

論文の内容の要旨

薬物の VLDL/LDL への分布しやすさが 薬物動態および薬効に及ぼす影響の解析

伊藤 紗代

【背景・目的】

血清中の薬物は、アルブミン、 α 酸性糖タンパク質、グロブリンやリポタンパク質等、様々な血清タンパク質と相互作用して存在している。私の所属する研究室で行われた先行研究において、リポタンパク質の一種である超低比重リポタンパク質や低比重リポタンパク質（VLDL/LDL）に分布した薬物（VLDL/LDL 分布型薬物）が、LDL 受容体を介して細胞内へ取り込まれることが明らかとなった。しかし、VLDL/LDL 分布型薬物の細胞移行後の薬効強度を、他の細胞移行型薬物（遊離型薬物等）と比較した報告はなく、薬物治療において、VLDL/LDL 分布型薬物による薬物動態・薬効の変動は考慮されていないのが現状である。

また、先行研究では、VLDL/LDL の代謝制御が一部の薬物の体内動態に影響を及ぼすことが示され、脂質異常症治療薬など脂質代謝変動をもたらす薬物と VLDL/LDL に分布しやすい薬物の薬物間相互作用が理論上予想されたものの、その実験的検証はなされていなかった。

そこで本研究では、VLDL/LDL に分布しやすいいくつかの薬物について、「1. VLDL/LDL 分布型薬物と遊離型薬物の薬効強度の違い」ならびに「2. 脂質異常症治療薬ロミタピドとの薬物間相互作用」について評価を行った。

【方法・結果】

<1. VLDL/LDL 分布型薬物と遊離型薬物の薬効強度の違いに関する検討>

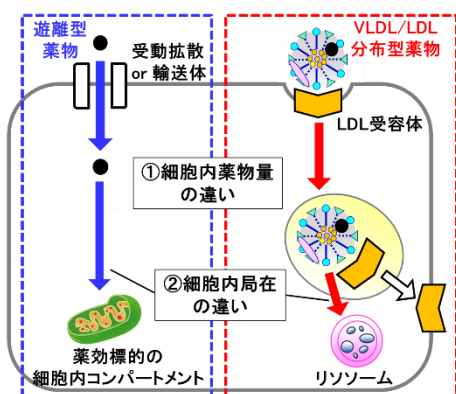


図1. VLDL/LDL分布型薬物と遊離型薬物の細胞内挙動の違い

LDL 受容体を介して取り込まれる VLDL/LDL 分布型薬物の細胞内薬物量は、受動拡散や輸送体で取り込まれる遊離型薬物の細胞内薬物量とは異なる可能性がある（図 1-①）。また、VLDL/LDL は、LDL 受容体を介してエンドサイトーシスされたあと、細胞内でリソソームへ移行することが知られていることから、VLDL/LDL に分布した薬物も、VLDL/LDL の挙動に伴い、リソソームへ移行すると推測される。このような VLDL/LDL 分布型薬物の細胞内挙動（リソソームへの移行）は、受動拡散や輸送体を介して細胞内に取り込まれた遊離型薬物の細胞内挙動とは異なる可能性がある（図 1-②）。そこで、本研究では VLDL/LDL 分布型薬物と遊離型薬物の細胞内薬物量や細胞内挙

動（局在）の違いが、薬効強度に違いをもたらす可能性を念頭に検討を行った。

対象薬物としては、ヒト血清における VLDL/LDL への分布を示唆する報告があり、薬効標的が細胞内コンパートメントにあるシクロスポリン A (CYA) とテトラサイクリン (TET) を用いた。なお各実験において、「VLDL/LDL 分布型群」の細胞には *in vitro* で調製した VLDL/LDL 分布型薬物を添加し、「遊離型群」の細胞には遊離型薬物に加えて薬物を含まない VLDL/LDL も添加した。

1-1A. シクロスポリン A の IL-2 分泌抑制作用は、遊離型群よりも VLDL/LDL 分布型群で強く現れる

免疫抑制薬である CYA の薬効強度を、野生型マウスから単離した脾臓細胞を用いて評価した。コンカナバリン A で刺激して IL-2 分泌を誘発させた脾臓細胞に対して、各存在様式の CYA を様々な濃度で添加し、培養上清中の IL-2 濃度を ELISA 法により定量した。その結果、いずれの添加濃度においても VLDL/LDL 分布型群の方が、遊離型群よりも IL-2 分泌抑制作用が強かった（図 2）。

