

学位論文

創薬を目指した ABC トランスポーター輸送能評価に関する検討

2005 年

安達 弥永

本研究は、以下の原著論文に基づくものである。

Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative studies on *in vitro* methods for evaluating *in vivo* function of MDR1 P-glycoprotein. Pharm Res. 2001 Dec;18(12):1660-8.

Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the function of small intestinal P-glycoprotein: comparative studies between *in situ* and *in vitro*. Pharm Res. 2003 Aug;20(8):1163-9.

Adachi Y, Suzuki H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Role of breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen. Mol Pharmacol. 2005 Mar;67(3):923-8

目次

	頁
略号	5
序論	6
本研究の背景	6
本研究の目的	8
第一章 薬物の脳移行性における MDR1 輸送能の評価について	10
第一章 要約	13
第一章 緒言	14
第一章 結果	15
第一章 考察	17
第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について	33
第二章 要約	33
第二章 緒言	34
第二章 結果	35
第二章 考察	36
第三章 抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターの解析	50
第三章 要約	50
第三章 緒言	51
第三章 結果	52
第三章 考察	53
実験の部	66

結論	77
今後の展望	79
参考文献	85
謝辞	103

略号

ATP, adenosine triphosphate

ABC, ATP binding cassette

BBB, blood-brain barrier

BCRP (Bcrp), breast cancer resistant protein

$CL_{a,app}$, apparent membrane permeability clearance

CMC, carboxymethyl cellulose

$E_217\beta G$, 17β estradiol- 17β -D-glucuronide

EHBR, Eisai hyperbilirubinemic rat

F_a , absorbed fraction of ligands during the intestinal perfusion experiments

FBS, fetal bovine serum

ICD, intracellular domain

K_p , brain, brain-to-plasma concentration ratio

LC-MS/MS, high performance liquid chromatography equipped with triple stage mass spectrometer

LLC-MDR1, LLC-PK1 cells transfected with MDR1 cDNA

MDR (mdr), multidrug resistance

MRP (mrp), multidrug resistance associated protein

NBD, nucleotide binding domain

4MU, 4-methylumbelliferone

PCR, polymerase chain reaction

PET, positron emitting tomography

P-gp, MDR1 P-glycoprotein

PS product, the product of the apparent membrane permeability coefficient and the surface area

TMD, transmembrane domain

序論

本研究の背景（物質透過制御機構としての ABC トランスポーター）

ATP binding cassette（以下 ABC）トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーを駆動力として、広範囲に及ぶ基質を細胞内から細胞外に輸送する膜タンパクである。現在、ヒトにおいては49種の isozyme が同定されており、トランスポーターとしては最大の super family を形成している (1,2)。さらにこれらは配列、構造上の特徴から 7 つの subfamily に分類されている (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG)。いくつかの ABC トランスポーターは遺伝子疾患の責任因子であることも示されている (3,4)。

多くの ABC トランスポーター分子は、Walker A と Walker B モチーフ（両者は 90~120 アミノ酸離れて存在する）を有する ATP 結合ドメイン (NBDs) と膜貫通ドメイン (TMDs) から構成され、NBDs と TMDs をそれぞれ 2 つ持つ事で、輸送機能を発揮すると考えられている (5)。Walker A には、ATP の β リン酸基が結合する配列が、また、Walker B には Mg^{2+} と相互作用する配列が存在している (7,8)。その機能は不明であるが、Walker A と Walker B モチーフの間に C モチーフと呼ばれる配列 (ALSGGQ) も確認されている。詳細は「今後の展望」に記載するが、最近、バクテリアの ABC トランスポーターの X 線構造解析が報告され、NBD への ATP の結合、それに引き続く ATP の加水分解が、ABC トランスポーターの構造変化に大きな影響を与えており、駆動力と基質輸送のメカニズムが明らかにされつつある (8-11)。一般に、NBDs と TMDs をそれぞれ 2 つ持つ ABC トランスポーターは full transporter (fig.1A, B) と、また、それぞれ 1 つ持つ ABC トランスポーターは half transporter と呼ばれ (fig.1C)、half transporter はホモダイマーを形成し、基質輸送に関わるものと考えられている (12)。また、多くのヒト ABC トランスポーターは細胞内から細胞外へ 1 方向の輸送 (“unidirectional”な輸送) に携わっている。

この ABC トランスポーターに関する研究は、ガンにおける多剤耐性因子としての研究に端

を発している。すなわち、癌化学療法時に抗癌剤に対する耐性を獲得した細胞には、抗癌剤を排出するトランスポーターが過剰発現しており、この排出作用により細胞内の抗癌剤濃度が低下して、有効性の低下＝耐性を引き起こすことが古くから知られていた（現在では、この耐性獲得は解毒機構の変化やターゲット分子の変化など多様な要因も含まれることが明らかにされている）。株化細胞を用いた研究により、この様な排出作用を示す ABC トランスポーターとしてはじめて同定されたのが Multidrug resistance 1 (P-glycoprotein /ABCB1/MDR1) である (13)。次いで、Multidrug resistance associated protein 1 (ABCC1/MRP1) なる ABC トランスポーターが同定された (14)。現在では、8 種の MRP サブファミリーの存在が明らかにされているが、このうち耐性に関与するのは、MRP2, 3, 4 及び 5 の計 5 つであると考えられている (15-17)。さらに、最近では、MDR, MRP との基質認識性が若干異なる多剤耐性トランスポーター (ABCG2/BCRP) も同定され、機能解析が行われるに至っている (18,19)。臨床上、多剤耐性は治療効果を低下させる大きなファクターとして捉えられており、多剤耐性克服のための ABC トランスポーター阻害剤は modulator や chemosensitizer と呼ばれ、抗癌剤効果を高めるものとして臨床開発も進められている (21)。

一方、耐性に関与する主な ABC トランスポーターである MDR1, MRP1, MRP2 及び BCRP は通常の組織にも発現しており (fig.2)、毒性を引き起こす可能性のある外因性物質から、生体を防御してしている機能を有しているものと解釈されている (22-25)。MRP1 は、特に肺、精巣、腎、骨格筋に高発現しているが、肝においてその発現は低いとされている。また、MRP1 の発現部位が basolateral 側（細胞の基底膜側）であることから、基質を細胞内から血管側に排出しているものと考えられている (24)。それに対し、MDR1, MRP2 及び BCRP は上皮細胞の apical 側（細胞の頂上膜側）にのみ発現が認められている。組織を防御する上で重要な位置に発現して外因性物質により直接的に相互作用し、組織内への外因性物質の侵入を低減させているものと考えられる (22-25)。特に、血液脳関門、胎盤、肝臓、腎臓、

小腸において高発現している MDR1, MRP2 及び BCRP は、薬物の吸収、分布、排泄、代謝に対しても調節因子として働いている可能性が高い (26-29)。

本研究の目的

薬物は、その薬効を発現するために標的となる臓器に到達（分布）する必要があるが、前項で述べたように、脳、精巣、胎盤などには関門が存在し、容易に薬物が臓器に移行しないよう制御されている。このような関門は、化学物質（内因性、外因性）の進入に対する生体防御機能と考えられるが、医薬品開発においては、時に障害となる場合がある。例えば、脳毛細血管内皮細胞や choroid plexus は循環血から脳への薬物の移行を制限しており、血液脳関門 (Blood Brain Barrier, BBB) 及び脳脊髄液関門 (BCSFB) と呼ばれている (30,31)。

中枢薬の開発においては、候補化合物の脳移行性が必要であるが、この BBB や BCSFB により脳移行性が制限されれば、十分な薬効を発揮することが出来ない。逆に、中枢系への副作用が重篤となる場合には、BBB を透過できない候補化合物を開発すべきである。現在、BBB に存在する ABC トランスポーターとして、前述した MDR1, MRP2, BCRP などが同定されており、薬物の膜透過制御に関する研究が進められている。同様に、薬物が経口投与された場合、最初に膜透過が起こる小腸においてもいくつかの ABC トランスポーターの発現が報告されている。薬物が経口投与された場合、小腸で薬物が吸収されない限り、薬効の発揮は期待できないが、最近、ABC トランスポーターが、薬物の消化管吸収性を低下させていることが示されており、経口薬開発上の問題となっている (33)。ヒト小腸においても先に述べた MDR1, MRP2, BCRP が発現していることから、この課題の克服のためのターゲットトランスポーターと考えられている。さらに小腸には、栄養物質、アミノ酸、核酸など、生体恒常性維持のために必要な分子の吸収を行う、多くのトランスポーター/イオンチャンネルが発現していることも知られており、アミノ酸による構造修飾により吸収トランスポーターに認識させるなどの吸収性向上の検討もなされている (34)。この様な知

見の蓄積から、現在、創薬プロセスにおいても動態特性向上のために、薬物トランスポーターに関するスクリーニング試験を導入する動きが活発になっており、一部は既に創薬に生かされている (fig.3)。今後、安全な医薬品の開発とその適正な使用のためには、薬物トランスポーターを対象とした研究意義は非常に大きいと思われる。

以上に述べたように、本研究では、膜透過性の制御に関わっており、薬物動態への関与が大きいと考えられる ABC トランスポーターとして、第一に MDR1、次いで MRP2 並びに BCRP に焦点をあてた。その上で、「それらが脳と小腸においてどのような機能を有し、その輸送能力は *in vitro* から予測できるのか？」という観点から、ABC トランスポーター輸送能力評価方法の創薬へ応用すべく本研究を行った。まず、第一章では、薬物の脳移行性における MDR1 の関与について、*in vitro* の実験がマウス脳における *mdr1* の輸送能力を予測できるかどうか検討した。また、第二章では、薬物の消化管吸収における MDR1 の関与について検討した。さらに、第一章及び第二章では、これまで報告例のない *in vivo* (脳及び小腸) における MDR1 を介した輸送能力を *in vitro* 実験から以下に予測するか、理論的考察を行い、その方法の確立を目指した。最後に、第三章では抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターとして、MRP2 ならびに BCRP の寄与を明らかにすることを目的に検討を行った。

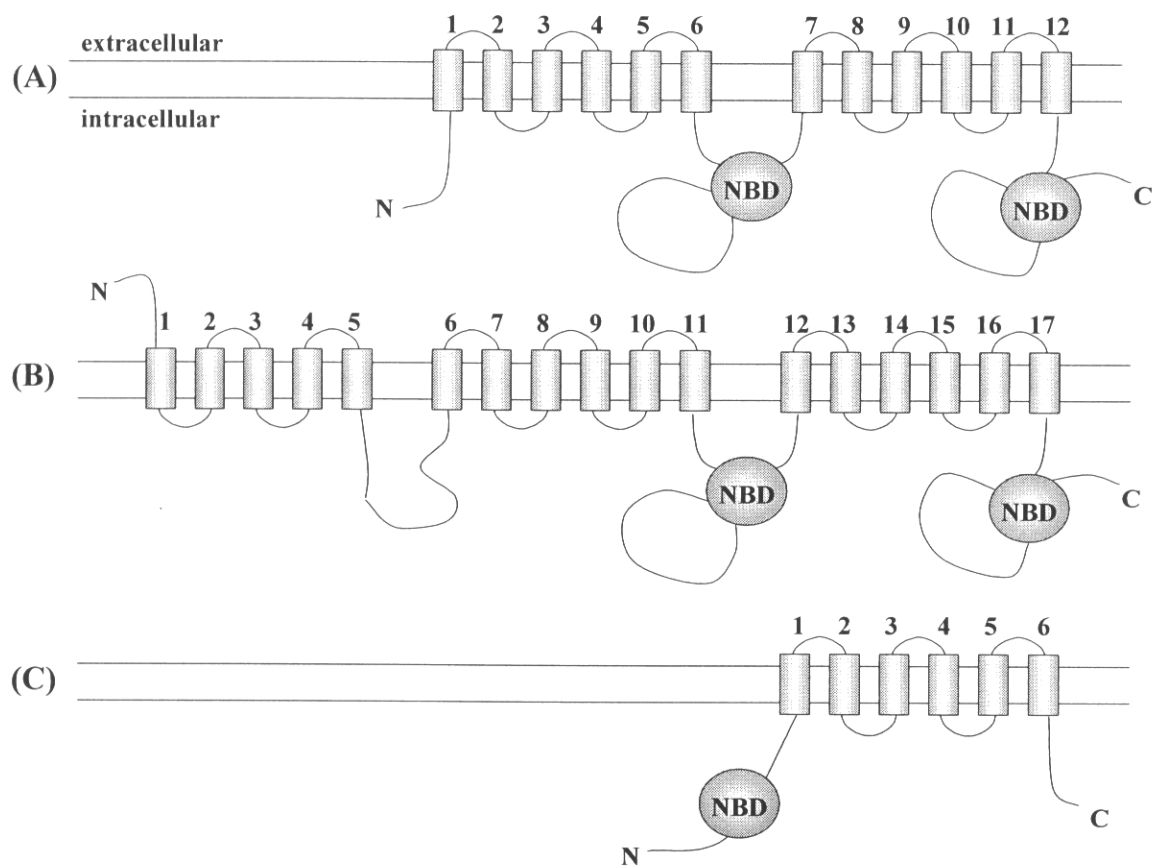


Fig.1 Molecular structure of ABC transporter.

Panel A, MDR1 has 12 TMD and two NBD; Panel B, Typical MRP transporters have five extra TMD towards the N terminal; Panel C, So-called half transporter BCRP has six TMD and one NBD.

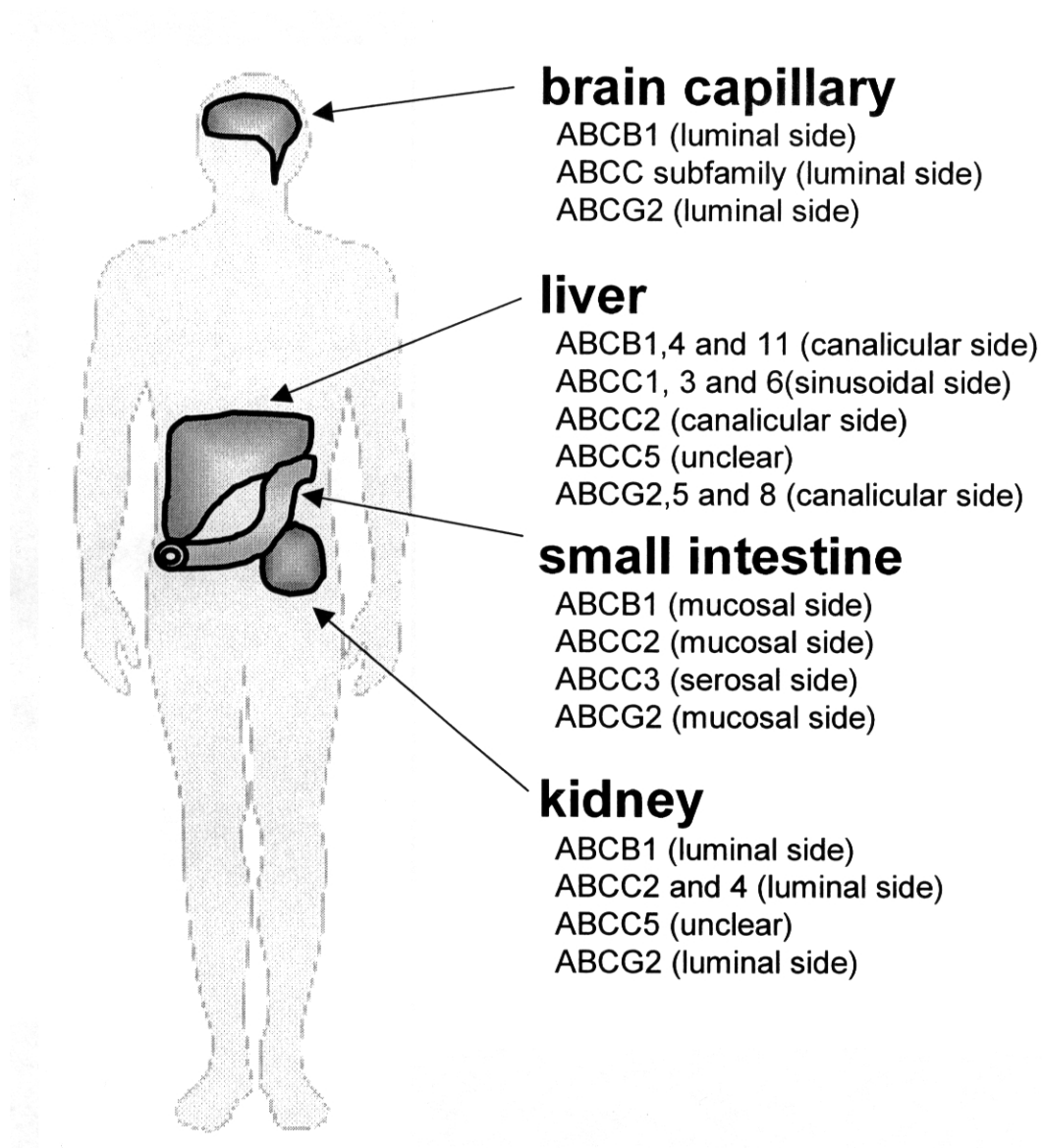


Fig.2 Tissue distribution of typical ABC transporters in human.

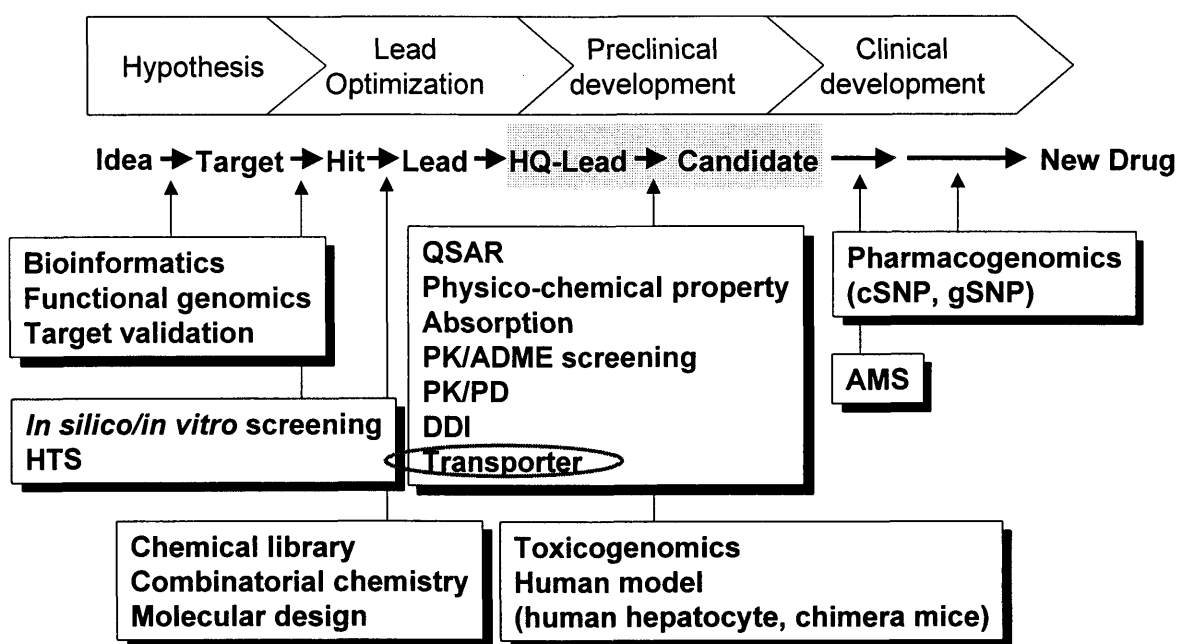


Fig.3 Employment of transporters study in drug development.

