

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 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>

LDL 受容体を介した VLDL/LDL 分布型薬物の細胞移行性は、受動拡散や輸送体で取り込まれる遊離型薬物の細胞移行性とは異なる可能性がある。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。そこで、本研究では VLDL/LDL 分布型薬物と遊離型薬物の細胞移行性や細胞内挙動（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、VLDL/LDL へ分布しやすく、薬効標的がリソソーム以外の細胞内コンパートメントにあるシクロスポリン A とテトラサイクリンを用いた。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 のインターロイキン 2（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

免疫抑制薬であるシクロスポリン A 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、各存在様式のシクロスポリン A 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。

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、遊離型と VLDL/LDL 分布型での 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シクロスポリン A 量を測定した

結果、VLDL/LDL 分布型群における細胞内シクロスポリン A 量は、遊離型群よりも多かった。また、細胞内シクロスポリン A 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。

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、テトラサイクリン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、細胞刺激時のテトラサイクリン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、遊離型テトラサイクリン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 分布型テトラサイクリンを添加した群では低下を認めた。

1-2B. 遊離型と 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、遊離型と VLDL/LDL 分布型でテトラサイクリンの細胞内代謝活性に与える影響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 細胞内のテトラサイクリン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り、テトラサイクリンの細胞内薬物量に違いは認められなかった。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テトラサイクリンの薬効としては、ミトコンドリア膜電位を評価した。また、リソソームに対するテトラサイクリンの影響としては、テトラサイクリンが塩基性薬物であることや、リソソーム pH の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、ミトコンドリア膜電位については、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。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。これらの結果から、テトラサイクリン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の違いに繋がっている可能性が考えられた。

<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>

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、アミオダロンを相互作用試験の主な解析対象薬物とした。

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、ロミタピドとアミオダロン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（アミオダロン単独投与群）と比べて、小腸上皮細胞中にコレステロールやトリグリセリド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、アミオダロンの血清中および 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ロミタピド非併用群よりも有意に低かった。また、小腸上皮細胞中のアミオダロン量はロミタピド併用群で多かった。

2-2. ロミタピドの併用によりアミオダロンの吸収は低下する

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、ロミタピドがアミオダロン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、アミオダロンを単回経口投与し、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 分画中のアミオダロンの濃度上昇が有意に小さかった。次に、ロミタピドがアミオダロン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アミオダロンを静脈内投与した後の血中濃度推移を評価したところ、アミオダロン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、ロミタピドとアミオダロンの相互作用（アミオダロンの血中濃度の低下）は、主にアミオダロンの吸収がロミタピドにより低下することで生じていると考えられた。

【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、VLDL/LDL 分布型と遊離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低下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。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。