrol および dantrolene など、脳と精巣分布における BCRP の影響が大きかった化合物は、いずれも BCRP 選択的基質であったのに対し、PhIP、MeIQx、prazosin および triamterene など脳と精巣への分布における BCRP の影響が小さかった化合物は、いずれも BCRP と P-gp の共通基質であった。構造的特徴を比較すると、BCRP の選択的基質が弱酸性化合物であったのに対し、BCRP と P-gp の共通基質は中性から塩基性化合物であった。

以上の結果より、BCRP は P-gp と重複した基質選択性を示し、関門組織において BCRP と P-gp がともに異物排泄に働くために、*Bcrp* の欠損が基質化合物の組織分布に与える影響が *in vitro* からの予測よりも小さくなると考えられた。一方、弱酸性の BCRP 基質は BCRP が主たる排出ポンプとなるため、*Bcrp* の欠損が組織分布に与える影響が大きいことが示唆された。

第三章 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 BCRP と SULT の機能協関について、*Bcrp*^{-/-}マウスを用いて評価した。消化管における BCRP と SULT の機能および発現の分布を比較した。4-methylumbelliferon sulfate の輸送活性を指標に評価した BCRP の活性と、Western blotting 法によって求めた BCRP 蛋白の発現量は、ともに消化管の中部～下部(空腸～大腸)において高かった。4-methylumbelliferon の硫酸抱合代謝を指標に評価した SULT の活性と、Sult1 ファミリー(4-methylumbelliferon などフェノール性水酸基を持つ化合物を良い基質とする分子群)の mRNA 量はともに大腸において高かった。BCRP と SULT はともに消化管の上部より下部において活性と発現量が高いという点で類似しており、この類似性が BCRP と SULT の協同した解毒作用に重要であると考えられた。minoxidil の活性代謝物である minoxidil sulfate についても小腸から管腔側へ排出輸送における BCRP の影響を検討し、minoxidil sulfate の小腸管腔側への輸送に BCRP が関与していることを明らかにした。

肝臓については、硫酸抱合体の胆汁中排泄における BCRP の影響を、PhIP をモデル化合物として評価した。PhIP を静脈内投与した後の血漿中 4'-PhIP sulfate 濃度は、*Bcrp*^{-/-}マウスにおいて野生型マウスの約 6 倍に上昇した。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 *Bcrp*^{-/-}マウスにおける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、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。

本研究によって申請者は、BCRP が血液脳関門や精巣関門において、医薬品を含む様々な生体異物の組織分布を制限することを明らかにした。また、脳や精巣への分布が BCRP によって影響されやすい化合物の特性を提唱した。さらに、BCRP は消化管と肝臓において

硫酸抱合体の体外排出を担うことを明らかにし、消化管においてはBCRPとSULTとの類似した分布が両者の協同した解毒作用の効率化に寄与していることを提唱した。これらの成果は、薬物動態研究の進展に貢献するものであり、申請者を薬学博士の学位の授与に値すると認めた。