第一章 薬物の脳移行性における MDR1 輸送能の評価について

第一章 要約

目的

MDR1 は薬物の体内動態に深く関与することが知られており、この輸送能力を定量的に理解することは、医薬品の開発とその適正使用に重要であると考えられる。本研究では、*in vitro* 実験から見積もられた MDR1 の輸送能力を *in vivo* にいかに外挿すべきか検討した。

方法

In vitro 実験として、12 化合物を用いて、MDR1 発現細胞と Caco-2 細胞の単層膜を介した経細胞輸送実験を行った。また、この 12 化合物が、ATP の加水分解速度を亢進させるかどうか、MDR1 を発現した plasma membrane を用いて検討した。*In vivo* 実験としては、mdr1a/1b ノックアウトマウスとコントロールマウスにおける脳対血漿中濃度比 (K_p, brain) を求めた。

結果

In vitro での MDR1 発現細胞単層膜を介した経細胞輸送実験で算出した flux ratio と *in vivo* 実験から求めた $K_p, \text{brain ratio}$ の間には良好な相関関係が認められた。しかしながら、ATP の加水分解を促進した化合物は MDR1 による輸送が確認されたものの、ATP の加水分解を示さないいくつかの化合物でも、MDR1 発現細胞を用いた実験では MDR1 により輸送されるという矛盾点も見出された。

結論

MDR1 発現細胞を用いて求めた *in vitro* flux ratio は、*in vivo* での MDR1 輸送能を予測できるパラメーターであることが示された。また、ATP 加水分解を指標した *in vitro* 実験は、MDR1 の基質を開発化合物から除くためのスクリーニングに用いることが可能であると考えられ

た。

第一章 緒言

MDR1 は、多剤耐性を獲得した腫瘍細胞中から最初に単離された ABC トランスポーターであり、さまざまな構造の抗癌剤を腫瘍細胞中から排出する機能を有することが明らかにされている (35, 36)。現在では、MDR1 は多くの正常組織 (脳, 小腸, 肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣など) にも発現し、薬物の体内動態において重要であることが示されている (13, 37, 38)。当初、株化細胞による *in vitro* 実験で MDR1 の輸送能力が解析されてきたが、*mdr1* ノックアウトマウスの創出により *in vivo* におけるその重要性が示されるようになった (39)。特に、MDR1 の基質となる薬物は、消化管吸収性や脳移行性がコントロールマウスで有意に低下していることが、正常マウスと *mdr1* ノックアウトマウスとの比較により明らかにされてきた (40)。さらに、ivermectin の中枢毒性が *mdr1* ノックアウトマウスにより著しく増強する例などから、毒性への関与も指摘されるに至っている (41)。最近、マウスのみならず、ヒトにおいても、*MDR1* 遺伝子の一塩基置換 (SNPs) が小腸での MDR1 発現量の低下に起因しており、排出能力の低下のために digoxin の血中濃度が増加するという報告がなされている (42)。さらに、MDR1 の modulator との併用投与において、MDR1 基質の消化管吸収性や脳移行性が増加することも報告されている (43, 44)。臨床における多剤併用による薬物動態の変動は、時に医療事故を引き起こす場合が知られており (薬物相互作用)、医薬品の適正使用の面からも、MDR1 の関与を定量的に理解することが重要であると考えられる (45-48)。

近年、いくつかの *in vitro* 実験により MDR1 の基質認識性を評価しようとする試みがなされている。本研究では、MDR1 の輸送能力を定量的に評価するための *in vitro* 実験を行い、*in vivo* で見積もられた MDR1 輸送能力と比較した。*In vitro* 実験では、代表的な MDR1 の基質

(substrate) 及び非基質 (poor substrate) を使い, MDR1 を発現している Caco-2 細胞や LLC-PK1 細胞を用いた経細胞輸送実験, バキュロ発現系で作製された plasma membrane を用いた ATP 加水分解実験を行った。このような *in vitro* 実験から得られたヒト MDR1 輸送能力を, *in vivo* でのマウス脳毛細血管内皮細胞に発現している *mdr1* の輸送能力と比較して, *in vivo* を予測できるのはどのような *in vitro* 実験であるか, また, それらをいかに評価すべきかについて検討を行った。

第一章 結果

細胞単層膜を用いた経細胞輸送実験

Fig.4 に Caco-2 細胞単層膜を介した 12 化合物の輸送活性の時間依存性を示した。また, Table 1 には輸送活性とその比 (flux ratio) をまとめた。同様に, fig.5 には MDR1 発現細胞 (LLC-MDR1 細胞) ならびにコントロール細胞である LLC-PK1 細胞単層膜を介した 12 化合物の輸送活性の時間依存性を示した。Table 2 にはこの結果に加え, corrected flux ratio をまとめた。過去の報告同様, MDR1 の良好な基質として知られる digoxin や quinidine では basal to apical 方向の輸送活性が, その逆向きの apical to basal 方向の輸送活性より有意に高いことが確認された。反対に, MDR1 の基質ではない progesterone や estradiol 17 β -D-glucuronide などの輸送においては, basal to apical, apical to basal 両方向の輸送活性はほぼ同程度であった。本実験で確認された基質認識性は, これまでの報告と一致していた。実質的に, Caco-2 細胞と LLC-MDR1 細胞で測定された基質のなりやすさを示す flux ratio のランクオーダーは, 両細胞間で同程度であった。定量的に輸送活性を比較するために, Caco-2 細胞と LLC-MDR1 細胞で算出された flux ratio の相関性を図示した (fig.6)。この図から明らかなように, 2 つの細胞間の flux ratio は有意な相関関係にあった。相関の回帰直線が LLC-MDR1 細胞側に偏っている原因は, Caco-2 細胞に比べ LLC-MDR1 発現細胞において

MDR1 の発現量が高いことを示唆しているものと考察された。

ATP 加水分解実験

その他の *in vitro* 評価系として、上記実験で用いた 12 化合物の ATP 加水分解の促進作用、すなわち、ATP 加水分解速度に与える被験物質の濃度依存性を測定した (fig.7, table 3)。本検討には、MDR1 の cDNA を組み込んだバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞から調製した plasma membrane を用いた。被験物質のない状態では、ATP 加水分解速度は 3~6 nmol Pi/min/mg protein であったが、cyclosporin A や quinidine を添加した場合濃度依存的に ATP 加水分解を促進し、その V_{\max}/K_m は、それぞれ 31.1 ± 3.7 及び 3.24 ± 0.58 mL/min/mg protein であった。逆に、MDR1 発現細胞を介した経細胞輸送実験で MDR1 の良好な基質と判定された digoxin や loperamide は、ATP 加水分解の促進作用が小さかった。また、いくつかの化合物では、高濃度で ATP 加水分解への阻害作用を示すことが明らかとなった。

Mdr1a/1b ノックアウトマウスを用いた組織分布実験

Daunomycin, progesterone 及び diazepam の組織分布を、正常マウスと mdr1a/1b ノックアウトマウス (以下 mdr1 ノックアウトマウス) で測定した (fig.8)。Mdr1 ノックアウトマウスにおける daunomycin の脳対血漿中濃度比 (K_p , brain) は 1.63 ± 0.08 であり、正常マウス (0.91 ± 0.01) に比べ有意に高かった。この結果は、*in vitro* における MDR1 発現細胞を介した経細胞輸送実験で得られた結果から予想されたものであった。また、肝臓や腎臓への組織分布において、正常マウスと mdr1 ノックアウトマウスの間に有意差は認められなかった。他方、progesterone 及び diazepam の K_p , brain を測定した結果、正常マウスと mdr1 ノックアウトマウスの間に有意差は認められなかった。この結果も *in vitro* での MDR1 発現細胞を用いた実験結果と一致するものであった。その他、過去の報告において見積もられた情報も加え、種々化合物の k_p , brain ratio を table 4 にまとめた。

In vitro と in vivo 実験間の相関性について

In vivo における MDR1 の輸送機能はどのような *in vitro* 実験から予測されるかを定量的に議論するために、各実験系から得られた結果の相関性を検討した (fig.9)。Caco-2 細胞または LLC-MDR1 細胞から調製した単層膜を用いて測定した *in vitro* flux ratio は、ノックアウトマウスを用いて測定した $K_{p,brain}$ ratio と有意な相関を示した。最も高い相関性を示したのは、LLC-MDR1 細胞を用いた場合 (この時、MDR1 発現細胞における flux ratio をコントロール細胞の flux ratio で補正した corrected flux ratio によって評価した) であった。ATP 加水分解を指標とした場合、*in vivo* との有意な相関性は見出されなかった。

第一章 考察

本研究では、*in vivo* での MDR1 輸送 (特に BBB において) を予測できるもっとも信頼性の高い実験系は何かというポイントに焦点を絞り、いくつかの実験から得られたパラメーターの比較検討を行った。*In vivo* BBB における MDR1 輸送を定量的に記述しうるパラメーターとして $K_{p,brain}$ を定義した。MDR1 輸送能力を単純化して数値化するため、ノックアウトマウスにおける $K_{p,brain}$ を正常マウスにおける $K_{p,brain}$ で補正することにより、各テスト化合物の血中蛋白結合、脳組織への結合やその他のトランスポーターの影響をキャンセルすることができるものと仮定した。相関図で示したように、このパラメーター ($K_{p,brain}$ ratio) は、*in vitro* 経細胞輸送実験で求めた corrected flux ratio (または flux ratio) と相関関係にあることが明らかとなった。

この評価方法の妥当性について考察したい。まず、scheme 1 に示したように、pharmacokinetic model によってコントロール細胞である LLC-PK1 細胞を介した膜透過クリアランス ($PS_{a \rightarrow b}$ 及び $PS_{b \rightarrow a}$) は以下の式で定義される。

$$PS_{a \rightarrow b} = PS_{a, \text{inf}} \times \frac{PS_{b, \text{eff}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}}} \quad (1)$$

$$PS_{b \rightarrow a} = PS_{b, \text{inf}} \times \frac{PS_{a, \text{eff}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}}} \quad (2)$$

ここで、 $PS_{a, \text{inf}}$ 及び $PS_{a, \text{eff}}$ は LLC-PK1 細胞 apical 側膜を介した influx 及び efflux 方向の透過クリアランスを示す。同様に、 $PS_{b, \text{inf}}$ 及び $PS_{b, \text{eff}}$ は basal 側膜を介した influx 及び efflux 方向の透過クリアランスを示す。

また、以下に flux ratio を定義した。

$$\text{Flux ratio} = \frac{PS_{b \rightarrow a}}{PS_{a \rightarrow b}} \quad (3)$$

したがって、式 1 及び式 2 を式 3 に代入すると、コントロール細胞における flux ratio は以下のように記述される。

$$\text{Flux ratio} = \frac{PS_{b, \text{inf}} \times PS_{a, \text{eff}}}{PS_{a, \text{inf}} \times PS_{b, \text{eff}}} \quad (4)$$

他方、Caco-2 細胞や LLC-MDR1 細胞など、MDR1 を発現している細胞では、膜透過クリアランス及び flux ratio は、次の式で与えられる。

$$PS_{a \rightarrow b} = PS_{a, \text{inf}} \times \frac{PS_{b, \text{eff}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}} + PS_{P - gp}} \quad (5)$$

$$PS_{b \rightarrow a} = PS_{b, \text{inf}} \times \frac{PS_{a, \text{eff}} + PS_{P - gp}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}} + PS_{P - gp}} \quad (6)$$

$$\text{Flux ratio} = \frac{PS_{b, \text{inf}} \times (PS_{a, \text{eff}} + PS_{P - gp})}{PS_{a, \text{inf}} \times PS_{b, \text{eff}}} \quad (7)$$

ここで、 $PS_{P - gp}$ は MDR1 に基づく輸送クリアランスである。さらに LLC-MDR1 細胞の flux ratio をコントロール細胞の flux ratio で補正することにより、corrected flux ratio を定義すると、膜透過の素過程における受動拡散に基づく各クリアランスがキャンセルされ、以下の簡略化された式が与えられた。

$$\text{Flux ratio} = 1 + \frac{PS_{P - gp}}{PS_{a, \text{eff}}} \quad (8)$$

同様に、mdr1 ノックアウトマウス脳毛細血管内皮細胞を介した血液から脳への透過と脳か

ら血液への輸送についても、膜透過クリアランスを定義した。

$$PS_{blood\ to\ brain} = PS_{l,inf} \times \frac{PS_{al,eff}}{PS_{l,eff} + PS_{al,eff}} \quad (9)$$

$$PS_{brain\ to\ blood} = PS_{al,inf} \times \frac{PS_{l,eff}}{PS_{l,eff} + PS_{al,eff}} \quad (10)$$

ここで、 $PS_{l,inf}$ 及び $PS_{l,eff}$ は脳毛細血管内皮細胞の luminal 側膜を介した influx 及び efflux 方向の透過クリアランスを示す。同様に、 $PS_{al,inf}$ 及び $PS_{al,eff}$ は脳毛細血管内皮細胞の anti-luminal 側膜を介した influx 及び efflux 方向の透過クリアランスを示す。

Kp_{brain} は消失過程において、 $PS_{blood\ to\ brain}$ と $PS_{brain\ to\ blood}$ で示され、以下の式で定義される。

$$Kp_{brain} = \frac{PS_{blood\ to\ brain}}{PS_{brain\ to\ blood}} = \frac{PS_{l,inf} \times PS_{al,eff}}{PS_{al,inf} \times PS_{l,eff}} \quad (11)$$

また、正常マウスでも、膜透過クリアランス、 Kp_{brain} を定義し、*mdr1* ノックアウトマウスにおける Kp_{brain} を正常マウスの Kp_{brain} で除した比 $Kp_{brain\ ratio}$ は以下の式で与えられる。

$$Kp_{brain\ ratio} = 1 + \frac{PS_{p-gp}}{PS_{l,eff}} \quad (12)$$

ここで、式 8 と 12 を比較すると、両者とも同じ式の形であることが分かる。したがって、corrected flux ratio と $Kp_{brain\ ratio}$ を直接プロットした場合、それぞれのパラメーターが等しいと仮定すると、1 : 1 の関係になりうることが示された。実際、これらのパラメーターは、有意な相関性を示すことが実験的にも明らかになったが、この相関図において、回帰直線が *in vivo* データ側に傾いている（1 : 1 ではない）。式 8 と 12 の比較から、この理由は、MDR1 の発現量もしくは intrinsic な輸送活性が *in vivo* で高いためか、あるいは、受動拡散による膜透過性が *in vivo* で低いためか、いずれかであると考察された。また、今回の検討で、*in vitro* 実験（ヒト発現系）と *in vivo* 実験（マウス）の間に良好な相関関係が見出されたことから判断し、今回用いた化合物に限って言えば、明確な種差が認められなかった。しかしながら、種差に関しては、より多くの化合物で評価すべき問題であり、さら

なる検討が必要であると考えている。

本研究で得られた結果と同様の相関性について、Yamazaki らのグループからも報告がなされた (49)。すなわち、*in vivo* Kp,brain ratio がマウス *mdr1a* を発現した LLC-PK1 細胞の flux ratio と良好な相関性を示すという報告である。しかしながら、ヒト MDR1 発現細胞とマウス *mdr1a* 発現細胞での flux ratio (*in vitro* 実験間での比較) では相関性が若干低く、結果として、ヒト MDR1 発現系と *in vivo* Kp,brain ratio の相関性がマウス発現系でのそれと比べ、低下していると報告している。この結果を Yamazaki らは、種差として捕らえているが、検討に用いた化合物の多くは未公表であり、本研究との比較を行うことはできなかった (49)。

さらに、corrected flux ratio のみならず Caco-2 細胞や MDR1 発現細胞から求めた flux ratio と *in vivo* Kp,brain ratio の間にも、有意な相関性が認められた。もし、テスト化合物の輸送に他のトランスポーターの関与が無ければ、式 7 は式 8 に簡略化される。したがって、このような場合には、*in vivo* Kp,brain ratio と相関性が見られるのは妥当であると考えられる。

実際、Caco-2 細胞で求めた flux ratio と *in vivo* Kp,brain ratio の相関係数は 0.812 ($p < 0.01$) であり、MDR1 発現細胞で求めた flux ratio と *in vivo* Kp,brain ratio の相関係数 0.869 ($p < 0.01$) と比較すると、相関係数は低下が認められた。このことは、今回検討したテスト化合物の *in vitro* 発現細胞を介した膜輸送には、MDR1 以外の何らかのトランスポーターが関与しており、その関与はコントロール細胞での補正である程度補正可能であるものと解釈された。

本検討では、ATP の加水分解を指標とした MDR1 輸送能力と *in vivo* Kp,brain ratio との関係についても検討した。ATP 加水分解の濃度依存性を検討した結果、*digoxin* や *vinblastine* で、高濃度で ATP 加水分解を阻害する傾向を示した (50, 51)。この理由は明らかではないが、脂溶性の高い化合物などは、MDR1 を発現している昆虫細胞由来の plasma membrane の流動性を変化させる可能性があり、ATP の加水分解反応を阻害する可能性が考えられた (52, 53)。また、テスト化合物自身が、ATP の加水分解の inhibition site に結合することに起因している可能性も考えられた。次いで、テスト化合物の ATP 加水分解促進作用を定量的に評

価するため、ミカエリスメンテン式により K_m と V_{max} を求めた結果、得られた K_m は過去の報告と比べ comparable なものであった。Dexamethasone や PSC833 のような化合物では、MDR1 発現細胞による経細胞輸送実験で MDR1 基質であると判定されたにも関わらず、ATP の加水分解に影響を与えなかった。このような矛盾点の解明には、ATP 加水分解と基質輸送のカップリングに関するより詳細な分子機構の検討が必要であると考えられた (54, 55)。このような矛盾点に加え、パラメーターとして次元 (単位) が異なる、ATP の加水分解を指標 (V_{max}/K_m) とした MDR1 輸送能力と *in vivo* K_{p,brain} ratio (透過クリアランス比) とを直接比較することは困難であり、何らかの膜透過性で補正するなど評価方法を考察する必要があると考察された。しかしながら、本検討で、ATP の加水分解を促進したすべての化合物は MDR1 の基質であったことから、例えば、MDR1 基質を候補化合物中から除きたいといったスクリーニングに際しては、本実験系が適用可能であると考えられた。

以上、本研究の成果として、*in vivo* の MDR1 輸送能力を *mdr1* ノックアウトマウス/正常マウスの K_{p, brain} ratio として数値化した結果、LLC-MDR1/LLC-PK1 細胞もしくは Caco-2 細胞を用いた経細胞輸送実験で求めた corrected flux ratio, または単純に LLC-MDR1 もしくは Caco-2 細胞で求めた flux ratio から定量的に予測できることが示された。このような予測性は、pharmacokinetic model をベースとした理論的な考察によって説明でき、脳への薬物移行性を予測するための、有効な評価系であると考えられた。また、ATP 加水分解の促進させる作用を指標とした評価方法と *in vivo* の MDR1 輸送能力とは有意な相関関係は見出されず、ATP 加水分解の促進作用と基質輸送の関係には例外的な化合物が存在することが示された。今後、MDR1 の基質輸送メカニズムが解明されることにより、本検討で認められた矛盾点が説明されるものと期待される。

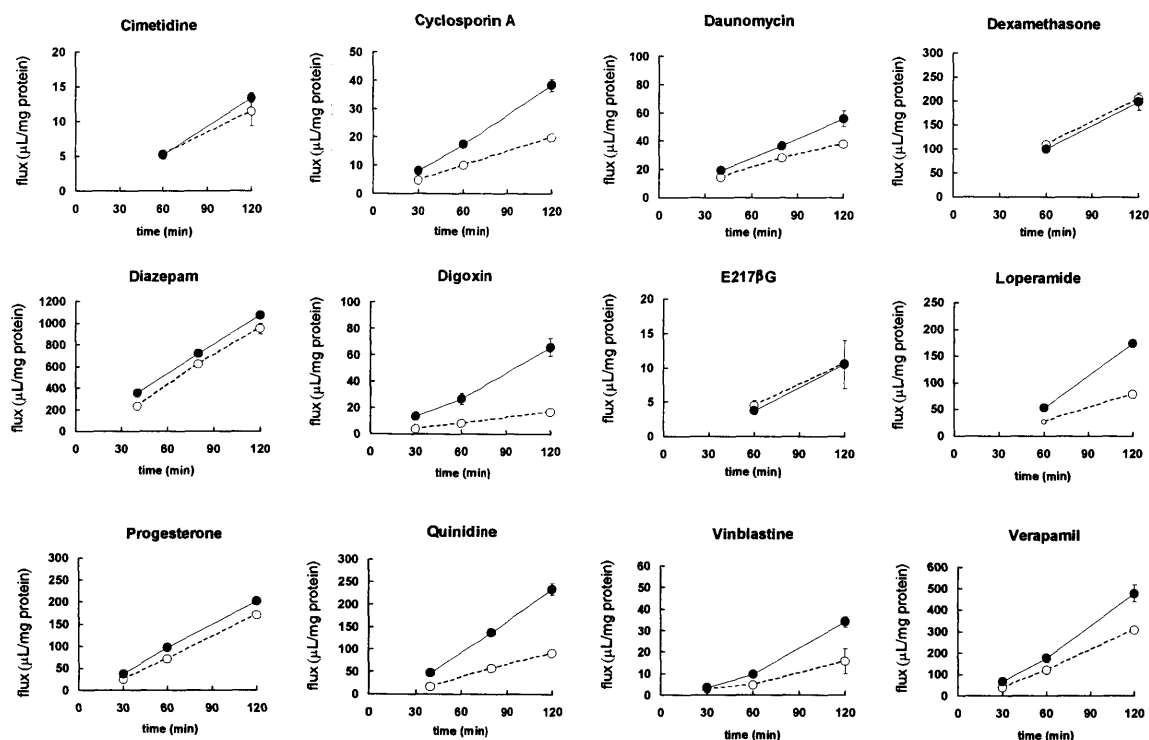


Fig.4 Time profiles for the transcellular transport of 12 compounds across Caco-2 monolayers.

