

## 論文の内容の要旨

論文題目            **Function of Multidrug Resistance-Associated Protein 3 (MRP3/ABCC3) in Hepatobiliary Transport and Intestinal Absorption**  
  
                          **(肝胆系輸送および消化管吸収における Multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3/ABCC3)の機能解明)**

氏 名            北 村 嘉 章

トランスポーターは基質薬物の細胞膜透過を促進し、医薬品や生体必須成分の消化管吸収、組織分布、排泄に関与する。近年では、トランスポーターに起因した薬物間相互作用、遺伝子多型による個体間変動の実例が多数報告され、臨床における薬物体内動態制御因子としての重要性を支持するデータが蓄積されつつある。理想的な体内動態特性を有する医薬品創製、個別化医療を見据えた医薬品適正使用のために、*in vivo* 薬物動態に関与するトランスポーター分子の重要性を明らかにすることが必要である。

本研究ではABC トランスポーターMRP3に注目した。MRP3は分子薬物動態学教室において、MRP2 欠損ラットの肝臓で誘導的に発現する MRP ホモログとしてクローニングされた。MRP3は17回膜貫通領域と2つのATP結合ドメイン(ABC)を有し、ATPの加水分解と共役して、細胞内からの排出輸送を行う。ラットとは異なり、マウス肝臓ではMRP3は恒常的に発現していること、ヒト肝臓での発現量に個人差が大きいことが報告された。一方、消化管では動物種によらず恒常的な発現が見られる。P-gp、MRP2、BCRPなど異物排泄に働く主要なABCトランスポーターが管腔側膜に局在するのに対して、MRP3は血管側膜に局在する特徴を有し細胞内から血液中へのreverse transport(本研究では、肝臓や消化管で排泄の流れに逆らう輸送をreverse transportと定義する)を担うと考えられる。これまでに薬物のグルクロン酸抱合体、胆汁酸およびメトトレキサートがMRP3の基質として同定されている。近年、Mrp3(-/-)マウスが作出され、モルヒネ投与後のモルヒネグルクロン酸抱合体の血漿中濃度が野生型マウスに比べて低下し

ていること、ならびにフラボノイドのグルクロン酸抱合体の血漿中濃度が低下していることが報告されており、MRP3 がグルクロン酸抱合体の体内動態に深く関与することが明らかにされている。一方、親化合物の肝胆系輸送では、MRP3 が関与すると考えられる肝シヌソイド側排出の重要性は、肝固有クリアランスの律速段階に依存する。肝臓における異物排泄は、血液から肝細胞への取り込み ( $PS_1$ )、肝細胞から血液への排出 (reverse transport;  $PS_2$ )、代謝 ( $CL_{met,int}$ ) および胆汁排泄 ( $CL_{bile,liver}$ ) の素過程により構成され、肝臓の異物排泄能力を表すオーバーオール肝固有クリアランス ( $CL_{int,all}$ ) に reverse transport の変動が影響を与えるためには、肝細胞に取り込まれた薬物の大部分が血液へ戻ること ( $PS_2 > CL_{met,int} + CL_{bile,liver}$ ) が必要である。この条件を満たす医薬品では、Mrp3(-/-)マウスで  $PS_2$  低下により  $CL_{int,all}$  が増加することが期待される。また、消化管基底膜側での排出輸送は消化管吸収への関与が考えられる。本研究では、医薬品の体内動態における MRP3 の役割を明らかにすることを目的として、Mrp3(-/-)マウスを用いた体内動態試験を行った。

Chapter 1 では、イリノテカンの活性代謝物 SN-38 とメトトレキサートの体内動態における MRP3 の重要性を評価した。抗がん剤イリノテカンプロドドラッグであり、肝臓で加水分解され SN-38 を生成する。野生型マウスと Mrp3(-/-)マウスにイリノテカン定速静脈内投与し、イリノテカンと SN-38 の血漿中濃度を比較した。イリノテカン自身の血漿中濃度は両マウスで等しいが、SN-38 の血漿中濃度は Mrp3(-/-)マウスで有意に低下し、肝臓-血漿濃度比は有意に増加した。SN-38 投与時の血漿中濃度は両マウスで一致し、循環血中からの消失速度が一致すること、イリノテカン投与時に SN-38 がおもに肝臓で生成することから、SN-38 のシヌソイド側排出に MRP3 が関わっており、グルクロン酸抱合体以外に薬理活性を有する代謝物の排出にも MRP3 が重要である可能性が示唆された。

次に、メトトレキサートを経口投与し、血漿中濃度の時間推移を比較した。メトトレキサートはリウマチや白血病の治療に使用される医薬品で、複数のトランスポーターがその体内動態に関与している。Mrp3(-/-)マウスでは野生型マウスと比べて、経口投与後の血漿中濃度が有意に低下し、薬物血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) で 3.5 倍の差が認められた。定速静脈内投与時の定常状態血漿中濃度は Mrp3(-/-)マウスにおいて有意に低下しており、Mrp3(-/-)マウスでは胆汁排泄クリアランス ( $CL_{bile,p}$ ) の増加が観察された。門脈内投与後の短時間での肝取り込みの比較より  $PS_1$  が両マウスで同等で、in vivo 試験で測定した  $CL_{bile,liver}$  も両マウスで同等であることから、 $CL_{bile,p}$  の増加は  $PS_2$  の低下で説明できると考えられた。すなわち、MRP3 がメトトレキサートの肝クリアランス決定因子として重要であることが示された。

