

消化管トランスポーター群を介したイオン性薬物の 吸収・分泌輸送活性の分子機構論的解析

著者	成橋 和正
著者別名	Naruhashi, Kazumasa
雑誌名	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査 結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
巻	平成15年12月
ページ	386-390
発行年	2003-12-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/16581

氏名	成橋和正
生年月日	
本籍	岐阜県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第253号
学位授与の日付	2002年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	消化管トランスポーター群を介したイオン性薬物の吸収・分泌輸送活性の分子機構論的解析
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	鈴木 永雄(研究科・教授) 宮本 謙一(医学部附属病院・教授) 加藤 将夫(薬学部・助教授) 横井 毅(医学系研究科・教授)

学位論文要旨

Intestinal transporters are equipped to absorb nutrients and to prevent from various toxic xenobiotics and they also transport various drugs. The purpose of this study was to identify the transporters responsible for ionic drugs in the intestine and to elucidate their roles on the intestinal absorption of drugs. *p*-Aminohippurate (PAH), an anionic compound, showed secretory-directed transport. It was demonstrated for PAH that MRP-like transporter and another anionic-sensitive exchanger were responsible for the secretory transport across apical and basolateral membranes, respectively. For quinolone antimicrobials having zwitterionic form at the physiological pH, P-glycoprotein and MRP2 as well as an anionic exchanger were demonstrated to be responsible for secretion both in vitro and in vivo. The absolute expression levels of PepT1 mRNA in the intestine were significantly correlated with the absorptive transport activity of cefadroxil in fed and starved rats. In methotrexate-induced intestinal injured rats, the intestinal mucosal weight was well correlated with oral cephalixin absorption. In vitro experiment using intestinal Caco-2 cells, unstirred water layer effect makes it difficult to detect transporter-mediated permeation of some drugs with high permeability coefficients. As oral pharmaceuticals are important in clinical settings, the present study will provide basic information for individualized therapy and for prevention of adverse effects.

医療における薬物療法は不可欠なものであり、人口の高齢化に伴う慢性疾患に対する長期治療の比率も高まっており、薬物療法の重要性がさらに増してきている。患者のコンプライアンスや quality of life の観点からも、経口剤の利用は不可欠であり、医薬品開発において、薬物の消化管吸収機構を解明することは重要である。小腸の重要な機能である栄養物吸収と異物侵入防御に対し様々な吸収系ならびに分泌系のトランスポーターが関与していると考えられる。薬物は、この両者の影響を受けることが報告されており、薬物の輸送にある特定のトランスポーターが関与するというような研究は多くなされている。トランスポーターの基質特異性、基質認識性が比較的広いことを考えると、消化管吸

収でトランスポーターに起因する薬物相互作用が考えられる。そこで、本研究ではイオン性薬物の消化管における輸送機構を吸収・分泌トランスポーターの関与について総括的に明らかにすることとした。

1. アニオン性化合物パラアミノ馬尿酸の消化管輸送機構

臨床でカルボン酸骨格を有する薬物が経口投与剤として多く使用されている。これまでに、酢酸、ニコチン酸、安息香酸、サリチル酸などのモノカルボン酸の消化管吸収にモノカルボン酸トランスポーターやアニオン交換輸送系が関与すること、一方でフェノールレッド、カルセインなどは小腸組織で分泌指向性の輸送を示すことが報告されてきた。しかし、アニオン性薬物の消化管輸送機構については包括的な検討がなされていなかった。そこで、アニオン性薬物輸送研究、特に、腎臓における分泌研究でこれまでもモデル化合物として用いられてきたパラアミノ馬尿酸について、小腸モデル細胞である Caco-2 細胞ならびに単離小腸組織を用いてその消化管輸送特性を明らかにした。Caco-2 細胞においてはパラアミノ馬尿酸の輸送はごく小さいものであったが分泌指向性を示し、分泌トランスポーターが関与することが示された。吸収方向の輸送は細胞間隙透過マーカールとほぼ同程度であり、吸収には輸送系の関与はないものと考えられた。この分泌輸送に関与するトランスポーターとして、基底膜側から細胞内への取り込みには何らかのアニオン感受性のトランスポーターが、細胞内から刷子縁膜側への排泄には multidrug resistance-associated protein (MRP) 様のトランスポーターが関与することが明らかとなった。一方、ラット単離小腸組織においても分泌指向性が見られ、この分泌輸送活性は小腸下部で顕著であった。吸収系の実体は不明であるがラット単離小腸組織では何らかの吸収輸送機構が関与している可能性も示された。