Transcellular transport of 12 compounds across Caco-2 monolayers was determined as a function of time. The ligand concentrations used in these experiments are described in the text. The ordinate represents the volume of distribution ($\mu\text{L}/\text{mg protein}$), which was obtained by the amount of ligand transferred to the acceptor side divided by the initial concentration of ligand on the donor side. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. of three independent experiments. Key: open circle, apical-to-basal flux; closed circle, basal-to-apical flux.

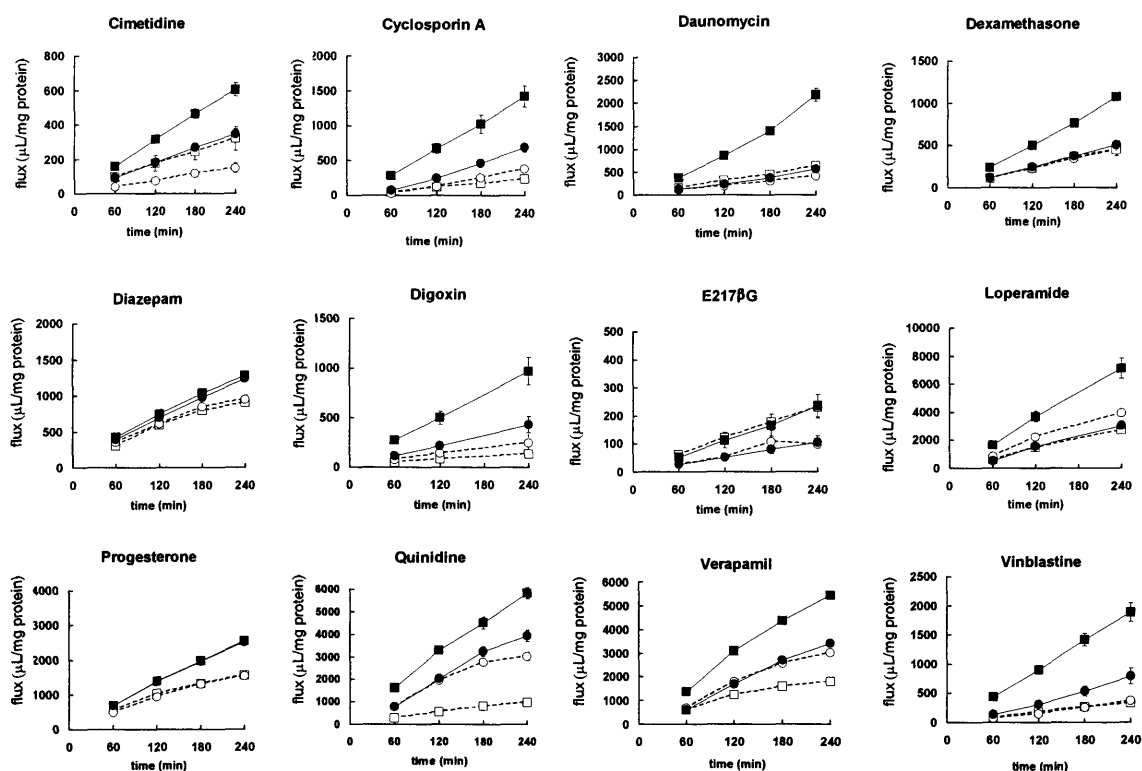


Fig.5 Time profiles for the transcellular transport of 12 compounds across LLC-PK1 monolayers.

Transcellular transport of 12 compounds across LLC-PK1 and LLC-MDR1 monolayers was determined as a function of time. The ligand concentrations used in these experiments are described in the text. The ordinate represents the volume of distribution ($\mu\text{L}/\text{mg}$ protein), which was obtained from the amount of ligand transferred to the acceptor side divided by the initial concentration of ligand on the donor side. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. of three independent experiments. Key: open circle, apical-to-basal flux across LLC-PK1; closed circle, basal-to-apical flux across LLC-PK1; open square, apical-to-basal flux across LLC-MDR1; closed square, basal-to-apical flux across LLC-MDR1.

Table 1 Kinetic parameters for penetration across Caco-2 monolayers.

Based on the results shown in Fig. 4, the PS products and flux ratio across Caco-2 monolayer were calculated. The results are shown as the mean \pm S.E. The S.E. was calculated according to the law of propagation of error.

Test compounds	PS _{a-to-b}	PS _{b-to-a}	flux ratio
	($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)	($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)	
Cimetidine	0.0953 \pm 0.0099	0.112 \pm 0.003	1.17 \pm 0.13
Cyclosporine A	0.166 \pm 0.001	0.319 \pm 0.010	1.92 \pm 0.06
Daunomycin	0.316 \pm 0.004	0.467 \pm 0.027	1.48 \pm 0.09
Dexamethasone	1.71 \pm 0.13	1.66 \pm 0.03	0.968 \pm 0.076
Diazepam	7.90 \pm 0.16	8.81 \pm 0.18	1.11 \pm 0.03
Digoxin	0.138 \pm 0.007	0.549 \pm 0.033	3.98 \pm 0.31
E ₂ 17 β G	0.0883 \pm 0.002	0.0875 \pm 0.017	0.991 \pm 0.193
Loperamide	0.654 \pm 0.035	1.45 \pm 0.03	2.21 \pm 0.13
Progesterone	1.43 \pm 0.10	1.68 \pm 0.12	1.18 \pm 0.12
Quinidine	0.760 \pm 0.025	1.95 \pm 0.06	2.56 \pm 0.12
Verapamil	2.56 \pm 0.07	3.99 \pm 0.19	1.56 \pm 0.09
Vinblastine	0.132 \pm 0.028	0.283 \pm 0.012	2.15 \pm 0.46

Table 2 Kinetic parameters for the penetration across LLC-PK1 monolayers.

Based on the results shown in Fig. 5, PS products, flux ratio and corrected flux ratio across LLC-PK1/LLC-MDR1 were calculated. The results are shown as the mean \pm S.E. The S.E. was calculated according to the law of propagation of error.

Test compounds	LLC-PK1			LLC-MDR1			corrected flux ratio
	PSa-to-b	PSb-to-a	flux ratio	PSa-to-b	PSb-to-a	flux ratio	
	($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)	($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)		($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)	($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)		
Cimetidine	0.620 \pm 0.110	1.44 \pm 0.12	2.34 \pm 0.46	1.32 \pm 0.28	2.51 \pm 0.16	1.90 \pm 0.42	0.810 \pm 0.237
Cyclosporine A	1.59 \pm 0.12	2.87 \pm 0.25	1.81 \pm 0.21	0.98 \pm 0.07	5.94 \pm 0.62	6.09 \pm 0.78	3.37 \pm 0.59
Daunomycin	1.75 \pm 0.04	2.35 \pm 0.03	1.34 \pm 0.03	2.64 \pm 0.27	9.08 \pm 0.61	3.45 \pm 0.42	2.57 \pm 0.32
Dexamethasone	1.85 \pm 0.05	2.12 \pm 0.14	1.15 \pm 0.09	1.89 \pm 0.19	4.49 \pm 0.16	2.38 \pm 0.25	2.08 \pm 0.28
Diazepam	3.94 \pm 0.26	5.15 \pm 0.01	1.31 \pm 0.09	3.78 \pm 0.03	5.32 \pm 0.09	1.41 \pm 0.03	1.08 \pm 0.08
Digoxin	1.03 \pm 0.21	1.80 \pm 0.21	1.74 \pm 0.40	0.560 \pm 0.058	4.03 \pm 0.33	7.29 \pm 0.94	4.20 \pm 1.11
E ₂ 17 β G	0.410 \pm 0.023	0.440 \pm 0.092	1.07 \pm 0.23	0.960 \pm 0.162	0.980 \pm 0.17	1.02 \pm 0.25	0.950 \pm 0.306
Loperamide	16.4 \pm 0.4	12.7 \pm 0.9	0.78 \pm 0.06	11.3 \pm 0.1	29.7 \pm 3.1	2.62 \pm 0.27	3.38 \pm 0.43
Progesterone	6.44 \pm 0.36	10.5 \pm 0.1	1.62 \pm 0.09	6.48 \pm 0.21	10.7 \pm 0.3	1.64 \pm 0.08	1.01 \pm 0.08
Quinidine	12.6 \pm 0.8	16.4 \pm 1.1	1.30 \pm 0.12	4.07 \pm 0.03	24.4 \pm 1.0	5.99 \pm 0.26	4.59 \pm 0.46
Verapamil	12.5 \pm 0.1	14.2 \pm 0.3	1.14 \pm 0.03	7.51 \pm 0.14	22.7 \pm 0.7	3.02 \pm 0.11	2.66 \pm 0.12
Vinblastine	1.56 \pm 0.09	3.30 \pm 0.33	2.12 \pm 0.25	1.39 \pm 0.01	7.88 \pm 0.68	5.65 \pm 0.48	2.66 \pm 0.39

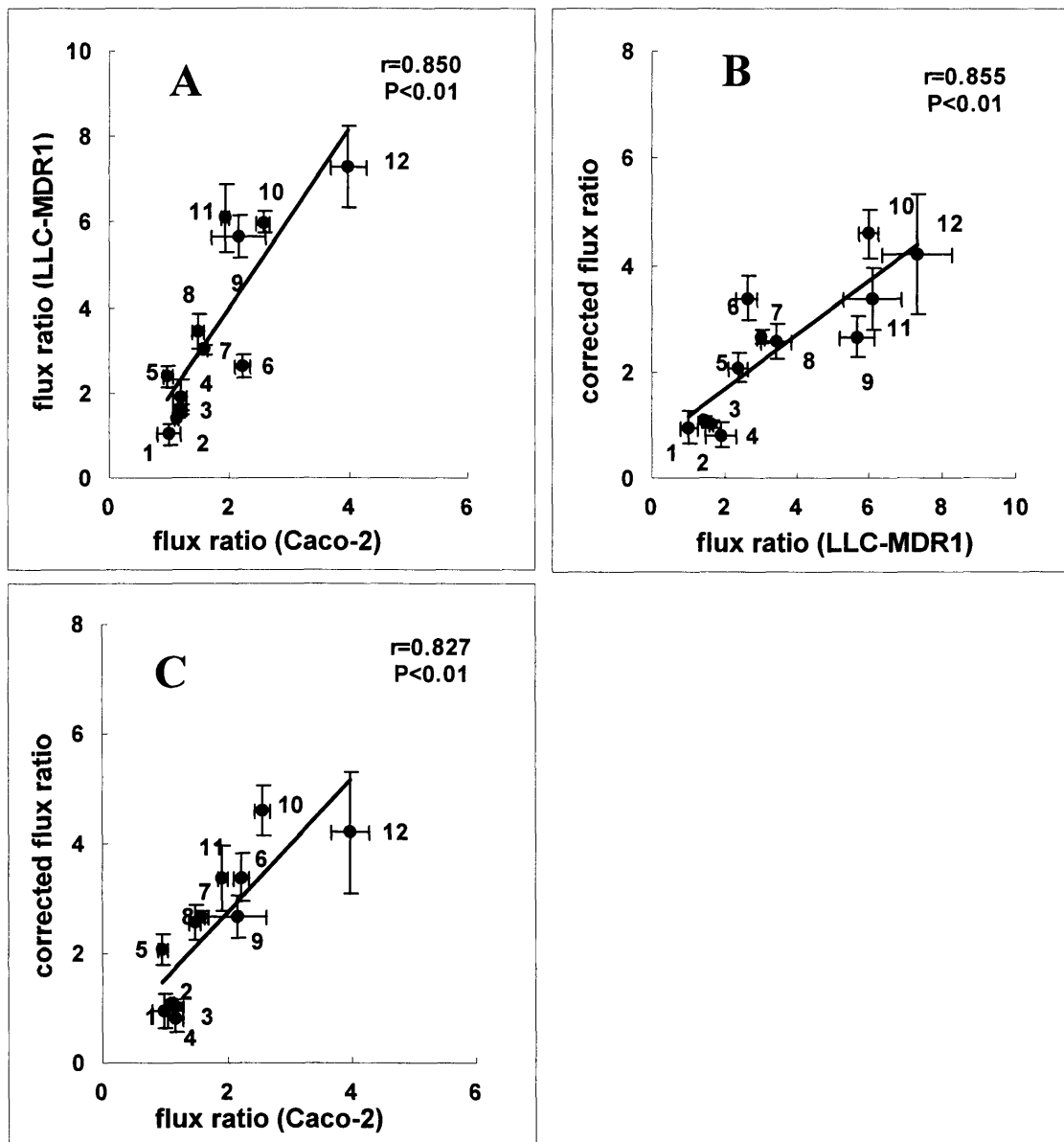


Fig.6 Correlation of the flux between Caco-2 and LLC-PK1 monolayers.

Based on the results shown in Figs. 4 and 5, the correlation of the flux between Caco-2 and LLC-PK1 monolayers was examined. Panel A, Correlation between the flux ratio in Caco-2 and that in LLC-MDR1. Panel B, Correlation between the flux ratio and the corrected flux ratio in LLC-PK1 and LLC-MDR1. Panel C, Correlation between the flux ratio in Caco-2 and the corrected flux ratio in LLC-PK1/LLC-MDR1. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. which was calculated according to the law of propagation of error. Key: 1, $E_217\beta G$; 2, diazepam; 3, progesterone; 4, cimetidine; 5, dexamethasone; 6, loperamide; 7, verapamil; 8, daunomycin; 9, vinblastine; 10, quinidine; 11, cyclosporin A; 12, digoxin.

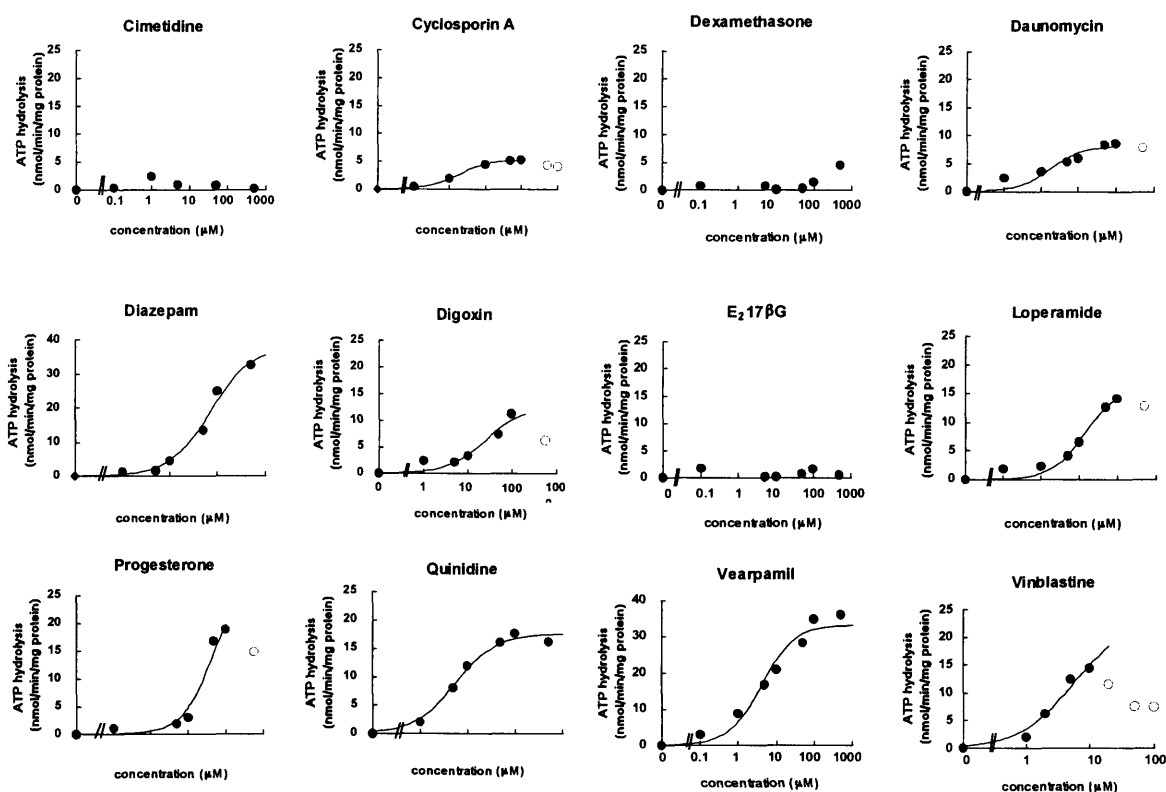


Fig.7 Effect of 12 compounds on ATP-hydrolysis by P-gp.

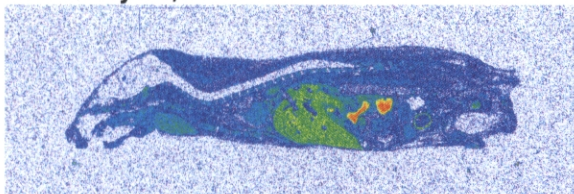
Concentration-dependent effect of 12 compounds on the ATP hydrolysis in the membrane fraction from High Five cells expressing P-gp was determined as a function of the medium concentration. The membrane fraction (40 μg protein / 60 μL medium) was incubated for 20 min at 37 °C to determine the amount of inorganic phosphate released from 4 mM ATP. The data were fitted to the Michaelis-Menten equation to determine the estimated concentration for half-maximum activation and the maximum activation. Solid line represents the fitted line and the closed symbols represent the data used for the analysis. Data with the open symbols were not used for the analysis. Each point represents the mean of two independent experiments.

Table 3 Kinetic parameters for ATP hydrolysis.

