

論文の内容の要旨

論文題目 アロマターゼ阻害剤の中枢移行性を規定する諸要因の解析
氏名 宮島 真理

【序論】

アロマターゼはアンドロゲンをエストロゲンへと変換する酵素である。アロマターゼ阻害剤はホルモン依存性乳癌の閉経後女性に処方され、副腎などの末梢臓器と癌のアロマターゼを阻害してエストロゲン産生を抑制する。その結果、エストロゲン依存的な細胞増殖が抑えられ、抗腫瘍効果を発揮する。乳癌組織と同様、脳腫瘍においてもアロマターゼの発現亢進が確認され、アロマターゼ阻害剤投与により乳癌脳転移が縮小した例も報告されている。今後、アロマターゼ阻害剤の乳癌脳転移への適応拡大が期待される。また、中枢神経系においてもアロマターゼの発現や活性が確認され、局所的に産生されたエストロゲンが神経伝達や神経成長の調節に関与すると考えられている。現在相反する臨床報告があるものの、アロマターゼ阻害剤服用による学習、認知能力の低下などの中枢性副作用も指摘されており、脳内アロマターゼ阻害が要因である可能性もある。アロマターゼ阻害剤の脳内暴露は、血液中での滞留性や血液中・脳中の蛋白結合、血液と脳実質との間の関門である血液脳関門における薬物輸送によって決定される。そこで、本研究は、アロマターゼ阻害剤の中枢移行性および脳内アロマターゼ阻害能に着目し、その中枢移行性を規定する因子を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。本研究では非ステロイド系アロマターゼ阻害剤に注目し、国内で臨床に用いられている anastrozole、letrozole（ともに第3世代型）、開発中止となった vorozole、共同研究先である理化学研究所で現在開発中の

cetozole、TMD-322 の 5 化合物について解析した。

【方法と結果】

1. ヒトアロマトラーゼに対する阻害能の in vitro 評価

Vorozole を除く 4 化合物のアロマトラーゼ阻害能を、ヒトアロマトラーゼ発現マイクロソームを用いた蛍光基質 dibenzylfluorescein の代謝実験により評価した。IC₅₀ は Anastrozole が最も大きく (13 nM) であり、他の化合物の IC₅₀ 値は 1.5~3.6 nM であった。

2. アロマトラーゼ阻害剤の物理化学特性および血漿中非結合型薬物分率の測定

アロマトラーゼ阻害剤の logP 値を、ChemAxon により構造式から予測した。膜透過性 (P_{app}) を MDCKII 細胞の経細胞輸送実験で評価した。血漿中非結合型薬物分率 (f_p) は、マウス血漿を用いて平衡透析法により求めた。

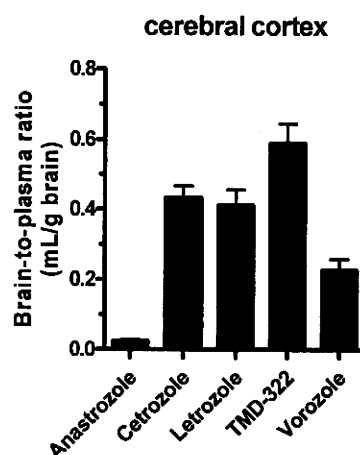
表 1 アロマトラーゼ阻害剤の物理化学的特性および血漿中非結合型薬物分率

	Anastrozole	Cetozole	Letrozole	TMD-322	Vorozole
分子量	293.37	289.33	285.30	289.33	324.77
logP	3.03	2.47	2.94	3.16	3.28
	中性	中性	中性	中性	中性
P _{app} (μL/min)	1.01	0.98	1.44	0.78	0.67
f _p	0.28	0.23	0.38	0.05	0.05

アロマトラーゼ阻害剤の物理化学的特性は、5 化合物間で類似していた (表 1)。医薬品の血液脳関門透過性については分子量および脂溶性が指標となることから、5 化合物の単純拡散による血液脳関門透過性はほとんど変わらないことが予想された。今回検討したアロマトラーゼ阻害剤の中で、特に TMD-322 および vorozole の f_p が小さいことから、in vivo での血液から脳実質内の移行性が低いことが予想された。

3. マウス単回投与後のアロマトラーゼ阻害剤の脳-血漿中濃度比の比較

マウス単回静脈内投与後の脳-血漿中濃度比を図 1 に示す。anastrozole が他の化合物の 1/5~1/10 以下と、きわめて小さく、表 1 から予測される血液脳関門透過



性との間に乖離が認められた。また、TMD-322 および vorozole については、f_p が小さいにも関わらず、他の薬剤と同程度の脳-血漿中濃度比を示すことが明らかとなった。