2. 両性イオン化合物キノロン系抗菌薬の消化管輸送機構

キノロン系抗菌薬は広い抗菌スペクトルを有し抗菌作用も強力であるという薬理的特性に加え、吸収性・組織移行性の点で薬物動態的にも優れた薬剤として広く使用されている。多くのキノロン系抗菌薬は生理的 pH において両性イオン形で存在しているにもかかわらず吸収性が良好なことを考えると、吸収トランスポーターの関与が考えられる。一方で、消化管においてキノロン系抗菌薬が分泌トランスポーターの作用を受けることが報告されている。実際、他臓器でキノロン系抗菌薬輸送にトランスポーターが関与することも明らかにされつつある。トランスポーターに関する相互作用を考えた場合、両性イオン形であるキノロン系抗菌薬は、アニオン、カチオン、両性イオンに感受性のあるトランスポーターのいずれによっても輸送され、様々な系統の薬物と相互作用する可能性が考えられる。そこで、新規開発中である grepafloxacin (GPFX) を中心とするキノロン系抗菌薬の消化管における輸送特性を Caco-2 細胞ならびにラット単離小腸組織を用いて明らかにした。吸収に関して何らかのアニオン交換輸送系が関与している可能性が示唆された。しかし、その寄与率はそれ程大きくはなく、他のトランスポーターや単純拡散による部分が大きいと考えられた。また、分泌トランスポーターの関与も示唆され、P-glycoprotein (P-gp)、MRP2 ならびに他のアニオン感受性の輸送系が関与していることが阻害実験により示

された。P-gp に関しては P-gp 過剰発現細胞 LLC-GA5-COL150 細胞と親株の LLC-PK1 細胞の輸送を比較し、GPFX、levofloxacin、sparfloxacin が基質であることを明確にした。また、MRP2 に関しては、mrp2 遺伝子欠損 Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) の単離小腸組織を用いた検討により明確にした。さらに、in vivo での GPFX の消化管分泌に対する P-gp や MRP2 の機能的役割を、P-gp 遺伝子欠損 mdrla(-)/1b(-) マウスならびに EHBR で検討した。いずれの分泌トランスポーターも、体内から消化管管腔内への分泌には促進的に働いているが、吸収障壁としては P-gp は大きく関与するものの、MRP2 の寄与はほとんどないものと考えられた。

3. トランスポーター発現量と輸送活性

PepT1 はジ・トリペプチドの吸収に対して重要な役割を果たしているトランスポーターであるが、 β ラクタム系抗生物質をはじめとするペプチド類似薬物やその他の薬物を輸送する。消化管における薬物トランスポーターとして最も研究がなされているのは PepT1 である。分子生物学的手法を用いることにより PepT1 の輸送特性は詳細に研究され、薬物吸収に対する PepT1 の寄与が大きいという考え方は強く支持される。しかし、これまでの研究はいずれも現象論的解析にとどまっておき、トランスポーターの薬物輸送活性と発現量について定量的かつ総合的な証明はなされていない。分子生物学の実験技術の進歩により、定量性の精度が高く、正確な mRNA 発現量を絶対値として測定が可能なリアルタイム PCR 法が開発された。ラット小腸の部位差について、リアルタイム PCR 法で PepT1 mRNA 発現量の絶対的定量を行い、PepT1 の吸収活性を測定し、これらの間での相関性を評価し、トランスポーターの薬物吸収に対する重要性を実証した。PepT1 mRNA 発現レベルを摂食ラットと絶食ラットの小腸の部位差について絶対定量したところ、小腸下部で発現が高いこと、絶食により発現が誘導され、その誘導は中部で最も顕著であることが明らかとなった。また、他のトランスポーターと比較して mRNA の絶対的発現量は比較的高く、主要な役割を果たしていると考えられた。摂食ならびに絶食ラット単離小腸組織における cefadroxil の吸収方向の輸送を測定することで PepT1 の輸送機能を評価したところ、PepT1 mRNA の発現量の部位差や誘導された発現量に伴った輸送が観測され、両者の間に有意な相関があった。この結果は、刷子縁膜ならびに基底膜の各膜輸送過程を合わせた吸収過程と PepT1 mRNA 発現量との間に一定の相関が得られたということを示しており、消化管吸収過程全体において PepT1 が重要であることが明確になった。すなわち、PepT1 の発現量の違いにより小腸での PepT1 の吸収能が規定されていることが証明された。

4. 病態時の消化管における薬物吸収活性

病態により薬物吸収能が変化することは古くから知られている。なかでも、抗癌剤の投与では、小腸粘膜細胞に対する直接的な毒性により萎縮し、消化管機能が低下する。中心静脈栄養法施行患者では小腸機能が低下するといわれており、消化管機能を正常な状態に維持するには適度な繊維質・固形物を含む食物の経口摂取が重要であると考えられている。したがって、消化管障害を形態と機能の側面から正確に診断することは重要であり、その後の治療に役立てることは有用であると考えられる。PepT1 は薬物吸収トランスポーターとしての