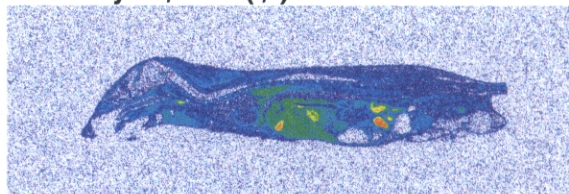
Data shown in Fig. 7 were analyzed according to the Michaelis-Menten equation to determine the apparent V_{\max} and K_m values. The results are shown as the mean \pm computer calculated S.E. Silent refers to a substrate that does not alter the P-gp mediated ATP-hydrolysis.

	K_m (μ M)	V_{\max} (nmol Pi/min/mg protein)	V_{\max}/K_m (mL/min/mg protein)
Cyclosporin A	0.170 \pm 0.020	5.29 \pm 0.09	31.1 \pm 3.7
Daunomycin	1.74 \pm 1.08	8.17 \pm 0.92	4.70 \pm 2.96
Diazepam	72.4 \pm 16.5	38.2 \pm 2.9	0.527 \pm 0.127
Digoxin	25.9 \pm 18.1	12.7 \pm 4.0	0.490 \pm 0.375
Loperamide	13.8 \pm 4.4	16.0 \pm 1.5	1.16 \pm 0.38
Progesterone	53.6 \pm 30.7	30.4 \pm 7.8	0.568 \pm 0.357
Quinidine	5.42 \pm 0.95	17.6 \pm 0.6	3.24 \pm 0.58
Verapamil	4.06 \pm 1.38	33.2 \pm 3.0	8.18 \pm 2.87
Vinblastine	5.71 \pm 3.20	23.7 \pm 6.5	4.15 \pm 2.59
Cimetidine	silent	silent	-
Dexamethasone	silent	silent	-
E ₂ 17 β G	silent	silent	-

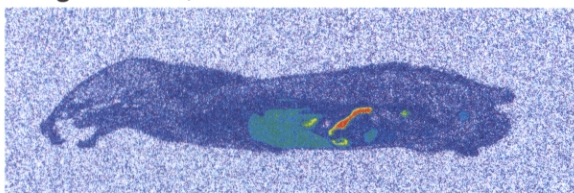
Daunomycin/normal mice



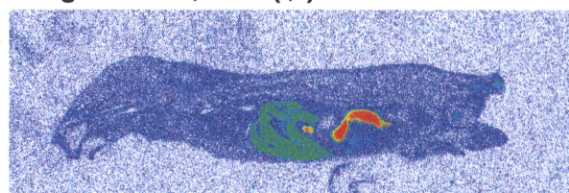
Daunomycin/mdr1(-/-) mice



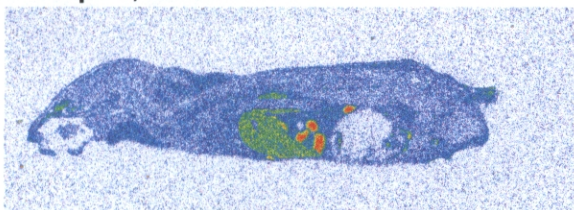
Progesterone/normal mice



Progesterone/mdr1(-/-) mice



Diazepam/normal mice



Diazepam/mdr1(-/-) mice

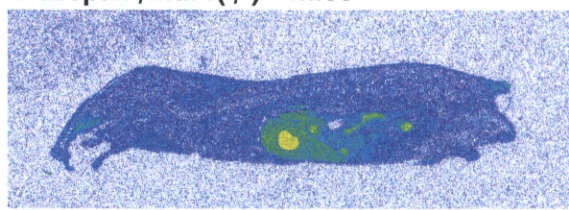


Fig.8 Autoradiogram of normal and mdr1 (-/-) mice after intravenous administration of daunomycin, progesterone and diazepam.

Table 4 Brain distribution in mdr1 knockout and normal mice.

Kp, brain and the ratio of daunomycin, diazepam and progesterone were determined in this study. Other data was referred from previous publications.

Test compounds	Kp, brain, mdr1a(-/-)	Kp, brain, normal	Kp, brain ratio	Time after administration
Cyclosporine A	3.3	0.3	11.0	4h
Daunomycin	1.6	0.9	1.8	0.5h
Dexamethasone	0.7	0.3	2.3	4h
Diazepam	3.2	3.4	0.9	0.5h
Digoxin	1.5	0.08	18.8	4h
Loperamide	2.0	0.3	6.7	4h
Progesterone	1.3	1.5	0.9	0.5h
Quinidine	4.8	0.2	24.0	10min
Verapamil	3.3	0.4	8.3	1h
Vinblastine	18.7	1.7	11.0	4h

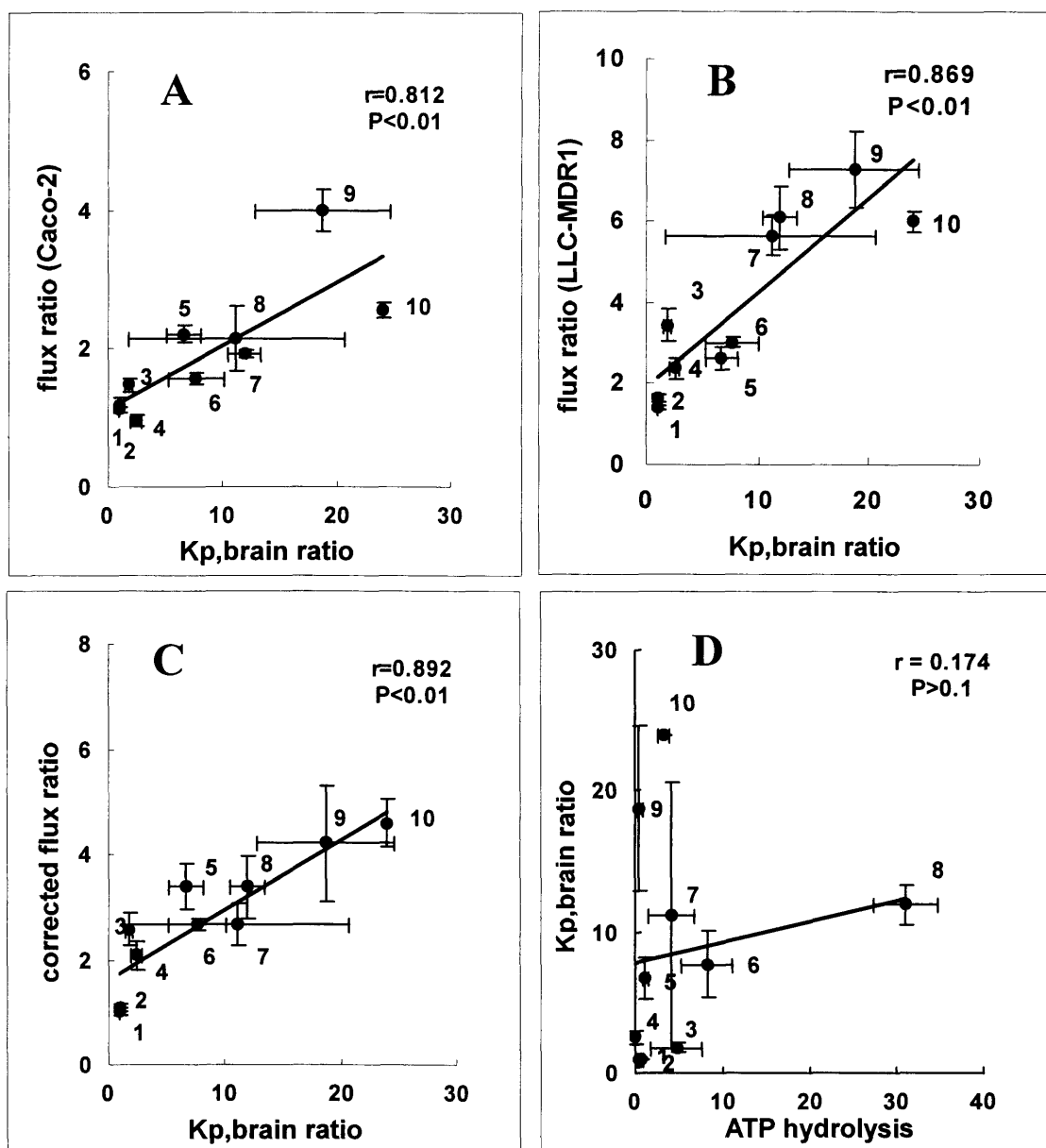
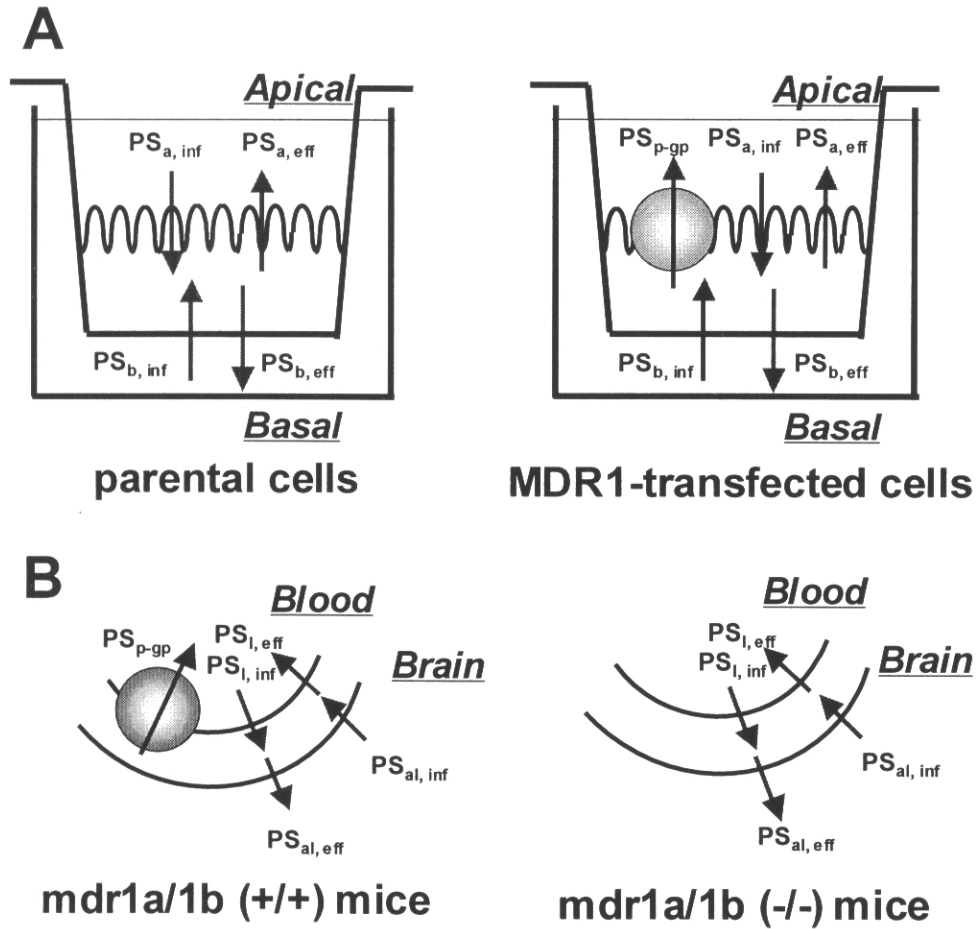


Fig.9 Correlation of P-gp function determined in *in vitro* transcellular transport studies, ATP hydrolysis studies and *in vivo* brain penetration studies.

Data listed in Tables 1, 2 and 3 were summarized to examine the correlation between *in vivo* and *in vitro* P-gp function. Previously reported data for the Kp,brain ratio of 7 compounds were also included. Panel A, Correlation between Kp,brain ratio and flux ratio in Caco-2 cells. Panel B, Correlation between Kp,brain ratio and flux ratio in LLC-MDR1 cells. Panel C, Correlation between Kp,brain ratio and corrected flux ratio in LLC-PK1/LLC-MDR1 cells. Panel D, Correlation between Kp,brain ratio and stimulatory effect on the ATP hydrolysis (V_{max}/K_m). Each point and vertical bar represents the mean + S.E. which was calculated according to the law of propagation of error. Key: 1, diazepam; 2, progesterone; 3, daunomycin; 4, dexamethasone; 5, loperamide; 6, verapamil; 7, vinblastine; 8, cyclosporin A; 9, digoxin; 10, quinidine



Scheme 1 Schematic diagram illustrating the PS products for the penetration of ligand across the plasma membrane.

Panels A and B represent the PS products across the cultured cell monolayers and those across the cerebral endothelial cells. Key; $PS_{a,inf}$ and $PS_{a,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the apical membrane, respectively. $PS_{b,inf}$ and $PS_{b,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the basal membrane, respectively. PS_{p-gp} represents the PS product for P-gp mediated efflux across the apical membrane; $PS_{l,inf}$ and $PS_{l,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the luminal membrane of cerebral endothelial cells, respectively. $PS_{al,inf}$ and $PS_{al,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the antiluminal membrane of cerebral endothelial cells, respectively. PS_{p-gp} represents the PS product for the P-gp mediated efflux across the luminal membrane.

第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について

第二章 要約

目的

MDR1 の基質となる薬物が経口投与された場合、消化管において MDR1 により排出を受けることにより、吸収性に個人差が生じたり、MDR1 阻害剤との同時併用による吸収性が変化する可能性がある。したがって、消化管における MDR1 の輸送能を評価することは、経口薬物の開発において、重要であると考えられている。本研究では、第一章に続き、消化管での MDR1 輸送能が、*in vitro* 実験より評価可能であるか否か検討した。

方法

消化管における MDR1 の輸送能を評価するために、12 のテスト化合物を用いて、マウス *in situ* 小腸灌流実験を行い、*mdr1* ノックアウトマウスならびに正常マウスの permeability surface area (PS) product を算出した。また、この小腸での *mdr1* 輸送能が *in vitro* 実験から予測できるかどうか検討するため、MDR1 発現 LLC-PK1 細胞ならびにコントロール細胞 (LLC-PK1) を経細胞輸送実験を行った。

結果

in situ 小腸灌流実験の結果、*mdr1* の影響によって PS product が変化することが明らかとなった。また、その影響の受けやすさは以下の順であった。Quinidine > ritonavir > loperamide, verapamil, daunomycin > digoxin, cyclosporine A > dexamethasone, vinbrastine また、小腸での *mdr1* 輸送能は、*in vitro* 実験から見積もった MDR1 輸送能と有意な相関関係にあることが示された。

結論

In vivo での消化管吸収における MDR1 の関与は、MDR1 発現細胞を用いた *in vitro* 経細胞輸

送実験から定量的に予測しうることが示された。

第二章 緒言

序章でも述べたように、ABC トランスポーターは多剤耐性を獲得した腫瘍細胞に見出され、数々の抗癌剤を細胞内から細胞外に排出する事で、腫瘍細胞に耐性を付与することが知られている (35, 36)。MDR1 は最も研究された ABC トランスポーターであり、BBB の他、肝臓、腎臓に加え、小腸などの正常組織にも発現することが知られている (13, 37, 38)。ここ数年、薬物の体内動態における MDR1 の寄与を定量的に評価するために、*mdr1* ノックアウトマウスでの *in vivo* 実験が試みられている (39)。特に、経口投与された MDR1 基質 (digoxin, taxol, tacrolimus, saquinavir など) の消化管吸収性が、*mdr1* によって低く抑えられていることが、正常マウスとの比較によって明らかにされている (56-61)。さらに、いくつかの論文で、ヒト臨床においても薬物の吸収性に MDR1 が影響する例が報告されるようになった。ここで、ヒトの報告例の一部を紹介すると、1) digoxin や cyclosporin A の経口バイオアベイラビリティは小腸の MDR1 発現量と逆相関することが示されている (62, 63)、2) 小腸での MDR1 輸送を阻害する成分を含むグレープフルーツジュースを飲用する事で、cyclosporin A の経口バイオアベイラビリティが上昇する (43)、3) 小腸の MDR1 がリファンピシンで誘導された場合、digoxin の経口バイオアベイラビリティが上昇する (62)、など適正な医薬品の使用という面から見ても、重要な知見が得られるに至っている。このような、小腸の MDR1 発現量や MDR1 阻害剤の併用で吸収性が影響を受けるかどうか判断する場合、注目している薬物が、どの程度 MDR1 によって輸送されているのかを定量的に評価することが重要であると考えられる。実際、SNPs によっても、MDR1 基質の吸収性が変動する可能性が示唆されている (40, 64-66)。本研究では、小腸での MDR1 輸送能の評価方法を検証するために、12 のテスト化合物を用いて、マウス *in situ* 小腸灌流実験を行い、

mdr1 ノックアウトマウスならびに正常マウスの permeability surface area (PS) product を算出した。また、この小腸での mdr1 輸送能が *in vitro* 実験から予測できるかどうか検討するため、MDR1 発現 LLC-PK1 細胞ならびにコントロール細胞 (LLC-PK1) を経細胞輸送実験を行った。

第二章 結果

Mdr1 ノックアウトマウス及び正常マウスを用いて、12 化合物の PS product を *in situ* 小腸灌流実験で求めた。各化合物の Fa (absorbed fraction) を fig.10 に示した。Quinidine や verapamil など、MDR1 の良好な基質として知られる薬物では、mdr1 ノックアウトマウスにおける Fa は正常マウスに比べ有意に高かった (fig.11)。一方、diazepam のような MDR1 の”poor substrate”では、両系統間の PS product に差は認められなかった。多くの化合物では 20~30 分間灌流することにより吸収性が定常状態に達したことから、20~30 分の Fa を用いて PS product を算出した。ただし、verapamil や daunomycin では定常状態に達するためには 30 分以上の灌流時間が必要となる結果が得られたが、マウスの健康状態を良好に維持するのは、30 分以上困難であったことから、これらの化合物の PS product の算出においても 20~30 分の Fa を用いた。

本実験系の妥当性を検証するために、MDR1 の典型的な阻害剤として知られる PSC833 が quinidine の MDR1 輸送にどのような影響を与えるか検討した。Fig.12 に示したように、正常マウスにおいては、PSC833 (1 μ M) の阻害により quinidine の吸収性が有意に増加した。しかしながら、mdr1 ノックアウトマウスにおいては、PSC833 の影響はほとんど見られなかった。これらの結果より、本灌流実験系はマウス小腸において mdr1 が基質となる薬物の吸収性を制限している現象を評価する上で妥当であることが示された。

また、実験終了後速やかに灌流部位の mucosa を採取し、放射能濃度を測定した。その結果、quinidine, loperamide や vinbrastine など MDR1 の良好な基質では、mdr1 ノックアウトマウス

ス mucasa 内の放射能濃度が、正常マウスの放射能濃度に比べ、有意に高かった (fig.13)。逆に diazepam では、両系統間に有意差は認められなかった。このことも、小腸管腔側上皮に発現している *mdr1* が基質の細胞内への透過を妨げていることにより説明される現象であり、本小腸灌流実験により *mdr1* の輸送機能が評価可能であることを示している。

小腸における *mdr1* 輸送を定量的に数値化するために、*mdr1* ノックアウトマウス及び正常マウスで求めた PS product の比 (PS product ratio) を求めた (table 5)。PS product ratio を表に示したが、大きい順から並べると、以下の順であった。

Quinidine > ritonavir > loperamide, verapamil, daunomycin > digoxin, cyclosporine A > dexamethasone, vinbrastine

この PS product ratio を *in vitro* 経細胞輸送実験で求めた PS_{a-to-b} ratio と比較した。ここで、PS_{a-to-b} ratio はコントロール細胞における apical から basal 側への透過 (PS_{a-to-b}) を MDR1 発現細胞における PS_{a-to-b} で除した比として定義した (66)。この計算値を table 6 にまとめた。

最終的に *in situ* 灌流実験から求めた PS product ratio と比較すると、両者には良好な相関関係が見出された (fig.14)。

最後に、小腸における *mdr1* 輸送能を、第一章でパラメーター化した BBB における *mdr1* 輸送能 (Kp, brain ratio : *mdr1* ノックアウトマウスにおける脳対血漿中濃度比を正常マウスにおける脳対血漿中濃度比で除した比) と比較検討した (67)。その結果、今回検討した 12 化合物の比較においては、両パラメーター間にも有意な相関関係があることが明らかとなった (fig.15)。