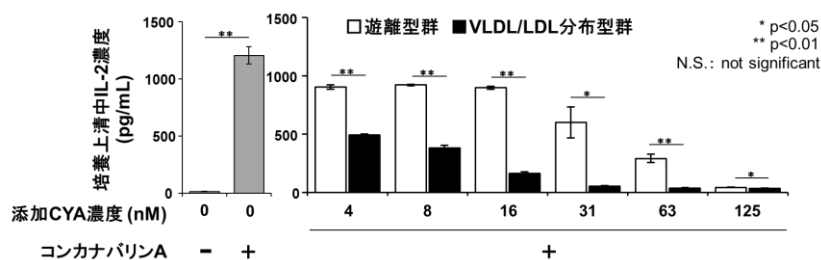


図2. シクロスポリンAのIL-2分泌抑制作用

1-1B. 添加様式によるシクロスポリン A の薬効強度の違いは細胞内薬物量の違いで概ね説明可能である

つづいて、遊離型群と VLDL/LDL 分布型群で CYA の IL-2 分泌抑制作用の強度に違いが生じるメカニズムについて検討を行なった。1-1A の解析における脾臓細胞内の CYA 量を測定した結果、全ての添加濃度において、VLDL/LDL 分布型群における細胞内 CYA 量は、遊離型群よりも多かった（図 3）。また、細胞内 CYA 量と培養上清中 IL-2 濃度を用いた用量作用曲線は両群でほぼ一致したことから、両群の薬効強度の違いは、細胞内薬物量の違いで概ね説明可能であることが示唆された（図 4）。

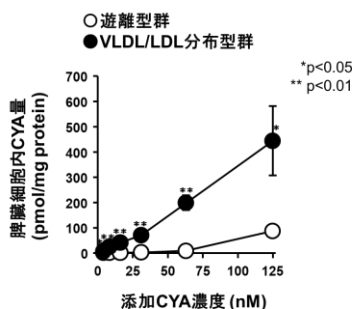


図3. シクロスポリンAの細胞内移行性

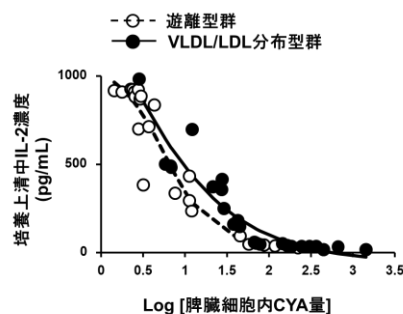


図4. 脾臓細胞内薬物量と薬効の関係

1-2A. テトラサイクリンの細胞内代謝活性化能は、遊離型群と VLDL/LDL 分布型群で異なる

近年、TET が真核細胞に与える軽微なミトコンドリアストレスによって、細胞生存能力が改善することが注目されている（ミトホルミシス効果）。そこで、細胞刺激時の TET 存在様式の違いがミトホルミシス効果に及ぼす影響を評価することにした。マウス肝癌由来の培養細胞株 Hepa1-6 細胞を用いて、細胞生存

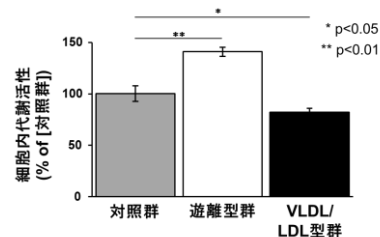


図5. テトラサイクリン添加後の細胞内代謝活性

能力の指標の一つである細胞内代謝活性を methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) アッセイにより測定した。その結果、遊離型 TET を添加した群では対照群 (VLDL/LDL のみ添加した細胞群) よりも細胞内代謝活性が上昇した一方で、VLDL/LDL 分布型 TET を添加した群では低下を認めた (図 5)。

1-2B. 遊離型テトラサイクリンと VLDL/LDL 分布型テトラサイクリンではミトコンドリア・リソソームへの作用が異なる

つづいて、遊離型群と VLDL/LDL 分布型群で TET の細胞内代謝活性化能が異なるメカニズムについて検討を行なった。1-2A の解析時の Hepa1-6 細胞内の TET 量を測定したところ、遊離型群と VLDL/LDL 分布型群で同程度であった。そこで、添加様式によって分布する細胞内コンパートメントが異なる可能性 (遊離型: ミトコンドリア、VLDL/LDL 分布型: リソソーム) を念頭に、各コンパートメントに対する薬効および毒性を評価した。ミトコンドリアに対する TET の薬効としては、ミトコンドリア膜電位 (MMP) を評価した。また、リソソームに対する TET の影響としては、TET が塩基性薬物であることや、リソソームの pH 上昇がリソソーム機能の低下を引き起こし得ることから、リソソームの中性化を評価した。その結果、MMP については、対照群と比較して遊離型群では上昇し、VLDL/LDL 分布型群では逆に低下が認められた (図 6)。リソソーム pH については、遊離型群では変動が認められなかった一方で、VLDL/LDL 分布型群では、酸性コンパートメントに集積する赤色蛍光色素のシグナルが減弱しており、リソソームの中性化が示唆された (図 7)。これらの結果から、TET によるミトコンドリアおよびリソソームへの作用は遊離型群と VLDL/LDL 分布型群で異なり、このことが細胞内代謝活性化能の違いに繋がっている可能性が考えられた。