速度論パラメータを比較した結果、Mrp3(-/-)マウスで観察された経口投与後のメトトレキサートの血漿中濃度低下は、全身クリアランス ( $CL_{tot,p}$ ) の増加とバイオアベイラビリティ (F) 低下により説明可能であった。さらに F の低下は、肝臓初回通過効果 ( $F_h$  の低下) だけでは説明できず、消化管吸収 ( $F_aF_g$ ) の低下も示唆された。そこで、メトトレキサートの消化管吸収を in vitro 反転腸管法により評価した。メトトレキサートを反転腸管の刷子縁膜側に添加し、刷子縁膜側から基底膜側への輸送クリアランス ( $PS_{net}$ ) を測定した。十二指腸では  $PS_{net}$  は飽和性を示し Mrp3(-/-)マウスで有意に低下した。一方、空腸以下の各部位で  $PS_{net}$  は十二指腸に比べて著しく小さく、野生型マウスと Mrp3(-/-)マウスで  $PS_{net}$  は同程度であった。MRP3 は消化管全体に発

現しているが、メトトレキサートの消化管吸収では特に十二指腸において、MRP3 が基底膜側の排出輸送に関与することが示された。メトトレキサートは葉酸トランスポーターPCFT あるいは RFC-1 により刷子縁膜側から取り込まれるが、これらのトランスポーターの発現は十二指腸で最も高く空腸、回腸、大腸では低発現である。すなわち、空腸以下の各部位では消化管吸収に占める経細胞輸送の寄与が小さくなった結果、MRP3 による排出輸送が  $PS_{net}$  に及ぼす影響が観察されなかったと考えられた。

Chapter 2 では、グルクロン酸抱合体をプローブ化合物として、MRP3 が小腸全体で基底膜側の排出輸送を担うことを明らかにした。親化合物を反転腸管の刷子縁膜側に添加すると、細胞内で生成したグルクロン酸抱合体が基底膜側、刷子縁膜側へと排出された。反転腸管組織中濃度を測定し、各過程の輸送クリアランス ( $PS_{serosal}$  と  $PS_{mucosal}$  はそれぞれ基底膜側 (漿膜側) と刷子縁膜側 (粘膜側) への排出クリアランスを表す) を算出した。4 メチルウンベリフェロン (4MU) を刷子縁膜側に添加したとき、4MU グルクロン酸抱合体の  $PS_{serosal}$  は小腸全体で  $Mrp3(-/-)$  マウスの方が野生型マウスに比べて有意に低かった。この  $PS_{serosal}$  低下は、MRP3 がマウス小腸全体で基底膜側排出輸送活性を有するものと解釈でき、MRP3 が小腸全体で発現していることと一致した。 $PS_{mucosal}$  については、消化管の全体で両マウスの間で違いは見られなかった。SN-38 とアセトアミノフェンのグルクロン酸抱合体でも、 $Mrp3(-/-)$  マウスの空腸から作成した反転腸管で  $PS_{serosal}$  の低下が観察され、構造の異なる複数のグルクロン酸抱合体が、消化管で MRP3 により排出されていることが示された。

Chapter 3 では、MRP3 が葉酸類縁体の消化管吸収に関わることを明らかにした。 $Mrp3(-/-)$  マウスから作成した十二指腸の反転腸管では、葉酸およびロイコボリンの  $PS_{serosal}$  と  $PS_{net}$  が低下した。活性型葉酸である 5MeTHF の  $PS_{serosal}$  も低下が見られたがその影響は葉酸やロイコボリンより小さかった。葉酸類縁体について、*in vivo* 経口投与で血漿中濃度を測定した。葉酸を経口投与したとき、 $C_{max}$  および AUC は  $Mrp3(-/-)$  マウスで有意に低下した。ロイコボリンでは投与後初期の吸収速度に違いが見られた。このように、葉酸類縁体についても、*in vivo* で MRP3 の消化管吸収への関与が確認された。しかし、 $Mrp3(-/-)$  マウスで内在性の 5MeTHF 濃度には影響が見られず、 $Mrp3$  の欠損のみでは葉酸欠乏状態を誘発するには至らないことを明らかにした。

本研究により、肝胆系輸送および消化管吸収において、MRP3 が薬物の reverse transport に関与することを明らかとした。親化合物の肝クリアランスに及ぼす影響と消化管吸収における役割は、本研究で初めて明らかとしたものである。さらに、MRP3 が葉酸の消化管吸収にも関与することを明らかとし、これまで一般に異物解毒の役割を果たしていると考えられていた MRP ファミリーのトランスポーターに、生体必須成分の体内動態を制御する役割があることを示した。今後、MRP3 は薬物の効果持続性や消化管吸収をコントロールできるトランスポーターとして創薬研究への応用が期待される。また、薬物間相互作用や遺伝子多型を利用した臨床研究により、ヒト *in vivo* 体内動態における MRP3 の重要性が明らかにされ、医薬品の適正使用が促進されると考えられる。