第二章 考察

本研究において、薬物のバイオアベイラビリティーの低下に MDR1 がどの程度関与しうるか定量的に評価することを目的に、*mdr1* ノックアウトマウス及び正常マウスを用いた *in situ*

小腸灌流実験を行った。MDR1 の良好な基質では、正常マウスと *mdr1* ノックアウトマウスの吸収率には有意な差異が認められた。さらに、灌流実験終了後の小腸上皮細胞中の薬物組織内濃度は、*mdr1* ノックアウトマウスで有意に高く、*mdr1* が基質を管腔側に排出している作用が確認された。小腸での吸収性低下に対する MDR1 の関与の程度を数値化するために、PS product ratio を算出した。図表に示したように、その順位は Quinidine > ritonavir > loperamide, verapamil, daunomycin > digoxin, cyclosporine A > dexamethasone, vinbrastine であった。これらの値は、過去報告にされた *mdr1* ノックアウトマウスと正常マウスの経口バイオアベイラビリティと比較可能な値である。すなわち、本検討において計算された digoxin の PS product ratio は 2.06 ± 0.07 であったが、この値は *mdr1* ノックアウトマウスと正常マウスに経口投与された際の血漿中濃度の比 (1.7) と同程度であった。さらにマウスの報告に加え、ヒトにおいても、小腸MDR1の発現量が約10分の1に低下したMDR1 遺伝子上C3435T のホモ変異体で、経口投与後の digoxin の AUC plasma が、正常の C/C 体に比較して約2倍増加したという報告がなされている (40)。この、ヒト *in vivo* において見出された差異も、本研究で求めた PS product ratio と非常に近いことが明らかとなった。したがって、この PS product ratio は臨床上、MDR1 の排出作用によって、血中濃度が変化するかどうかを予測する基準として利用できる可能性が考えられた。この値が大きいほど、小腸 MDR1 の発現レベルでの個人間変動や MDR1 輸送能を阻害する併用薬物の影響によって、血漿中薬物濃度が変動する可能性を示すものである。逆に、この値が小さければ、小腸 MDR1 の発現レベルでの個人間変動や MDR1 輸送能を阻害する併用薬物の影響は最小に留まるものと推察された。

次に、この *in situ* 小腸灌流実験で求めた PS product ratio が *in vitro* 経細胞輸送実験から求めたパラメーターと有意な相関関係にあることを見出した。この両パラメーターがどのような意味を持つか、pharmacokinetic model により説明したい (scheme 2)。まず、*mdr1* ノックアウトマウスと正常マウスを用いて行った *in situ* 小腸灌流実験で求めた PS product は以下の

ように定義できる。

$$PS \text{ product in normal mice} = PS_{m, \text{inf}} \times \frac{PS_{s, \text{eff}}}{PS_{m, \text{eff}} + PS_{s, \text{eff}} + PS_{P-\text{gp}}} \quad (3)$$

$$PS \text{ product in } mdr1a/1b(-/-) \text{ mice} = PS_{m, \text{inf}} \times \frac{PS_{s, \text{eff}}}{PS_{m, \text{eff}} + PS_{s, \text{eff}}} \quad (4)$$

ここで、 $PS_{m, \text{inf}}$ 及び $PS_{m, \text{eff}}$ は、小腸上皮細胞管腔側膜上での取り込み及び排出に関わる PS product である。また、 $PS_{s, \text{eff}}$ は、小腸上皮細胞血液側膜における排出に関わる PS product である。同様に、 $PS_{P-\text{gp}}$ は小腸上皮細胞管腔側膜上での MDR1 輸送を示している。さらに、 $mdr1$ ノックアウトマウスにおける PS product を正常マウスにおける PS product で除した比 PS product ratio は以下の式で表され得る。

$$PS \text{ product ratio} = 1 + \frac{PS_{P-\text{gp}}}{PS_{m, \text{eff}} + PS_{s, \text{eff}}} \quad (5)$$

次に、同様に手法で、MDR1 発現細胞ならびにコントロール細胞である LLC-PK1 細胞を用いた *in vitro* 経細胞輸送実験で求めた apical to basal 方向の PS product は以下のように示される。

$$PS_{a \rightarrow b} \text{ in MDR1 expressing cells} = PS_{a, \text{inf}} \times \frac{PS_{b, \text{eff}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}} + PS_{P-\text{gp}}} \quad (6)$$

$$PS_{a \rightarrow b} \text{ in parental cells} = PS_{a, \text{inf}} \times \frac{PS_{b, \text{eff}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}}} \quad (7)$$

さらに、 $PS_{a \rightarrow b}$ の比を算出すると、以下の式が与えられる。

$$PS_{a \rightarrow b} \text{ ratio} = 1 + \frac{PS_{P-\text{gp}}}{PS_{a, \text{eff}} + PS_{b, \text{eff}}} \quad (8)$$

式 5 と 8 を比較すると、両者は式の定義上類似しており、実験的に相関関係にあることが理論的に示された。しかしながら、fig.14 に示したように、*in situ* 実験と *in vitro* 実験間の相関は、*in vivo* BBB と *in vitro* 実験間の相関より弱いものであった (67)。第一章で述べたように、MDR1 発現細胞における flux ratio を LLC-PK1 細胞における flux ratio で除した比である corrected flux ratio は、 $mdr1$ ノックアウトマウスにおける脳対血漿中濃度比 (K_p, brain) を正常マウスにおける K_p, brain で除した比 $K_p, \text{brain ratio}$ と良好な相関関係にあることが見

出された (fig.9C, 相関係数 : 0.892, $p < 0.01$)。さらに, 12 化合物のテスト化合物の比較により, 脳における *mdr1* 輸送能力と小腸における *mdr1* 輸送能力の間にも有意な相関関係が認められた。しかしながら, この比較においては, *digoxin* など回帰直線から大きく外れる化合物が認められた。この違いは, 脳と小腸において *digoxin* 輸送に対する *mdr1* の寄与が異なる可能性が考えられた。すなわち, 小腸では数多くの取り込み/排出トランスポーターが存在しており, このようなトランスポーターが *digoxin* 輸送に関与する可能性により, *mdr1* 輸送の寄与が低下したものと考えられた。具体的なトランスポーターは不明であるものの, *mdr1b* の関与については否定的に考えることが出来る。なぜなら, 脳及び小腸における *mdr1b* の発現はほとんど無視できるからである (68-70)。また, その他の可能性として, 小腸における *digoxin* 代謝が影響している可能性も考えられたが (71), 小腸にはより複雑なトランスポーターの輸送システムの存在が示されていることから (34), 詳細を示すためには更なる検討が必要であると考えられた。

最後に, 脳と小腸での *mdr1* 輸送能の比較において, 回帰直線が脳側に傾いている理由 (言い換えると, 脳においてより *mdr1* 輸送の変動幅が大きい, 感受性が高いと言える) について考察したい (fig.15)。脳における *mdr1* 輸送能力を数値化した *K_{p,brain} ratio* は以下の式によって与えられた。

$$K_{p, brain} \text{ ratio} = 1 + \frac{PS_{p-gp}}{PS_{l, eff}} \quad (9)$$

ここで, $PS_{l, eff}$ は, 脳毛細血管内皮細胞管腔側膜の排出に関わる PS product である。この式 9 と式 5 の比較で明らかなように, 式 5 第 2 項の分母は $PS_{m, eff}$ と $PS_{s, eff}$ の和である。これに対し, 式 9 では $PS_{l, eff}$ のみである。また, 脳毛細血管内皮細胞は *tight junction* を形成することにより, 膜透過性は低く制限されていることが知られている (血液脳関門たる所以である)。すなわち, $PS_{l, eff}$ は $PS_{m, eff}$ と $PS_{s, eff}$ に比べ小さいため, 仮に PS_{p-gp} が脳と小腸で同じであったとした場合, PS product ratio は *K_{p,brain} ratio* より低くなることが理解できる。実際には小腸における *mdr1* の発現が, 若干脳より高いことから, これらが相殺されることにより,

回帰直線の傾きが 1→2.6 となっているものと考察された。

本研究のまとめとして、我々は小腸において吸収性を制限している *mdr1* の機能を定量的に評価することが出来た。このような評価方法は、ヒト小腸における *MDR1* の発現量の個体間差に基づく吸収性の変動や多剤併用時に吸収性がどの程度変動しうるか予測するためのツールとして、医薬品開発に適用できる可能性が示された。我々は、さらにこの *mdr1* 輸送能力が *in vitro* 経細胞輸送実験と有意に相関すること、また、*pharmacokinetic model* の構築によりその理論的背景を明らかにすることが出来た。

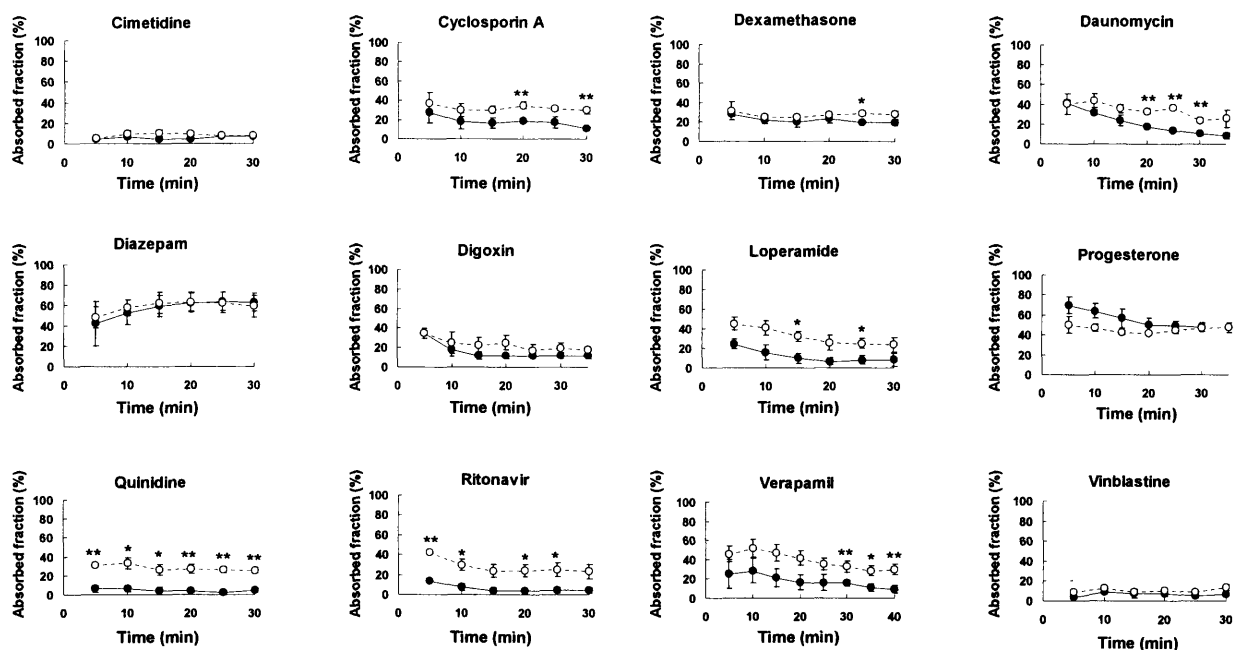


Fig. 10 Time profiles for the absorbed fraction of ligand in outflow.

The small intestinal segments were perfused with the medium containing isotopically labeled compounds to determine the outflow concentrations. The results are given as the absorbed fraction, defined in the experimental paragraph. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent determinations. Open and closed circles represent the results in *mdrla/1b(-/-)* and normal mice respectively. Statistical difference in *mdrla/1b(-/-)* mice were compared to normal mice by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

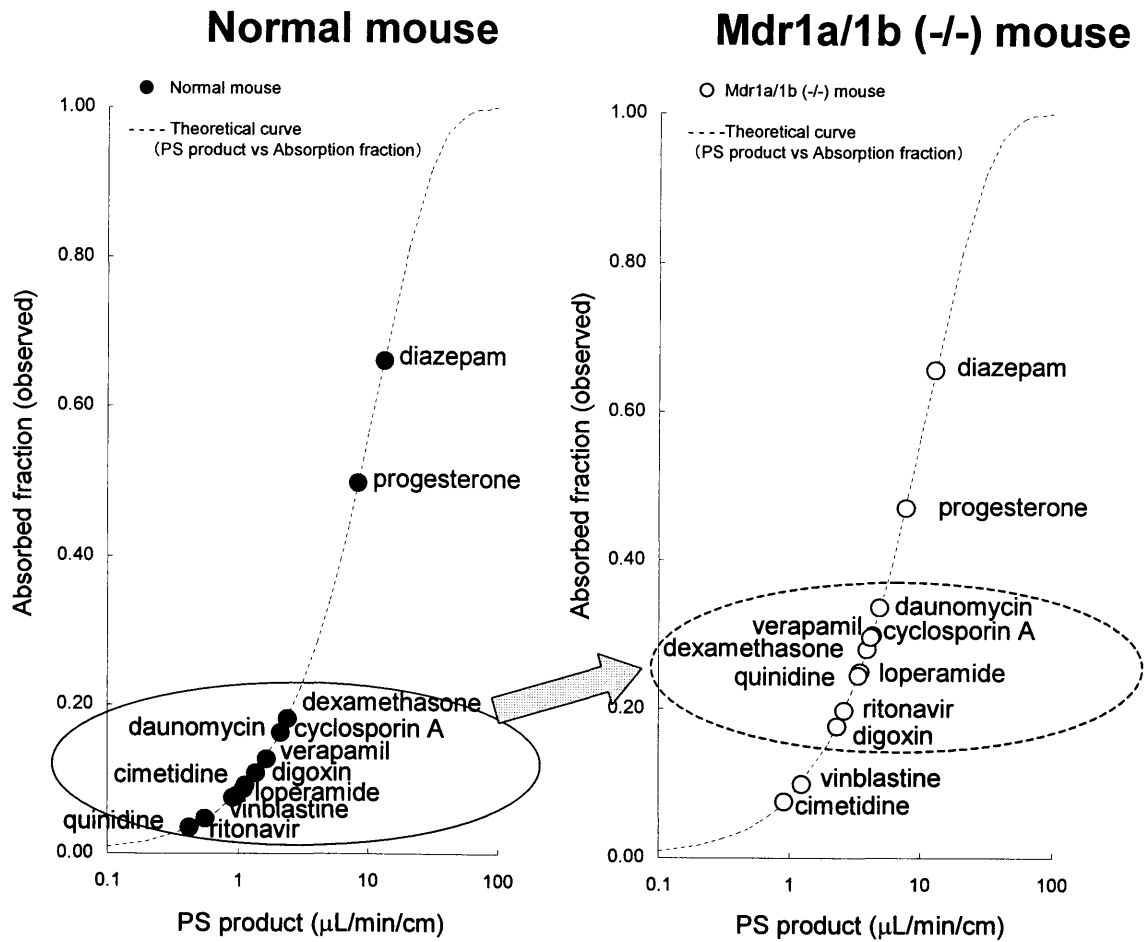


Fig.11 Effect of mdr1 on drug absorption.

Theoretical curve was calculated by following equation:

$$Fa = 1 - \exp\left(-\frac{PS \text{ product} \times L}{Q}\right)$$

Q and L represent flow rate of perfusate and length of perfused segment.

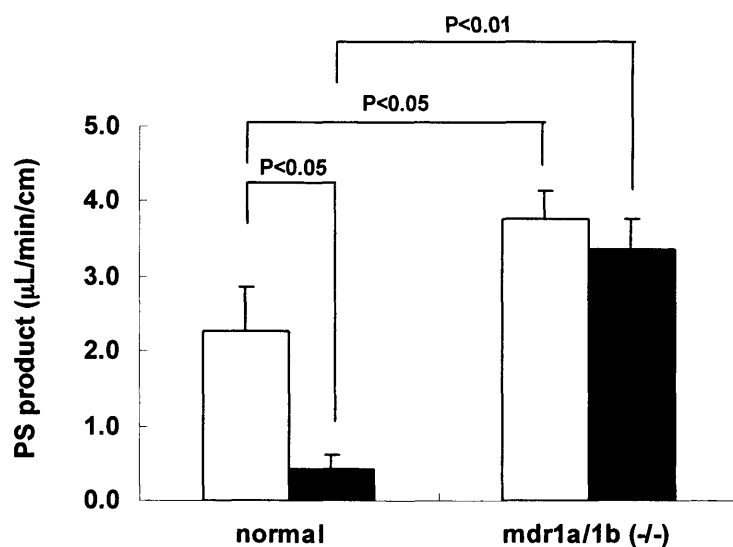


Fig.12 Effect of PSC833 on the intestinal absorption of [3H]quinidine.

The PS product for [3H]quinidine in normal and mdr1a/1b (-/-) mice was determined in the presence and absence of PSC833 (1 μM). Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent experiments. Open and closed bars represent the results in the presence and absence of PSC 833, respectively. Statistical differences were compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance.

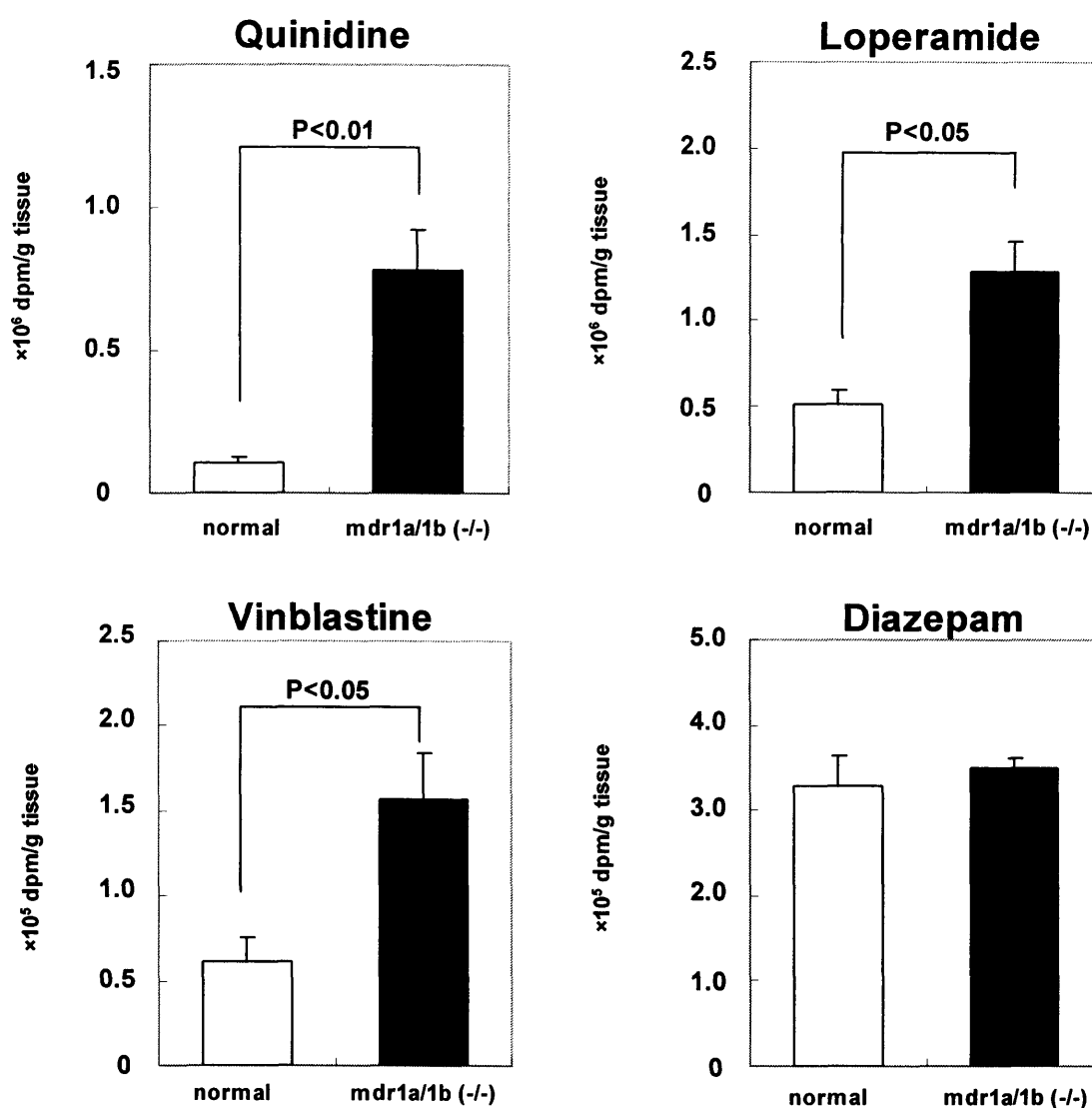


Fig.13 Content of ligands remaining in the intestine.