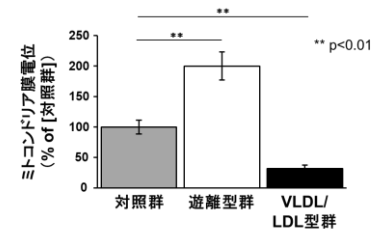


図6. テトラサイクリン添加後のミトコンドリア膜電位

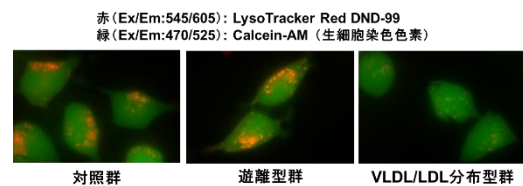


図7. テトラサイクリン添加後のリソソーム染色像

<2. VLDL/LDL 分布型薬物と脂質異常症治療薬ロミタピドの薬物間相互作用に関する検討>

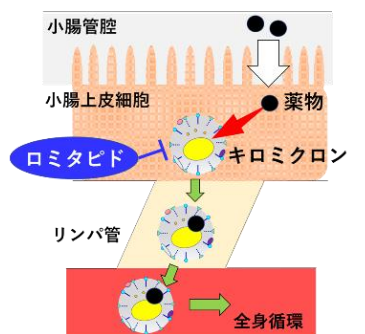


図8. ロミタピドによる薬物の吸収阻害の可能性

脂質異常症治療薬であるロミタピドは、小腸上皮細胞において、VLDL/LDL の前駆体であるキロミクロンの形成を阻害する作用を持つ。ロミタピドの添付文書には、脂質のみならず、ビタミン K の吸収がロミタピドによって低下する可能性について記載がある。ビタミン K は血清中で VLDL/LDL に分布して存在していることから、血清中で VLDL/LDL に分布しやすい薬物についても、ビタミン K と同様、ロミタピドによるキロミクロン形成阻害が薬物の吸収を変動させる可能性 (図 8) を考え、相互作用試験を行うことにした。

脂質異常症は様々な疾患のリスク因子となるが、心房細動もその一つであり、臨床において双方の治療薬の併用はよくみられる。アミオダロン (AMD) は心房細動に用いられ、かつ、VLDL/LDL に分布しやすい薬物であることから、AMD を主な相互作用試験の対象薬物とした。

2-1. ロミタピドの併用によりアミオダロンの血清中濃度は低下する

野生型マウスに対し、ロミタピドと AMD の連日経口投与試験を実施した。ロミタピド併用群では、対照群であるロミタピド非併用群 (AMD 単独投与群) と比べて、小腸上皮細胞中に中性脂肪やコレステロールが顕著に蓄積していること、これらの脂質の血清中濃度が有意に低かったことから、ロミタピド投与によるキロミクロンの形成阻害が示唆された。この条件において、AMD の血清中および VLDL/LDL 分画中濃度を測定した結果、上記脂質と同様に、ロミタピド併用群で対照群よりも有意に低かった (図 9)。また、小腸上皮細胞中の AMD 量はロミタピド併用群で多かった。

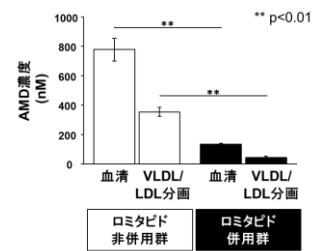


図9. ロミタピドの併用による血清中アミオダロン濃度の変動

2-2. ロミタピドの併用によりアミオダロンの吸収は抑制される

2-1 で認められた相互作用のメカニズムを検証するため、まず、ロミタピドが AMD の吸収過程に与える影響を評価した。ロミタピドを事前投与したマウスに対し、AMD を単回経口投与し、1、2 時間後の血中濃度推移を評価したところ、ロミタピド事前投与群ではロミタピド非投与群と比較して、血清中および VLDL/LDL 分画中の AMD の濃度上昇が有意に小さかった (図 10)。次に、ロミタピドが AMD の消失過程に与える影響を評価するため、ロミタピドを事前投与したマウスに対し、AMD を静脈内投与した後の血中濃度推移を評価したところ、AMD の消失半減期にロミタピド投与の影響は認められなかった。これらの結果から、ロミタピドと AMD の相互作用 (AMD の血中濃度の低下) は、主に AMD の吸収がロミタピドにより抑制されることで生じていると考えられた。

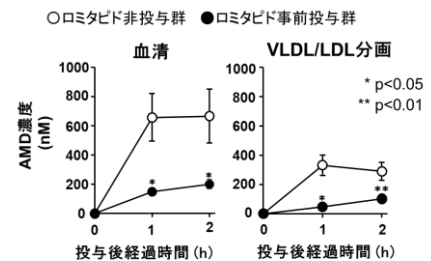


図10. ロミタピドの投与によるアミオダロンの吸収変動

【結論】

本研究から、細胞内薬物量の違いや、細胞内コンパートメントに対する作用の違いにより、遊離型と VLDL/LDL 分布型で薬効強度が異なる薬物が存在することが見出された。また、ロミタピドと VLDL/LDL に分布しやすい薬物の併用では、ロミタピドによる併用薬の吸収抑制を介して血中濃度が低下する可能性があることが明らかになった。これらのことから、脂質異常症治療薬による脂質代謝変動 (改善) が薬物動態に与える影響を考慮することや、薬物の VLDL/LDL への分布しやすさを含めた薬効評価を行うことが、より適切な薬物治療に繋がると考えられる。