みならず栄養物吸収トランスポーターとしての役割を持つ点で興味深いことから、葉酸代謝拮抗作用を持つ抗癌剤 methotrexate (MTX) をラットに投与して一過性消化管障害モデル動物を作製し、PepT1 の基質である cephalixin (CEX) の経口吸収により PepT1 の輸送機能を見積もるとともに、小腸の形態学的変化（粘膜重量比の変化）との間の相関について検討した。また、臨床的側面から考えると、血液検査は簡便であるため、消化管粘膜中酵素の変動がその障害の指標となる可能性についても検討した。MTX によるラット消化管障害誘発時ならびにその後の回復過程において CEX の経口吸収量は粘膜湿重量の変化に伴って変動し、両者の間に有意な相関が認められた。消化管粘膜中酵素に関しては、有意な相関はなかった。CEX の経口吸収量の変化は小腸全体としての吸収活性、すなわち PepT1 の吸収能を反映していると考えられるため、MTX による消化管障害時、ならびにその後の回復過程において、経口投与による CEX の吸収量の変化を測定することにより、消化管吸収機能ならびに MTX による消化管の障害の程度を推定できる可能性が示された。

5. 薬物輸送実験におけるトランスポーター関与のより正確な検出法

医薬品開発段階で、関与する薬物代謝酵素を同定することの重要性が認識されており、トランスポーターについても、今後、注目されるものと思われる。トランスポーター機能を検討する上で、簡便さや正確さの点で *in vitro* 実験系を用いることは有用である。しかし、適切な実験系を用いなければ本来関与するはずのトランスポーターが同定できない場合もあり得る。医薬品開発では、このような初期の段階での誤判定はその後の開発研究に大きな影響を与えるため、的確に評価することは重要である。先に示したキノロン系抗菌薬 GPFX の分泌指向性輸送の阻害剤の作用の仕方は、実験系間で異なった。Caco-2 細胞では見かけの分泌透過係数に変化がみられず誤判定の可能性があった。GPFX は分泌トランスポーターの関与を含め、細胞透過が非常に速く、Caco-2 細胞実験系では非攪拌層が律速となることが考えられた。そこで、この非攪拌層の寄与により実験結果が隠蔽されているのではないかと考え、非攪拌層の寄与を明らかにすることとした。実験中に実験溶液の攪拌を行うことで非攪拌層の影響を小さくして非攪拌層の透過速度を速めたり、実験温度を低下させトランスポーター活性を維持しつつもトランスポーターを介する輸送を含む膜透過速度を非攪拌層透過速度より低下させることで、隠蔽されていた阻害効果、すなわち、Caco-2 細胞での GPFX の分泌方向の透過に対する阻害剤効果が、見かけの透過係数の変化として見られるようになった。このような細胞膜透過速度が速い薬物については、非攪拌層など実験系が持つ律速段階を十分に考慮した解析の重要性が確認され、より適切な方法、すなわち、膜透過が律速となるような条件下で実験をすることで、種々トランスポーターの関与をより正確に検出できることが示された。

本研究では、消化管におけるイオン性薬物の輸送に関してトランスポーターが重要な機能的役割を演じていることを証明した。本研究で示したように、一つの薬物に複数のトランスポーターが協奏的に関与することによって消化管吸収が行われる。まだ臨床的にこれらの明確な知見は少ないが、本研究で得られ

た知見は、患者個人にあったオーダーメイド医療や、有害作用を回避する医療における基礎的情報として、有用であると考ええる。

学位論文審査結果の要旨

脂溶性薬物の消化管における吸収と分泌にはそれぞれ単純拡散による輸送と P-糖タンパク質による分泌輸送が関与しているとの知見が蓄積してきたが、比較的水溶性の薬物の吸収機構については依然として不明である。後者の消化管吸収性においては、トランスポーターを介した吸収と分泌のバランスによって進行すると考えられているが、未だにトランスポーター関与の実証には至っていない。成橋君は、イオン性薬物の消化管吸収における吸収・分泌トランスポーターの役割とその寄与について、イオン性モデル薬物を用いて以下に列挙する新規な知見を得た。

- (1) 腎尿細管上皮細胞をトランスポーターを介して分泌されるパラアミノ馬尿酸のヒト小腸培養細胞 Caco-2 とラット小腸単離組織における側基底膜と刷子縁膜における分泌方向への輸送にはそれぞれアニオン感受性のトランスポーターと multidrug resistant associated protein の分子種 MRP2 が関与している可能性があること。
- (2) 両性イオン型薬物として用いたキノロン系抗菌薬 grepafloxacin の Caco-2 細胞とラット小腸単離組織における輸送において、刷子縁膜からの吸収方向にアニオンとの交換によって吸収が駆動されるトランスポーターの関与があり、分泌方向には P-糖タンパク質と MRP2 の関与があること。
- (3) H^+ /ペプチドトランスポーターを介して輸送される cephalixin のラット消化管からの吸収は methotrexate による粘膜障害の程度によって影響を受けること。消化管部位および絶食条件によって変動する cefadorixll (CDX) の吸収が組織に発現する H^+ /ペプチドトランスポーターの mRNA の発現量と良好な相関があること。CDX の吸収変動は mRNA の発現量のみならず輸送の駆動力であるプロトン濃度の変動の影響を受けること。

以上の結果は、イオン性薬物の消化管吸収性が吸収・分泌に関わるトランスポーター群の相対的な寄与によって決定されることを示したものであり、経口医薬品の開発のみならず、医薬品の適正使用に対して有用な知見を与えるものと思われることから、本論文は博士（薬学）論文に値するものと判断された。