4. アロマターゼ阻害剤の脳実質細胞内への曝露

医薬品の脳実質内の曝露は、血液脳関門透過性、実質細胞における細胞膜透過性によって決定される(図2)。定常状態では脳-血漿中濃度比は式(1)で示され、血液-脳細胞間液(ISF)間の取り込みクリアランス($PS_{\text{blood-ISF}}$)と排出クリアランス($PS_{\text{ISF-blood}}$)との比、脳細胞間液(ISF)-脳実質(parenchyma)間の取り込みクリアランス($PS_{\text{ISF-parenchyma}}$)と排出クリアランス($PS_{\text{parenchyma-ISF}}$)との比、 f_p 、脳内非結合型薬物分率(f_{br})から構成される。

$$\text{Brain-to-Plasma ratio} = \frac{PS_{\text{blood-ISF}}}{PS_{\text{ISF-blood}}} \times \frac{PS_{\text{ISF-parenchyma}}}{PS_{\text{parenchyma-ISF}}} \times \frac{f_p}{f_{br}} \dots (1)$$

以下、各パラメータを *in vitro* 試験により求めた。

4.1 アロマターゼ阻害剤の脳内蛋白結合

脳内非結合型薬物分率(f_{br})は、マウス大脳ホモジネートを用いて平衡透析法に

より求め、 f_p と比較した。 f_p と f_{br} との乖離はいずれの化合物でも2倍程度であった(表2)。

4.2 アロマターゼ阻害剤の脳内分布容積と脳実質内への濃縮率の評価

in vitro 脳スライス取り込み実験から、アロマターゼ阻害剤の脳内分布容積(V_d)を推定した。 V_d は全薬物濃度基準での脳実質内-脳細胞間液中濃度比($PS_{\text{ISF-parenchyma}}/(f_{br} \times PS_{\text{parenchyma-ISF}})$)に相当する。 V_d に f_{br} を乗じることで、脳実質内への濃縮率($PS_{\text{ISF-parenchyma}}/PS_{\text{parenchyma-ISF}}$)を推定した。TMD-322は若干低い値を示すものの、他の薬物は1に近い値を示し、アロマターゼ阻害剤の脳実質細胞内へほとんど濃縮されないものと考えられた(表2)。

4.3 アロマターゼ阻害剤の血液脳関門を介した能動輸送の寄与

医薬品の血液脳関門透過性における能動的な輸送の寄与の有無について、血液脳関門取り込みクリアランス($PS_{\text{blood-ISF}}$)と血液脳関門排出クリアランス($PS_{\text{ISF-blood}}$)の比に基づいて推定した。この比が1より大きければ能動的な取り込み機構の寄与が考えられ、1より小さければ能動的な排出機構の寄与が示唆される。

これまでの検討から得た脳-血漿中濃度比、血漿中蛋白結合(f_p)、脳内分布容積(V_d)を用いて、式(1)より $PS_{\text{blood-ISF}}/PS_{\text{ISF-blood}}$ を求めた(表2)。脳-血漿中濃度比の低いanastrozoleでは、他の薬物と比較して10倍異なり、血液脳関門における能動的な排出輸送が、脳-血漿中濃度比が低い要因と考えられた。他の4剤の $PS_{\text{blood-ISF}}/PS_{\text{ISF-blood}}$ も1を下回り、能動的排出を受けている可能性が考えられる。

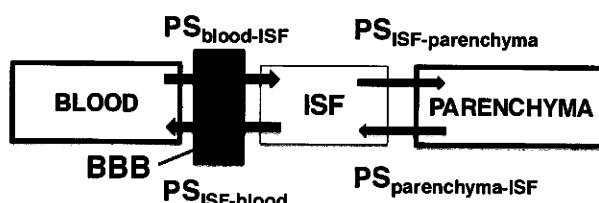


図2 血液と脳実質細胞との間の物質交換の模式図

表 2 アロマターゼ阻害剤の脳内の曝露に関連したパラメータ

	脳-血漿中濃度比	蛋白結合				脳実質への濃縮率	血液脳関門での能動輸送
	Brain-to-plasma ratio (mL/g brain)	f_p	f_{br}	f_p/f_{br}		$\frac{PS_{ISF-parenchyma}}{PS_{parenchyma-ISF}}$	$\frac{PS_{blood-ISF}}{PS_{ISF-blood}}$
anastrozole	0.030	0.28	0.31	0.90	3.20	0.99	0.034
cetozole	0.421	0.23	0.11	2.1	6.54	0.72	0.282
letrozole	0.383	0.38	0.16	2.4	4.92	0.79	0.208
TMD-322	0.487	0.05	0.02	2.5	23.7	0.47	0.380
vorozole	0.185	0.05	0.05	1.0	13.6	0.68	0.297

5. マウス脳マイクロダイアリス法によるアロマターゼ阻害剤の脳内非結合型薬物濃度の測定

マウス脳マイクロダイアリス法を用いて、anastrozole の脳内非結合型薬物濃度を測定した。マウスでは anastrozole の血中からの消失は非常に遅いことから、単回静脈内瞬時投与により anastrozole を投与し、経時的に血液、透析液を回収し、薬物濃度を測定した。常法に従い、antipyrine を対照化合物として、補正係数を算出した。Anastrozole の脳内非結合型薬物濃度は速やかに定常状態に達した。非結合型薬物濃度基準の脳-血漿中濃度比 ($K_{p,uu}$) は $0.118 \pm 0.037 \text{ mL/g brain}$ と、やはり 1 を下回ることから、血液脳関門での能動的な排出機構を受けることが示唆された。