Content of ligands remaining in the intestine of normal and *mdr1a/1b* (-/-) mice was determined at the end of each experiment. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent experiments. Open and closed bars represent the results in normal and *mdr1a/1b* (-/-) mice respectively. Statistical difference in *mdr1a/1b* (-/-) mice were compared to normal mice by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance.

Table 5 PS products determined in the *in situ* intestinal perfusion.

The PS products for the intestinal absorption were calculated from the data shown in Fig. 10. The values of *in situ* PS product ratio, defined as the PS product in mdr1a/1b (-/-) mice divided by the same value in normal mice, were also calculated. The results are shown as the mean \pm S.E. The S.E. for the PS product ratio was calculated according to the law of propagation of error. Statistical difference in mdr1a/1b(-/-) mice were compared to normal mice by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Drugs	PS product ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}$)		PS product ratio
	Normal	mdr1a/1b(-/-)	
Cimetidine	0.973 ± 0.089	0.928 ± 0.075	0.95 ± 0.13
Cyclosporin A	2.13 ± 0.21	$4.27 \pm 0.32^{**}$	2.01 ± 0.24
Daunomycin	1.63 ± 0.20	$4.91 \pm 0.29^{**}$	3.01 ± 0.40
Dexamethasone	2.38 ± 0.23	$3.92 \pm 0.45^{*}$	1.65 ± 0.09
Diazepam	13.0 ± 2.8	12.8 ± 3.4	0.99 ± 0.34
Digoxin	1.14 ± 0.15	$2.34 \pm 0.12^{*}$	2.06 ± 0.07
Loperamide	1.10 ± 0.77	3.44 ± 0.90	3.14 ± 2.35
Progesterone	8.23 ± 0.96	7.63 ± 0.88	0.93 ± 0.15
Quinidine	0.428 ± 0.190	$3.36 \pm 0.41^{**}$	7.86 ± 3.63
Ritonavir	0.564 ± 0.314	2.64 ± 0.79	4.70 ± 2.98
Verapamil	1.38 ± 0.51	$4.23 \pm 0.13^{**}$	3.07 ± 1.14
Vinblastine	0.926 ± 0.106	1.25 ± 0.11	1.35 ± 0.20

Table 6 PS products for the transcellular transport across MDR1 expressing LLC-PK1 monolayer.

Based on the results shown in Chapter 1, the PS products for the transcellular transport (apical to basal) of 12 compounds were calculated. The values of *in vitro* PS product ratio (PS_{a-to-b} ratio), defined as the PS product for the apical-to-basal flux across the parental LLC-PK1 cells divided by the same value across MDR1-expressing LLC-PK1 monolayer, were also determined. The results are shown as the mean \pm S.E. The S.E. of the PS_{a-to-b} ratio was calculated according to the law of propagation of error. Statistical difference in LLC-MDR1 cells were compared to parental cells by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Drugs	PS _{a-to-b} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)		PS _{a-to-b} ratio
	LLC-MDR1	Parental	
Cimetidine	1.32 \pm 0.28	0.620 \pm 0.110	0.47 \pm 0.13
Cyclosporin A	0.98 \pm 0.07	1.59 \pm 0.12*	1.62 \pm 0.17
Daunomycin	2.64 \pm 0.27	1.75 \pm 0.04	0.66 \pm 0.07
Dexamethasone	1.89 \pm 0.19	1.85 \pm 0.05	0.98 \pm 0.10
Diazepam	3.78 \pm 0.03	3.94 \pm 0.26	1.04 \pm 0.07
Digoxin	0.560 \pm 0.058	1.03 \pm 0.21	1.84 \pm 0.42
Loperamide	11.3 \pm 0.1	16.4 \pm 0.4**	1.44 \pm 0.04
Progesterone	6.48 \pm 0.21	6.44 \pm 0.36	0.99 \pm 0.06
Quinidine	4.07 \pm 0.03	12.6 \pm 0.8**	3.09 \pm 0.19
Ritonavir	0.908 \pm 0.133	2.24 \pm 0.17**	2.47 \pm 0.41
Verapamil	7.51 \pm 0.14	12.5 \pm 0.1**	1.66 \pm 0.03
Vinblastine	1.39 \pm 0.01	1.56 \pm 0.09	1.12 \pm 0.07

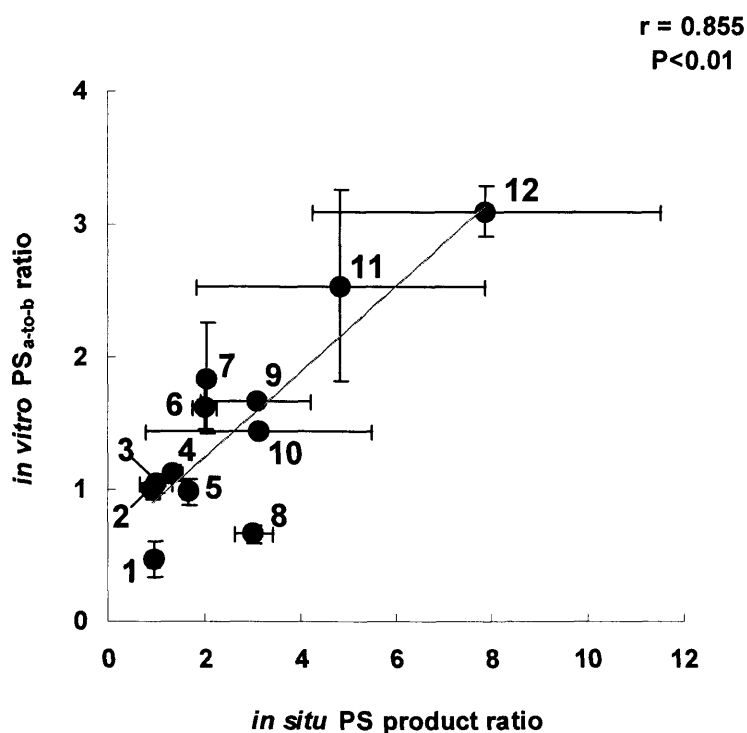


Fig.14 Correlation of P-gp function determined in *in vitro* transcellular transport studies and in *in situ* intestinal perfusion studies.

Data listed in Tables 5 and 6 were summarized to examine the correlation between *in situ* and *in vitro* P-gp function. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. which was calculated according to the law of propagation of error. Key: 1, cimetidine; 2, progesterone; 3, diazepam; 4, vinblastine; 5, dexamethasone; 6, cyclosporin A; 7, digoxin; 8, daunomycin; 9, verapamil; 10, loperamide; 11, ritonavir; 12, quinidine.

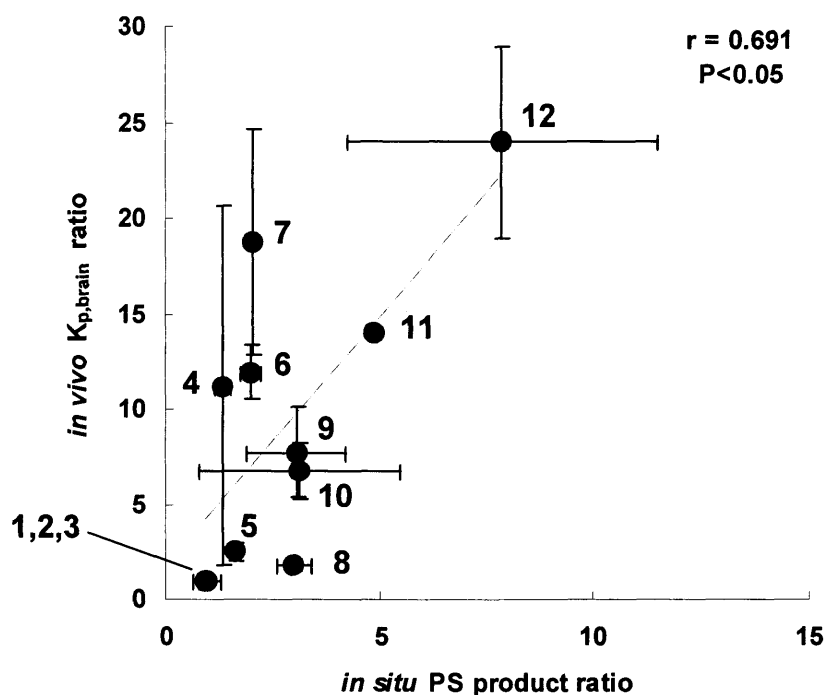
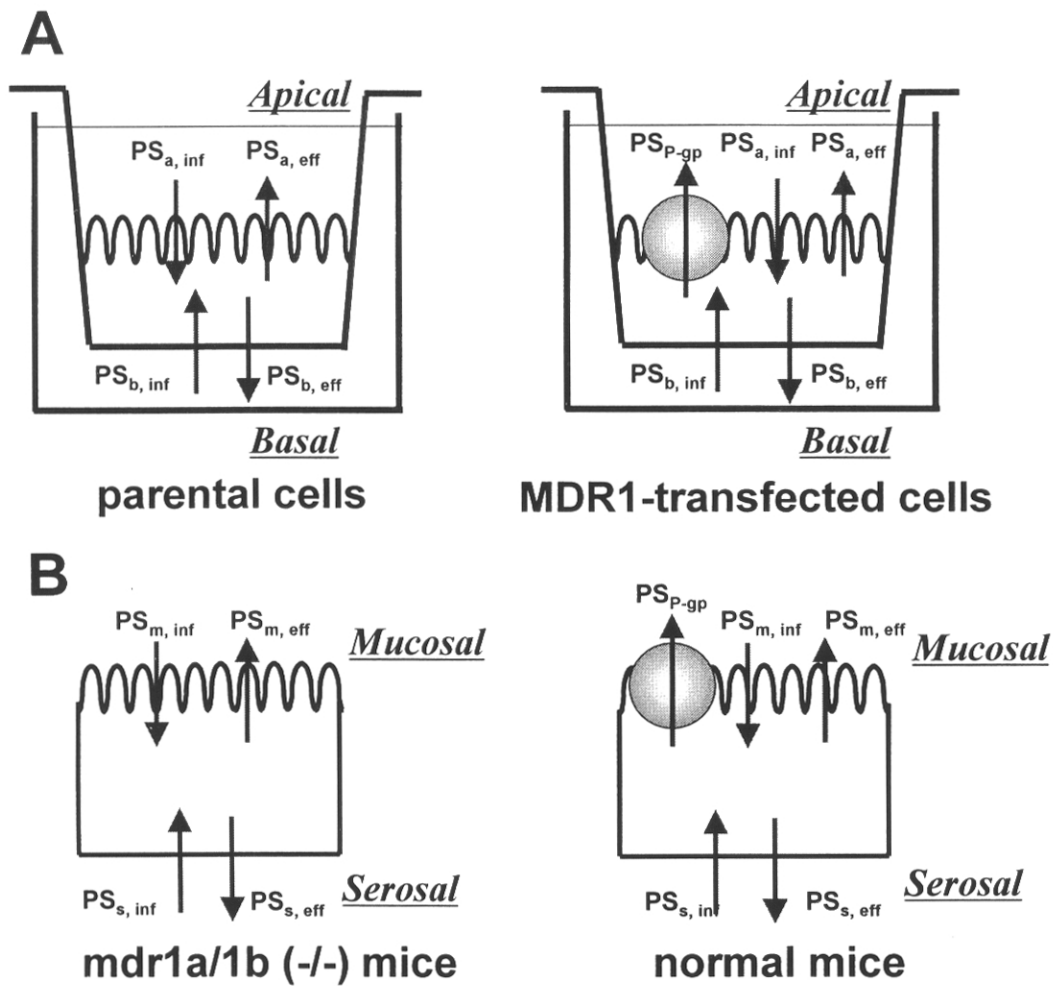


Fig.15 Correlation of P-gp function determined in *in vivo* brain penetration studies and *in situ* intestinal perfusion studies.

Data listed in Tables 4 and 5 were summarized to examine the correlation of P-gp functions between the small intestine and the blood-brain barrier. Each point and vertical bar represents the mean + S.E., which was calculated according to the law of propagation of error. Key: 1, cimetidine; 2, progesterone; 3, diazepam; 4, vinblastine; 5, dexamethasone; 6, cyclosporin A; 7, digoxin; 8, daunomycin; 9, verapamil; 10, loperamide; 11, ritonavir; 12, quinidine.



Scheme 2 Schematic diagram illustrating the PS products for the penetration of ligands across the cell monolayer.

Panels A and B represent the transcellular transport of ligands across the cultured cell monolayers and that across the intestinal epithelial cells, respectively. Key; $PS_{a,inf}$ and $PS_{a,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the apical membrane, respectively. $PS_{b,inf}$ and $PS_{b,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the basal membrane, respectively. PS_{P-gp} represents the PS product for P-gp mediated efflux across the apical membrane. $PS_{m,inf}$ and $PS_{m,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the mucosal membrane of intestinal epithelial cells, respectively. $PS_{s,inf}$ and $PS_{s,eff}$ represent the PS products for the influx and efflux across the serosal membrane of intestinal epithelial cells, respectively. PS_{P-gp} represents the PS product for the P-gp mediated efflux across the mucosal membrane.

第三章 抱合代謝物の消化管排出に関与する ABC トランスポーターの解析

第三章 要約

目的

本研究では、小腸においてグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を管腔側に排出するトランスポーターの重要性を調べるために、遺伝的に mrp2 を欠損した Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) と breast cancer resistance protein (Bcrp1 / Abcg2) ノックアウトマウスを用いた小腸灌流実験を行った。

方法

EHBR 及び Bcrp1 ノックアウトマウスの空腸を、4-methylumbelliferone (4MU) 及び 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) を含む灌流液で灌流し、outflow 中の代謝物濃度から、各化合物のグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の efflux rate を算出した。

結果

EHBR を用いた検討では、正常ラットに比べ E-3040-G の efflux rate が有意に低下したものの、E3040-S、4-MU-G 及び 4-MU-S の efflux rate には、有意差は認められなかった。また、bcrp1 ノックアウトマウスを用いた検討では、E3040-G、4-MU-G 及び 4-MU-S の efflux rate が有意に低下した。

結論

Bcrp1 は、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の排出に、より重要な機能を有していることが明らかとなった。

第三章 緒言

小腸における薬物代謝と排出トランスポーターは協調的に作用して、基質となる薬物のバイオアベイラビリティを低下させているものと認識されている。その典型的な例として、小腸に発現している CYP3A4 (72-75) と MDR1 (37, 76) が共通した基質認識性を有しており、基質となる薬物を代謝/排出することが知られている (scheme 3A)。実際、抗 HIV 薬や免疫抑制剤などの CYP3A4 及び MDR1 基質を経口投与した場合、そのバイオアベイラビリティは CYP3A4/MDR1 の阻害剤や誘導剤により変化することが知られており、薬物動態の決定因子の一つであることが報告されている。これに加えて、小腸上皮細胞中での抱合代謝とその小腸管腔内への排出も、上述の薬物代謝と排出トランスポーターの協調的作用の一つとして捉えられている (46, 74)。抱合代謝酵素のうち、UDP グルクロン酸転移酵素及び硫酸転移酵素は小腸に高発現していることが、すでに報告されているが (75, 76)、これらの酵素によって生じた、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を細胞外に排出トランスポーターとして、MRP2 又は BCRP が候補に上げられる (scheme 3B)。ヒト小腸における ABC トランスポーターの発現レベルを RT-PCR で測定した結果、MRP2 及び BCRP は MDR1- (中性～カチオン性の化合物を基質とする傾向がある) よりも、高い発現を示していたことから、この 2 つの ABC トランスポーターの関与が推測された (77)。

そこで、本研究では、小腸においてグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の管腔側への排出に MRP2 及び BCRP がどの程度関与するか検討した。小腸におけるこれらのトランスポーターの排出機能を定量的に評価するために、ラット *mrp2* を欠損した EHBR と、マウス *bcrp1* を欠損した *bcrp1* ノックアウトマウス及び対照となる正常動物を用いて小腸 *in situ* 灌流実験を行った。テスト化合物として、小腸上皮細胞でグルクロン酸抱合や硫酸抱合体者を受ける 4-methyl-umbelliferone (4MU) と E3040 を用いた (scheme 4, ref.78-82)。

第三章 結果

ラットを用いた小腸灌流実験

小腸 mrp2 が、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の管腔側への排出に、どの程度関与するか明らかにすることを目的に、EHBR 及び正常ラットの小腸管腔側を、4-MU または E3040 を含む緩衝液で灌流した。灌流液中の代謝物濃度を測定した結果、4-MU-G、4MU-S 及び E-3040-S の efflux rate は、EHBR 及び正常ラット間で、有意な相違は認められなかったものの、E-3040-G の efflux rate は、正常ラットに比べ EHBR において、ほぼ半分に低下した (fig.16, 17)。また、実験終了後、小腸上皮細胞中の 4MU ならびに E3040 の代謝物濃度を測定した結果、両動物間に有意差は認められなかった (table 7)。Fig.18 に灌流実験での物質収支 (マスバランス) を示したが、4MU 及び E3040 の吸収率 (inflow 中の未変化体量と outflow 中の未変化体及び代謝物量の差) に、EHBR 及び正常ラット間の有意差は認められなかった。

マウスを用いた小腸灌流実験

小腸 bcrp1 が、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の管腔側への排出に、どの程度関与するか明らかにすることを目的に、ラット同様、bcrp1 ノックアウトマウス及び正常マウスの小腸管腔側を、4-MU または E3040 を含む緩衝液で灌流した。小腸上皮細胞内で生じた 4-MU-G、4-MU-S 及び E3040-G の efflux rate を outflow 中の各代謝物濃度から算出し、bcrp1 ノックアウトマウスと正常マウス間で比較することにより、bcrp1 の排出能力を検討した。その結果、正常マウスに比べ bcrp1 ノックアウトマウスにおいては、4-MU-G、4-MU-S 及び E3040-G の efflux rate が有意に低下した (Fig.19, 20)。特に、4-MU-S は bcrp1 ノックアウトマウスの outflow 中では検出限界以下のレベルまで、その排出が低下していた。4-MU-S の排出に対し、硫酸抱合代謝物である E-3040-S はマウス小腸で生成されず、bcrp1 の関与の程度については評価できなかった。また、実験終了後、小腸上皮細胞中の 4MU ならびに E3040 の代謝物濃度を測定した結果、両動物間に有意差は認められなかった (table 7)。Fig.21 に灌流

実験での物質収支（マスバランス）を示したが、4MU 及び E3040 の吸収率（inflow 中の未変化体量と outflow 中の未変化体及び代謝物量の差）に、bcrp1 ノックアウトマウス及び正常マウス間の有意差は認められなかった。さらに、4MU ならびに E3040 の吸収クリアランス（ $CL_{a,app}$ ）を計算した。その結果、両化合物の 30 分までの $CL_{a,app}$ には、bcrp1 ノックアウトマウス及び正常マウス間で有意差は認められなかった。

