

審査の結果の要旨

氏名 北村 嘉章

医薬品の創製においては、薬効標的との相互作用を最適化するだけでなく、標的分子への暴露を規定する体内動態特性の最適化も必要であり、薬物体内動態制御因子である代謝酵素やトランスポーターの基質認識特性に基づいて、論理的な構造展開の提示が求められている。近年、トランスポーターに起因した薬物間相互作用、遺伝子多型と薬物の個体間変動の実例が多数報告され、薬物体内動態制御因子としてのトランスポーターの重要性を支持するデータが蓄積されつつあるものの、未だ *in vitro* での解析にとどまり、*in vivo* 薬物動態における重要性が明らかにされていないトランスポーター分子も複数存在する。そうしたトランスポーター群の重要性を明らかにしていくことが、薬物動態学上の課題となっている。本研究で注目した **MRP3** は私が主宰する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** ホモログとして世界に先駆けてクローニングした **ABC** トランスポーターである。強制発現細胞を用いた *in vitro* 解析により、グルクロン酸抱合体や胆汁酸ほかいくつかの薬物を基質とすること、また上皮細胞の基底膜側に発現し、肝細胞内から血液中への排出に関わると期待されていたものの、*in vivo* 薬物動態における重要性は不明であった。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た。本研究では、本マウスを用いて、種々薬物について *in vivo* 体内動態について検討し、**MRP3** の重要性を明らかにした。

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ついての検討結果がまとめられている。

抗がん剤イリノテカンプロドドラッグであり、肝細胞内で加水分解を受け、**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結果、イリノテカン自身の血漿中濃度は両マウスで等しいにも関わらず、**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。

メトトレキサートを経口投与し、その血漿中濃度の時間推移を比較したところ、Mrp3(-/-) マウスでは野生型マウスと比べて有意に低下しており、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、循環血中からの消失が亢進していることを見いだした。メトトレキサートは胆汁と尿中への排泄が消失経路であり、胆汁排泄クリアランスの増加が認められた。胆汁排泄は、肝細胞への取り込み過程、肝細胞内から胆汁中への排出過程、類洞側での血液中への排出過程の 3 つの輸送過程により、決定される。門脈内投与後の短時間での肝取り込みの比較より、肝取り込み能力 (PS_1) が両マウスで同等であること、肝細胞濃度基準の胆汁排泄クリアランス ($CL_{bile,liver}$) も両マウスで同等であることから、 $CL_{bile,p}$ の増加は類洞側での血液中への排出輸送 (PS_2) の低下で説明される。すなわち、MRP3 がメトトレキサートの肝類洞側での排出に関わり、肝消失の律速段階を決定する因子として重要であることを導出している。

静脈内投与後および経口投与後の速度論パラメータを比較した結果、Mrp3(-/-) マウスでは、全身クリアランス ($CL_{tot,p}$) の増加のほか、バイオアベイラビリティ (F) 低下も示唆された。F の低下の一部は、肝クリアランスの増加に伴う肝アベイラビリティ (F_h) の低下で説明可能であるが、消化管吸収 ($F_a F_g$) の低下も示唆された。この仮説を支持するため、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ている。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}) を測定している。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。十二指腸から調製した反転腸管では、細胞内から基底膜側への排出輸送が Mrp3(-/-) マウスで顕著に低下しており、MRP3 が基底膜側の排出輸送に関与していることを示唆している。既報では、MRP3 は消化管の上部から下部まで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十二指腸においてのみ、MRP3 が基底膜側の排出輸送に関与することが示されている。この発現部位と輸送能力との乖離は、取り込みトランスポーターの発現分布で説明されている。すなわち、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ことが示唆されており、*real-time PCR* 法によりこれらのトランスポーターの消化管内分布を検討した結果、PCFT および RFC-1 はともに、十二指腸で最も高く空腸、回腸、大腸では低発現である。実際、十二指腸を除く消化管の反転腸管での PS_{net} は、著しく小さい。以上の事実から、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察されている。これについては、Chapter

2で詳細に検討された。

Chapter 2では、前述の MRP3 の消化管発現分布とメトトレキサート排出能力の低下との乖離について、グルクロン酸抱合体をプローブ化合物とした検証が行われた。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る。この排出速度と反転腸管組織中濃度から、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、野生型マウスと $\text{Mrp3}(-/-)$ マウスとの比較が行われた。4メチルウンベリフェロン (4MU) を用いた場合、過去の報告と同様に 4MU グルクロン酸抱合体は十二指腸でもっとも多く生成され、下部にいくに従い低下した。細胞内からの排出能力も、この抱合代謝活性と一致し、上部でもっとも高く、下部にいくに従い低下した。4MU グルクロン酸抱合体は基底膜側と刷子縁膜側の両方に排出されるが、刷子縁膜側への排出能力の方が高かった。4MU グルクロン酸抱合体の PS_{serosal} は小腸全体で $\text{Mrp3}(-/-)$ マウスの方が野生型マウスに比べて有意に低かった。しかし、大腸では基底膜側の排出能力は野生型マウスと同程度であった。本結果は、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しており、MRP3 が小腸全体で発現していることとも一致している。 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。4MU だけではなく、SN-38 とアセトアミノフェンのグルクロン酸抱合体についても、 $\text{Mrp3}(-/-)$ 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ている。

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ている。葉酸は 5MeTHF へと変換され、一炭素転移反応の補酵素となるビタミンである。食事から消化管で吸収されるため、その吸収機構に関して多くの研究が行われており、刷子縁膜側からの取り込み過程に働くトランスポーターとして、前述の PCFT および RFC-1 が同定されている。基底膜側の排出輸送過程については、膜ベンクルを用いた解析から促進拡散であると考えられていたが、その分子実体は不明であった。葉酸を経口投与で与えたとき、その C_{max} および AUC は野生型マウスに比べて、 $\text{Mrp3}(-/-)$ 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。一方で、静脈内投与時には、葉酸の血漿中濃度は野生型マウスと同程度であった。十二指腸の反転腸管を作製し、葉酸およびロイコボリンの PS_{net} および PS_{serosal} の両パラメータを評価した。 $\text{Mrp3}(-/-)$ マウスでは、葉酸およびロイコボリンの PS_{net} および PS_{serosal} が著しく低下していることから、MRP3 が葉酸およびロイコボリンの基底膜側での排出輸送に関与していることが示唆された。一方で、一炭素転移反応の補酵素となる 5MeTHF についても PS_{serosal} の低下が見られたが、その影響は葉酸やロイコボリンよりも小さかった。葉酸と 5MeTHF では、主となる輸送機構が異なるこ

とが示唆された。これらの結果は、メトトレキサートと同様に、**MRP3** が葉酸の消化管吸収に関与していることを示している。しかし、**Mrp3(-/-)**マウスでは、内在性の **5MeTHF** 濃度は野生型マウスと同程度であり、**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も明らかにしている。

本研究は、**MRP3** が薬物の肝臓での肝類洞側での排出輸送、ならびに消化管での吸収に働くことを明らかにした。特に、消化管吸収においては、これまで異物排泄に働く **ABC** トランスポーターはすべて吸収を抑制する方向に機能していたことから、従来のコンセプトとは異なり吸収方向に働くことを **in vivo** で定量的に実証したという点で、新しい知見である。薬物の消化管上皮細胞の経細胞輸送において、基底膜側の排出輸送に関わるトランスポーターを初めて明らかにしたという点も特筆に値する知見である。**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も明らかとした。本研究は、トランスポーターの基質認識特性に基づいた医薬品の体内動態特性の最適化など創薬に貢献するものであり、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。