6. in situ 脳灌流法による血液脳関門透過性の比較

diazepam を灌流速度の対照化合物として用いて、in situ 脳灌流法により血液脳関門透過性を測定した。Anastrozole の血液脳関門透過性は他の薬剤に比較して小さく、反対に TMD-322 は diazepam と同程度の透過性を示し、完全な灌流速度律速であった。cetozole、letrozole、vorozole は同程度の値 ($\sim 1 \text{ mL/min/g brain}$) を示した。

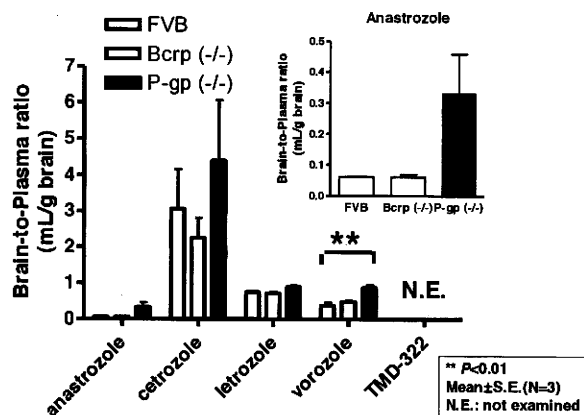


図3 野生型、Bcrp(-/-)、P-gp(-/-)マウスにおける脳-血漿中濃度比

7. 血液脳関門に発現する ABC トランスポーターのノックアウトマウスにおけるア

ロマトラーゼ阻害剤の脳-血漿濃度比ならびに in vitro 輸送活性の比較

血液脳関門に発現する排出トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp)、Breast cancer resistance protein (Bcrp)、Multidrug resistance protein 4(Mrp4)の各ノックアウトマウスを用いて、脳-血漿中濃度比を評価した。anastrozole と vorozole については、P-gp ノックアウトマウスにおいて脳-血漿中濃度比が、野生型マウスに比べて有意に増加した (図 3)。このことから、anastrozole および vorozole については P-gp がその中枢移行性を制限することが示唆された。一方で、Bcrp、Mrp4 ノックアウトマウスでは、野生型と有意な違いは見られなかった。さらに、P-gp 過剰発現 MDCKII 細胞を用いた経細胞輸送実験においても、mock 細胞と比較して、P-gp 発現細胞では anastrozole において特に顕著な方向性輸送が観察され、vorozole についても若干の方向性輸送が観察された。他の薬物の経細胞輸送は mock 細胞と同程度であり、P-gp による輸送活性は認められなかった。いずれの薬物においても、BCRP 過剰発現 MDCKII 細胞における経細胞輸送は、mock 細胞と同程度であり、BCRP による輸送活性は認められなかった。これらの in vitro での結果は、ノックアウトマウスを用いた in vivo での結果と一致する。

8. 臨床投与量での脳内アロマトラーゼ阻害能の推定

マウスにおける非結合型脳-血漿中薬物濃度比と臨床投与量での血漿中非結合型薬物濃度を利用し、脳内のアロマトラーゼ阻害活性を推定した。脳内アロマトラーゼ阻害能は、anastrozole、letrozole とともに末梢組織でのアロマトラーゼ阻害能に劣るものの、letrozole では現在の投与量で十分脳内アロマトラーゼも阻害することが可能である。

【まとめと考察】

本研究から、アロマトラーゼ阻害剤は分子量、脂溶性などの物理化学的特性が類似しているにも関わらず、anastrozole の中枢移行性が他の 4 化合物と比較して 1/10 程度小さいことが示された。血漿中、脳内の非結合型薬物分率や脳実質細胞における薬物輸送を測定した結果、特に anastrozole で顕著であるものの、いずれの薬物も血液脳関門において能動的な排出輸送を受けることが示唆された。anastrozole、vorozole については、P-gp により一部説明されるものの、anastrozole は P-gp ノックアウトマウスにおいても、完全に脳-血漿濃度比が回復しないこと、他の 3 剤については既知排出トランスポーター (P-gp、Bcrp、Mrp4) では説明できないことから、他のトランスポーターが排出輸送に関与していることも考えられ、分子論の解明に向けてさらに解析することが必要である。In vitro アロマトラーゼ阻害能に基づくと、letrozole については現行の投与量でも脳内アロマトラーゼを十分阻害することが予想され、乳癌脳転移への利用も期待される。すでに共同研究者の理研分子イメージング研究科学センターの渡辺恭良先生のグループは cetozole、TMD-322 は PET 分子プローブ化も完了しており、ヒトへの臨床試験の実施も計画されている。プローブ分子の脳内

動態の解析により、本研究成果の妥当性の検証ならびにヒト脳内動態を規定する要因の解明にも繋がるものと期待される。