第三章 考察

抱合代謝酵素と排出トランスポーターは、協調的に作用し、アニオン性の化合物を小腸管腔側に排出することによって、吸収率を低下させる原因と考えられてきた（46, 74）。本研究では、小腸管腔側に発現する ABC トランスポーターである mrp2 と bcrp1 の輸送機能に焦点を当てた。両トランスポーターは、グルクロン酸抱合代謝物、硫酸抱合代謝物を基質とすることが知られている（83, 84）。さらに、両トランスポーターとも、ヒト小腸に高発現しており、その発現レベルは、MDR1 より高いことが mRNA の測定により明らかにされている（77）。これらの事実から、先に述べた mrp2 と bcrp1 が、小腸における抱合代謝物の排出に重要な役割を果たしているという仮説を立て、mrp2 と bcrp1 の輸送能力を定量的に評価するために、小腸 *in situ* 灌流実験を行った。本実験には、mrp2 を欠損したモデル動物である EHBR と bcrp1 ノックアウトマウスを用いて、灌流液の outflow に排出されたグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体に加えて、未変化体を定量した。「第二章 薬物の消化管吸収における MDR1 輸送能の評価について」に記載したように、速度論的な解析を行うことにより、いずれのトランスポーターが、小腸において重要な輸送機能を有しているか検討した（85）。EHBR 及び正常ラットを用いた実験において、4MU-G 及び 4MU-S の outflow 中濃度はほとんど同じであったことから、mrp2 はこれらの抱合代謝物の消化管管腔側への排出にほとんど関与しないことが、明らかとなった。他方、E3040 硫酸抱合体では有意差は認められな

ったものの、グルクロン酸抱合代謝物の排出は、EHBR で有意に低下した。Mrp2 は多くのグルクロン酸抱合体を基質とすることが知られているが、小腸での mrp2 排出機能の重要性は基質によって異なることが示された。この点について、過去の報告に基づき考察したい。われわれのこれまでの研究で、前駆体である 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) をラットに静脈内投与したところ、細胞内で生成した mrp2 の良好な基質である 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG) の小腸管腔内への排出は、正常ラットに比べ EHBR で有意に低下することが明らかとなった (86)。この *in vivo* で見出された現象は、Ussing chamber を用いた *in vitro* での検討で、さらに確かめられている。すなわち、ラット空腸を取り付けた Ussing chamber では、漿膜側から管腔側への DNP-SG の透過性は、EHBR に比べ正常ラットで 2 倍高かった。また、漿膜側から管腔側への DNP-SG の透過性は逆向きの輸送より高く、この一方向性輸送は、EHBR で消失したことから、mrp2 が DNP-SG の輸送（管腔内への排出方向）に関与していることが明らかとなった (86)。

逆に、bcrl1 ノックアウトマウスにおいては、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体の *efflux rate* が有意に減少することが明らかとなった。特に、BCRP の良好な基質である 4MU-S の排出は (83)、検出限界以下のレベルまで低下した。このことは、小腸において bcrl1 が硫酸抱合体の管腔内への排出に重要な役割を果たすことを示していると考えられた。さらに、4MU-G 及び E3040-G の *efflux rate* はそれぞれ、5 分の 1、2 分の 1 に低下していた。いずれの抱合代謝物の *mucosa* 内での濃度には有意な相違は認められなかったことから、*efflux rate* の減少は、bcrl1 ノックアウトマウスと正常のマウスとの代謝活性の相違に基づくものではなく、排出能力の相違に基づくものと考察した。本検討結果から、未変化体の吸収においては両動物間で有意差は認められなかったが、UGT や ST などの抱合代謝酵素と排出トランスポーターとの協調的な作用を示すことが確認された。

最近、bcrl1 が基質となる化合物の経口吸収や腎排泄を低下させている例が報告されている。Jonker らは、正常のマウスに bcrl1 基質である topotecan を経口投与した場合、bcrl1 の強力

な阻害剤である GF120918 の併用によって、topotecan の吸収が増加して、bcrp1 ノックアウトマウスに単独投与した血中濃度推移に近づくこと、また、bcrp1 ノックアウトマウスで topotecan+GF120918 の併用投与した場合には血中濃度の変動が見られなかったことを見出した (87)。さらに、GF120918 併用投与による topotecan 血中濃度推移の増加は、mdr1 ノックアウトマウスでも見出された。このことから、mdr1 に加えて bcrp1 が消化管での topotecan の吸収を低下させていることが示されている (87)。

また、食物中の発癌物質として知られている PhIP (2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo[4,5-b]pyridine)の経口バイオアベイラビリティが、bcrp1 ノックアウトマウスで高い事も見出されている (88)。さらに、bcrp1 ノックアウトマウスは光毒性に対して感受性が高くなり、耳がケロイド様に萎縮していくフェノタイプを示すことが示された (89)。この現象は、食物中のクロロフィルの分解物である pheophorbide a が細胞内に蓄積されることにより誘導される事が知られていた。偶然にも pheophorbide a は bcrp1 の基質であることから、bcrp1 ノックアウトマウスでは食餌中の pheophorbide a を細胞内から排出する作用が低下しているために、光に対して感受性が高くなっているものと考えられている。このような事実から、小腸における bcrp1 は、食物に含まれるような毒性化合物に対する一種の“生体防御機構”としての機能を有しているものと考えられるに至っている (89)。

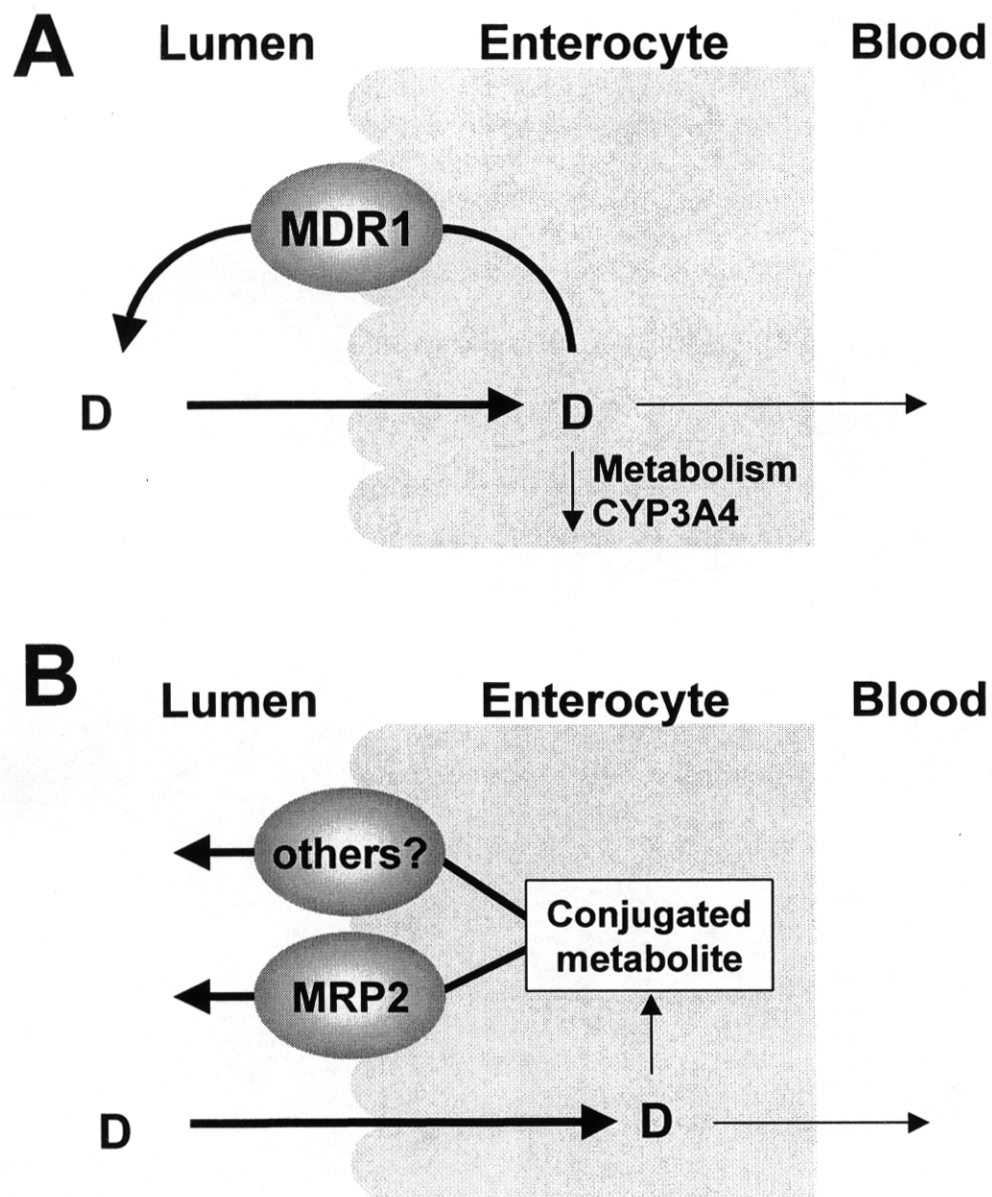
さらに最近、bcrp1 の排出作用が、エステル化によるプロドラッグ開発に対して障害となっている例が報告されている (90)。ME3229 は糖蛋白 IIb/IIIa のアンタゴニストである ME3227 のエステル型プロドラッグであるが、エステル化により膜透過性が向上した反面、バイオアベイラビリティの向上は見られなかった。この ME3227 の消化管排出には、主に bcrp1 が関与することが、Kondou らにより報告された。すなわち、経口投与後、エステル体である ME3229 は小腸上皮細胞内に移行した後、カルボキシエステラーゼ (CES) による速やかに加水分解を受け、bcrp1 によって管腔側への排出されるため、吸収性が改善されないというメカニズムが明らかにされた。現在、プロドラッグ化は、

バイオアベイラビリティ改善の有効な手法の一つであるが、本研究で認められた抱合体代謝と排出トランスポーターの関係同様、活性体が吸収されるまでの素過程を考慮することが、プロドラッグ化の成功の鍵と考えられる。

他方、腎排泄における *bcrp1* の機能も同定されている。すなわち、E3040-S を静脈内に infusion 投与した場合、その腎排泄クリアランスは *bcrp1* ノックアウトマウスで半分以下に低下することが見出されている (91)。残念ながら、我々の検討では、E3040-S の小腸での生成が非常に低く、小腸排出について評価できなかったことから、腎と小腸での E3040-S 排出について直接比較することは出来なかった。

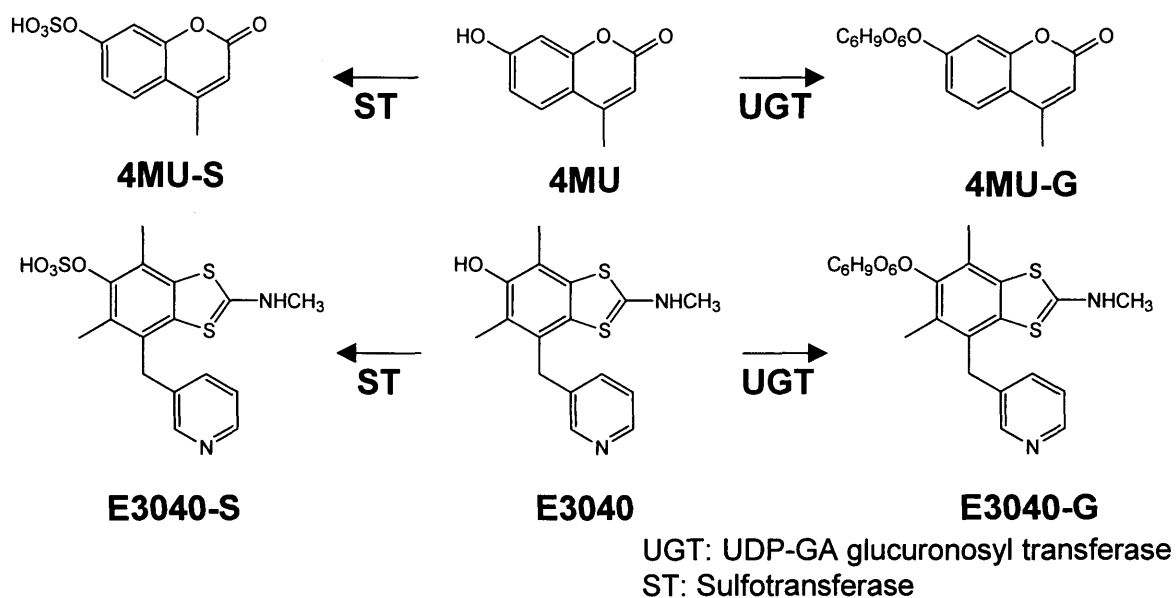
現在、BCRP 基質なる薬物の PK データの個人間変動を説明できるかどうか、蛋白レベルでの変異を伴う SNP タイプの BCRP の機能解析が進められている (92-94)。この点については、現在多くの臨床試験が進められており、BCRP のジェノタイプが PK に影響しうるかどうか、今後明確にされていくものと考えている。

最後に結論として、本研究では小腸での薬物吸収における *mrp2* と *bcrp1* の寄与を定量的に評価した。小腸 *in situ* 灌流実験により、小腸上皮細胞内で生成されたグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の管腔内への排出に *bcrp1* が重要であることが明らかとなった。それに対し、小腸 *mrp2* はグルクロン酸抱合体の排出に関与している事を示すことが出来た。これらの現象は、小腸での抱合体代謝酵素と排出トランスポーターの協調的な異物排出作用と捉えられた。



Scheme 3 Synergistical role of drug metabolizing enzyme and efflux transporter in small intestine

Combination of (A) MDR1 and CYP3A4 and (B) MRP2 and conjugation enzyme reduces oral bioavailability of drugs in small intestine.



Scheme 4 Metabolic pathway of 4MU and E3040 by glucuronidase and sulfatase enzymes in small intestine

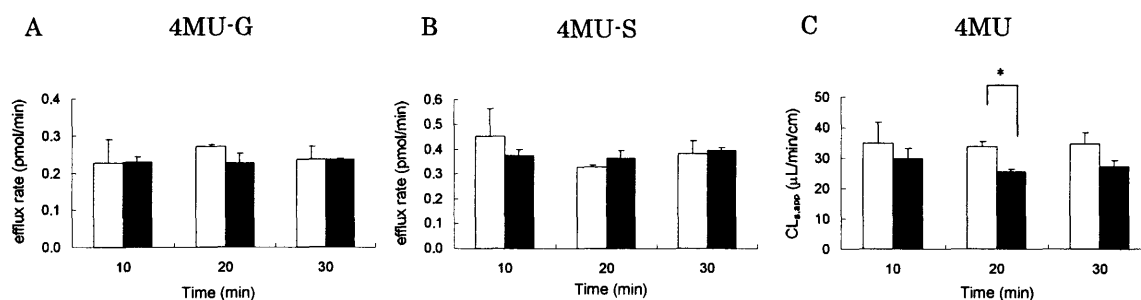


Fig.16 Time profile for the efflux rate of 4MU-G and 4MU-S and absorption clearance of 4MU in EHBR and normal rats.

Small intestinal segments were perfused with medium containing 10 μ M 4MU to determine the outflow concentrations. Panels A and B represent the efflux rate of 4MU-G and 4MU-S and panel C represents the absorption clearance of 4MU, respectively. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. of three independent determinations. Open and closed bars represent the results in normal rats and EHBR, respectively. Statistical difference between EHBR and normal rats was compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$).

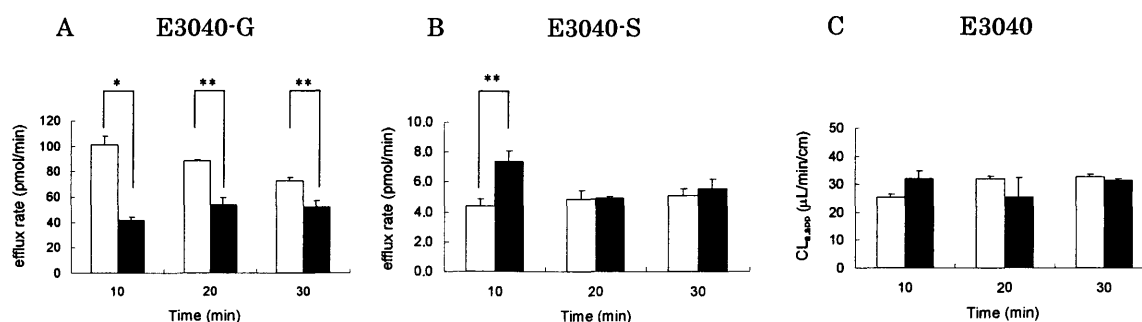


Fig.17 Time profile for the efflux of E3040-G and E-3040-S and absorption clearance of E3040 in EHBR and normal rats.

Small intestinal segments were perfused with medium containing 10 μ M E3040 to determine the outflow concentrations. Panels A and B represent the efflux rate of E3040-G and E3040-S and panel C represents the absorption clearance of E3040, respectively. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent determinations. Open and closed bar represent the results in normal rats and EHBR respectively. Statistical difference between EHBR and normal rats was compared by two-sided Student's t-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

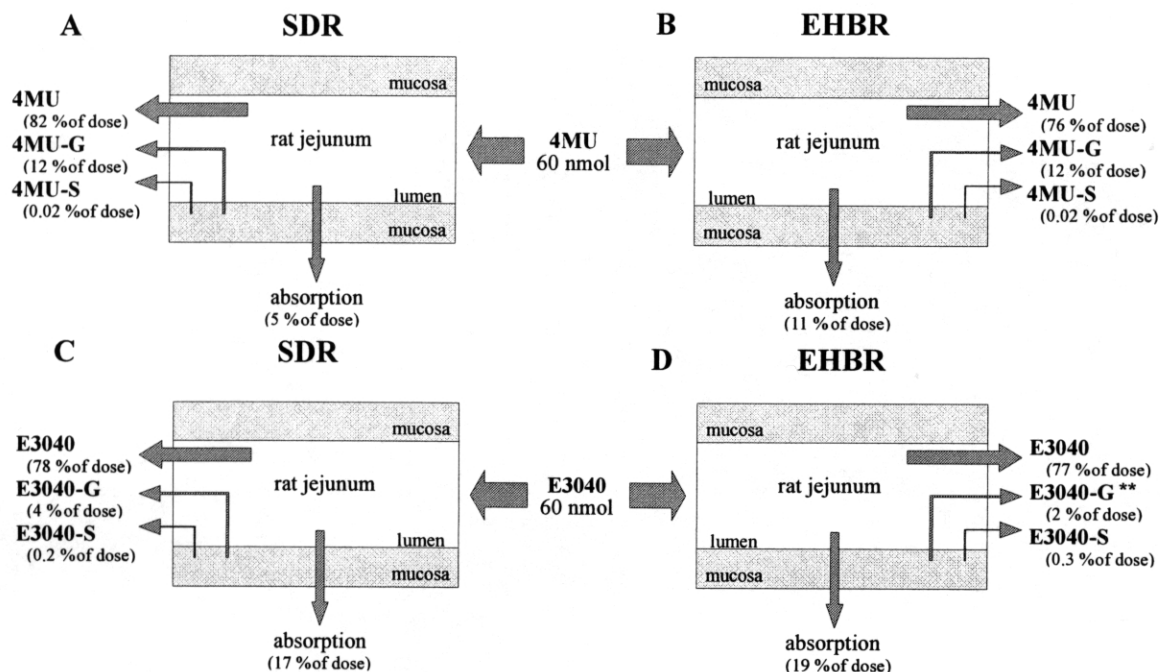


Fig.18 Mass balance of 4MU and E3040 absorption in rat intestinal perfusion experiments.

Summary of intestinal disposition of 4MU, E3040 and their metabolites. Absorption was defined by subtracting the recovered amount from the input amount. Each data was taken from Figs. 16 and 17. Panel A, 4MU in normal rats; panel B, 4MU in EHBR; panel C, E3040 in normal rats; panel D, E3040 in EHBR. Statistical difference between Bcrp1 (-/-) mice and normal mice was compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

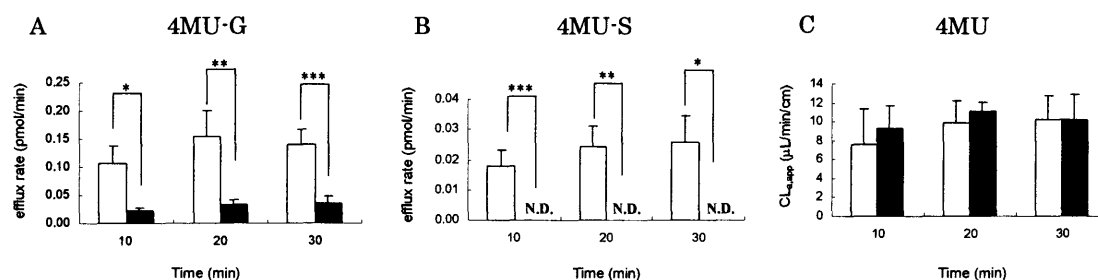


Fig.19 Time profile for the efflux rate of 4MU-G and 4MU-S and absorption clearance of 4MU in Bcrp1 (-/-) mice and normal mice.

Small intestinal segments were perfused with medium containing 10 μ M 4MU to determine the outflow concentrations. Panels A and B represent the efflux rate of 4MU-G and 4MU-S and panel C represents the absorption clearance of 4MU, respectively. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent determinations. Open and closed bars represent the results in normal mice and Bcrp1 (-/-), respectively. Statistical difference between Bcrp1 (-/-) and normal mice was compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). N.D., Not detected (< 20 nM)

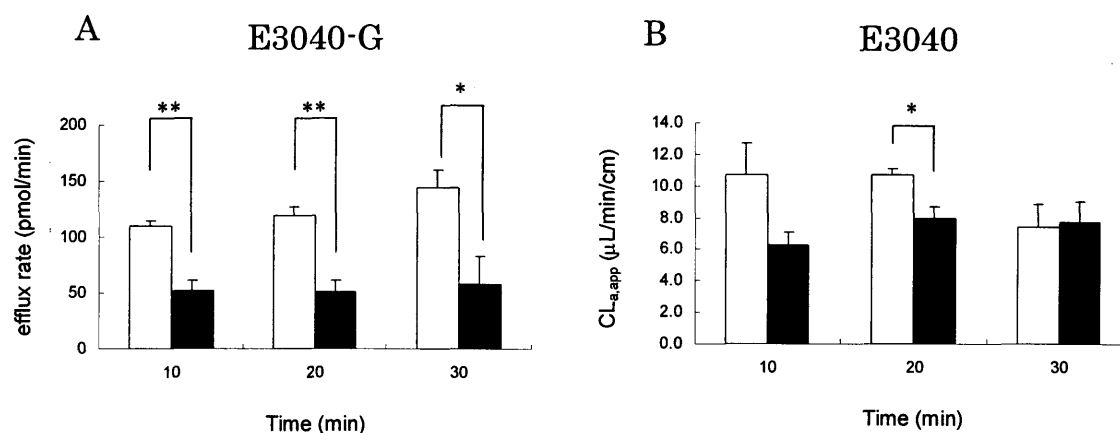


Fig. 20 Time profile for the efflux rate of E3040-G and absorption clearance of E3040 in Bcrp1 (-/-) and normal mice.

Small intestinal segments were perfused with medium containing 10 μ M E3040 to determine the outflow concentrations. Panel A represents the efflux rate of E3040-G and panel B represents the absorption clearance of E3040, respectively. Each point and vertical bar represents the mean + S.E. of three independent determinations. Open and closed bars represent the results in normal mice and Bcrp1 (-/-) mice respectively. Statistical difference between Bcrp1 (-/-) mice and normal mice was compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

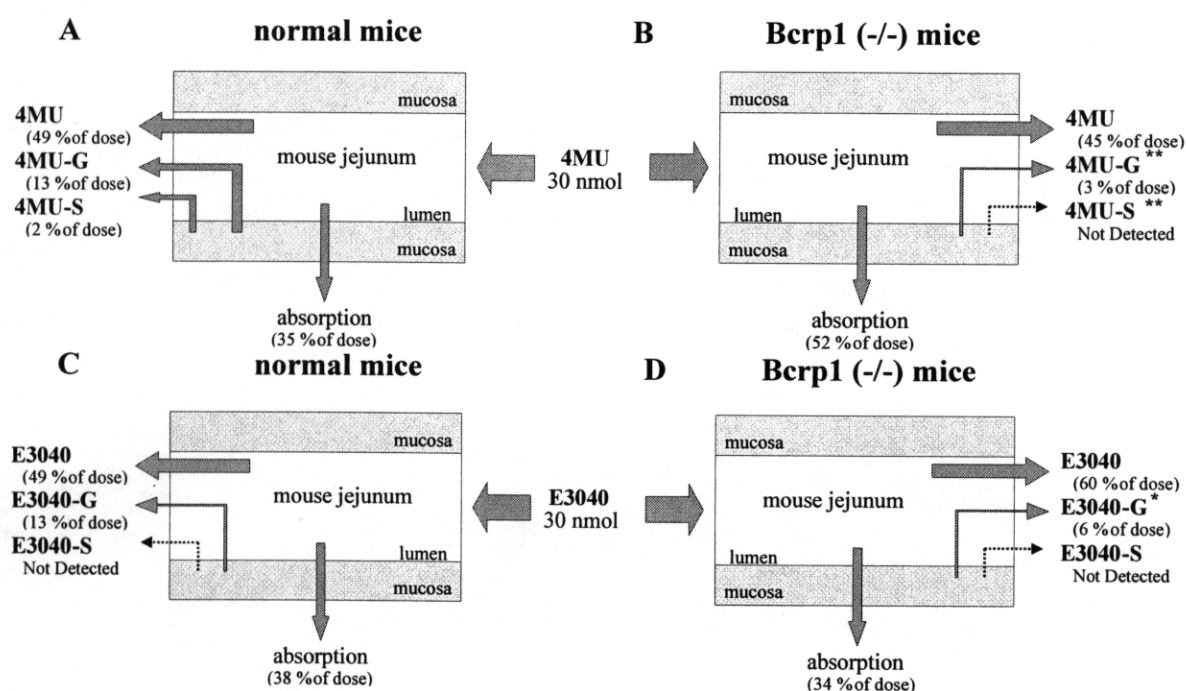


Fig. 21 Mass balance of 4MU and E3040 absorption in mouse intestinal perfusion experiments.

Summary of intestinal disposition of 4MU, E3040 and their metabolites. Absorption was defined by subtracting recovered amount from input amount. Each data was taken from Figs. 19 and 20. Panel A, 4MU in normal mice; panel B, 4MU in Bcrp1 (-/-) mice; panel C, E3040 in normal mice; panel D, E3040 in Bcrp1 (-/-) mice. Statistical difference between Bcrp1 (-/-) mice and normal mice was compared by two-sided Student's t-test with $p < 0.05$ as the limit of significance (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Table 7 Mucosal concentration of glucuronide and sulfate conjugates remaining in the intestine.

The concentration of glucuronide and sulfate conjugates of 4MU and E3040 remaining in intestine was determined at the end of experiments. Results are given as the mean + S.E. of three independent experiments. Statistical difference between Bcrp1 (-/-) mice and normal mice or EHBR and normal rats were compared by two-sided Student's *t*-test with $p < 0.05$ as the limit of significance.

	4MU-G	4MU-S	E3040-G	E3040-S
<i>pmol/g tissue</i>				
EHBR	917±263	1.25±0.38	861±25	2.26±0.44
normal rats	989±363	0.697±0.092	778±47	1.79±0.32
Bcrp1 (-/-) mice	768±149	73.4±16.1	114±9	N.D.
normal mice	751±158	56.5±34.0	90.0±17.0	N.D.

N.D.: Not detected

実験の部

第一章 薬物の脳移行性における MDR1 輸送能の評価について

試薬

[³H]Daunomycin (185 GBq/mmol), [³H]digoxin (703 GBq/mmol), [³H]diazepam (3052 GBq/mmol), [³H]dexamethasone (1500 GBq/mmol), [³H]17β estradiol-17β-D-glucuronide (E217βG; 1628 GBq/mmol), [³H]progesterone (5291 GBq/mmol) 及び [³H]verapamil (3145 GBq/mmol)は New England Nuclear (NEN)より購入した。また, [³H]Cimetidine (574 GBq/mmol), [³H]cyclosporin A (259 GBq/mmol) and [³H]vinblastine (411 GBq/mmol)は Amersham から, [³H]Quinidine (740 GBq/mmol)は ARC より購入した。非標識化合物は Sigma-Aldrich から購入した。

培養細胞による経細胞輸送実験

LLC-PK1 及びMDR1 発現 LLC-PK1 細胞(LLC-MDR1)は Dr. Peat Borst (The Netherlands Cancer Institute) より提供を受けた (95, 96)。LLC-MDR1 細胞は pFRCMV ベクターにヒト MDR1 cDNA をを導入して構築したプラスミドベクターpFRCMVMDR1.1 をリン酸カルシウム沈殿法にて LLC-PK1 細胞にトランスフェクションして作製した。いくつかのコロニーを 640nM の vincristine 下 2~3 週間かけて培養し, 耐性株の MDR1 含量を免疫染色法にて確認して単離した。LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞の培養は 10% FBS, 100U/mL の penicillin G と streptomycin を含む medium 199 (Sigma-Aldrich) を用いて, 37°C, 5% CO₂ 中で行った。

Caco-2 細胞は, 10% FBS, 100U/mL の penicillin G と streptomycin, 2mM のグルタミン酸, 1%の非必須アミノ酸を含む Dulbecco's modified eagle medium を用いて, 37°C, 5% CO₂ 中で培養した (97)。

経細胞輸送実験を行うために, LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞は, 1.4×10^5 cell/well の細胞密度で多孔性フィルター膜 (3 µm pore size, 0.31 cm², Falcon culture insert) 上に seeding した (61, 95, 96)。Caco-2 細胞は, 3×10^4 cell/well の細胞密度で多孔性フィルター膜 (3 µm pore

size, 0.31 cm², Falcon culture insert) 上に seeding した (61)。多孔性フィルター膜上で LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞は経細胞輸送実験まで 4 日間, Caco-2 細胞においては 21~23 日間培養した。経細胞輸送実験は 24 穴のプレートを用いて行った。プレインキュベーションを行う前に, 細胞をあらかじめ PBS で洗浄した。LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞は OPTI-MEM 中で, また, Caco-2 細胞は Hank's Balanced Salt solution (pH7.4) で 1 時間プレインキュベーションした。いずれの細胞も, apical 側に 250µL あるいは Basal 側に 950µL (ドナー側) のテスト化合物溶液を添加して, インキュベーションを開始した。各テスト化合物濃度は, 次の通りである。

[³H]cimetidine (37 kBq/mL, 64.5 nM), [³H]cyclosporin A (9.25 kBq/mL, 35.7 nM), [³H]daunomycin (37 kBq/mL, 200 nM), [³H]digoxin (37 kBq/mL, 52.6 nM), [³H]diazepam (37 kBq/mL, 12.1 nM), [³H]dexamethasone (37 kBq/mL, 24.7 nM), [³H]E217βG (37 kBq/mL, 22.7 nM), [³H]progesterone (37 kBq/mL, 7 nM), [³H]quinidine (37 kBq/mL, 50 nM), [³H]verapamil (37 kBq/mL, 11.8 nM), [³H]vinblastine (9.25 kBq/mL, 22.5 nM) 及び loperamide (非標識体, 1 µM)

細胞膜を透過した化合物量を求めるために, LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞では 1, 2 及び 4 時間後に, Caco-2 細胞では 1 及び 2 時間後にレシーバー側 (テスト化合物を作用させたドナー側の反対側) 100µL を採取した。採取量を補うために, 4 時間目のサンプリング以外には medium 100µL を, ドナー側に添加した。RI (radio isotope) 標識されたテスト化合物の場合, 4mL の液体シンチレーターを加え, 液体シンチレーションカウンターを用いて放射能濃度を測定した。

また, RI 非標識 loperamide については LC-MS/MS で測定した。すなわち, loperamide 試料には, 内部標準物質 (IS) として haloperidol を添加し, 固相抽出カラム (OASIS HLB) により, LC-MS/MS 測定の前処理を行った。HPLC による分離には, カラムにイナートシル ODS-3 (4.6mm ID×150mm L) を用いた。また, 移動相には, 0.1%酢酸水溶液とメタノールを用いて, 初期条件 55:45 のグラジエント条件で溶出した。移動相の流速は 0.5mL/min, カ

ラム温度は 40℃とした。エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) により分析対象物をイオン化し (positive ion), loperamide は m/z 477.2→265.7 の解裂を, haloperidol は 376.0→164.4 の解裂をモニターし (SRM 測定), クロマトグラムを得た。検量線より各試料中の loperamide 濃度を定量した。

PS(permeability-surface area) product は以下の式より計算した。

$$\text{PS product} = A / t / C_0$$

ここで, t, A 及び C_0 は, インキュベーション時間, 細胞蛋白あたりのテスト化合物透過量, ドナー側に添加したテスト化合物の初期濃度とそれぞれ定義した。また, flux ratio を以下のように定義した。

$$\text{flux ratio} = \frac{\text{PS}_{b \rightarrow a}}{\text{PS}_{a \rightarrow b}}$$

ここで, $\text{PS}_{a \rightarrow b}$ 及び $\text{PS}_{b \rightarrow a}$ は, apical to basal 方向の PS product と basal to apical 方向の PS product を表している。

LLC-PK1 及び LLC-MDR1 細胞を用いた経細胞輸送実験においては, さらに corrected flux ratio を求めた。

$$\text{corrected flux ratio} = \frac{\text{flux ratio in LLC - MDR1 cells}}{\text{flux ratio in LLC - PK1 cells}}$$

ATP 加水分解実験

ABC トランスポーターは, ATP 加水分解 ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$) と基質輸送が共役していることから, 各テスト化合物が ATP 加水分解を促進した場合, 基質として輸送されることを間接的に示している。本研究では, MDR1 輸送の評価の一手法として, ATP 加水分解促進作用

をヒト MDR1 発現昆虫細胞由来 plasma membrane (BD Gentest より購入) を用いて検討した (98, 99)。60 μ L の反応液中, plasma membrane をテスト化合物存在下, 非存在下の両条件でインキュベートした。反応液の構成は, 50 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, 50 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 2 mM ethyleneglycol bis(2-aminoethyl ether)-tetraacetic acid, 2 mM Tris HCl 及び 5 mM NaN_3 (pH 7.4) とした。5 分間プレインキュベーションした後, MgATP 溶液 20 μ L を添加し反応を開始した。MgATP の最終濃度は 4mM とした。20 分間インキュベーションした後, 30 μ L の 10% SDS を加え, 反応を停止した。この反応混合物に, 1.3% sulfuric acid, 0.2% ammonium molybdate, 2.3% trichloroacetic acid and 1% ascorbic acid を含む溶液 180 μ L を加え, 放出された無機リン酸の呈色反応を行った。この反応を 96 穴マイクロプレートで行い, プレートリーダーにて吸光度を測定した。Plasma membrane とテスト化合物のインキュベーションを vanadate 存在下, 非存在下で行い, vanadate 非存在下における ATP 加水分解活性から vanadate 存在下における ATP 加水分解活性を差し引いて, vanadate sensitive な ATP 加水分解活性を求めた。

正常マウス及び **mdr1a/1b** ノックアウトマウスを用いた組織分布実験

本実験は雄性正常マウス (23-28g, Taconic farm) 及び **mdr1a/1b** ノックアウトマウス (23-28g, Taconic farm) を用いた。本実験は過去の報告と同様に行った (95, 96, 100)。すなわち, RI 標識されたテスト化合物 {[^3H]daunomycin (2 kBq (177 pmol) /g body weight), [^3H]progesterone (2 kBq (351 pmol) /g body weight) and [^3H]diazepam (3 kBq (318 pmol) /g body weight)}は注射用蒸留水で溶解し(5 μ L/g body weight), 尾静脈よりおよそ 5 秒間で静脈内に投与した。投与は, エーテル麻酔下で行った。投与してから 30 分後, エーテル麻酔下, 副大動脈より全血を採取した。ヘパリン処理した血漿は, 全血を遠心分離して採取した。採取した臓器 (脳, 肝, 腎) は質重量を測定し, 生理食塩水でホモジネートした。血漿 (50 μ L) 及び各ホモジネート (200 μ L) にシンチレーター (ハイオニックフロー) 10 mL を加え, 液

体シンチレーションカウンターにて、放射エネルギーを測定した。未変化体の割合は、daunomycin の場合は HPLC (蛍光検出) で、また、diazepam 及び progesterone の場合は TLC で分析した。組織体血漿中濃度比は、未変化体の濃度から算出した。Daunomycin の定量は、Inertsil C8 (4.6 mm ID×150 mm L)を用いたグラジエント条件下で行った。グラジエント条件は以下の通りとした。アセトニトリル含量 25 % (0 min) → 40 % (20 min)。このとき流速は、1mL/min とした。移動相には、10 mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリルを用いた。移動相を 1 分ごとに集め、放射エネルギーを測定した。Diazepam の TLC 条件は以下の通りとした (101)。5×20 cm の TLC プレート (Merck 5714) を hexane: chloroform: ethanol: acetic acid (10:10:1:1)からなる展開溶媒で展開した。Progesterone も同様に、5×20 cm の TLC プレート (Merck 5714) を、cyclohexane : ethyl acetate (2 : 1)溶媒で展開し、分析した。RI 非標識体との co-chromatography により、未変化体のバンドを同定した。その部分を削り取り、シリカゲル中に含まれる放射エネルギーを、液体シンチレーションカウンターにて測定した。

マウス脳毛細血管内皮細胞管腔側膜に発現する mdrl の輸送機能を定量的に評価できるパラメーターとして、以下の式に基づき $K_{p,brain}$ を求めた。

$$K_{p,brain} \text{ ratio} = \frac{\text{the brain - to - plasma concentration ratio in mdrl(-/-)mice}}{\text{the brain - to - plasma concentration ratio in normal mice}}$$

さらに、過去の報告からも、 $K_{p, brain \text{ ratio}}$ を上式により算出した。

全身オートラジオグラフィー (ARG) の作成

前項に記載したように [^3H]daunomycin (18.5 kBq (0.1 nmol)/g body weight), [^3H]progesterone (18.5 kBq (3.5 pmol)/g body weight) and [^3H]diazepam (18.5 kBq (6.1 pmol)/g body weight)を静脈内投与後 30 分で各動物をエーテル麻酔下安楽死させた。バリカンで剃毛した後、鼻腔及び肛門を 5%の sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) で満たした。ドライアイス-アセトン (-70°C) でラットを凍結し、前後の足と尻尾を除去した。さらに、マイクロームステージ上の 5% CMC-Na に固定し、ドライアイス-アセトン (-70°C) で再度凍結した。

Cryomicrotome (PMV 450 MP, LKB)を用いて、35 μm の厚みで切片を調製し、接着テープに固定した (No. 810, Sumitomo 3M)後、約 -25°C で凍結乾燥した。遮蔽容器内で、各切片を 4 日間イメージングプレートと接触させた。イメージングプレート上の放射能イメージはバイオイメージアナライザー (BAS2000, 富士写真フイルム) で読み取り、ラジオルミノイメージを作成した。