

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670011

研究課題名(和文)ABC膜輸送体を標的とする経皮薬物デリバリーシステムの開発研究

研究課題名(英文)Transdermal drug delivery targeted to xenobiotics ABC transporters expressed in the skin

研究代表者

加藤 将夫(Kato, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Breast cancer resistance protein (BCRP)とp-glycoprotein (P-gp)は多様な物質を細胞外へ排出する膜輸送体である。本研究では経皮投与医薬品に含まれる添加剤でこれら膜輸送体を制御することを目的とした。BCRPの機能を阻害する添加剤を複数見出した。BCRPに対する阻害定数は、添加剤のオクタノール/水分配の計算値(xlogP)と相関した。見出された添加剤はBCRPによる基質の経細胞輸送や、除毛マウス皮膚に投与したrhodamine 123の真皮および血漿中への移行量を低下させた。以上より、皮膚ABC膜輸送体の添加剤による制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer resistance protein (BCRP) and P-glycoprotein (P-gp) are ATP binding cassette (ABC) transporters which are expressed in various organs including skin and pump out various xenobiotics compounds from the cells. The present study was designed to find excipients used in transdermal pharmaceuticals which exert potential inhibition of these dermal ABC transporters with an aim to possible control of drug disposition inside the skin. We searched various excipients and found several compounds which inhibit BCRP function. Their inhibition constant for BCRP was correlated with calculated value of octanol/water partition coefficient (xlogP). One of such excipients inhibited BCRP-mediated transcellular transport of its substrate and reduced distribution of rhodamine 123 into dermis and circulating blood after transdermal administration. The present finding thus suggests possible strategy for control of dermal ABC transporter using pharmaceutical excipients.

研究分野：薬物動態学

キーワード：経皮吸収 貼付剤 添加剤 トランスポーター ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

Breast cancer resistance protein (BCRP) と p-glycoprotein (P-gp) は、ATP の加水分解エネルギーを駆動力として多種多様な物質を細胞外へ排出する膜輸送体である。我々はヒトおよびマウス皮膚組織にこれら膜輸送体が発現することを報告(1)するとともに、これら膜輸送体の遺伝子欠損マウスを用いることによって、皮膚における機能的な発現を示した(2)。すなわち、これら膜輸送体の基質である rhodamine 123 を経皮投与後の皮膚中濃度と血漿中濃度を測定したところ、野生型マウスに比べ *bcrp* と *p-gp* の遺伝子欠損マウスにおいて顕著に低下していたことから、これら膜輸送体が基質を表皮側から真皮側方向へ輸送することが示唆されている(2)。この時、皮膚組織を表皮層と真皮層に分離して rhodamine 123 濃度を測定したところ、遺伝子欠損マウスにおいて、野生型マウスと比べ、表皮中濃度に変化はなかった一方、真皮中濃度は低下した(2)。従って、皮膚は表皮と真皮の2つの compartment からなっていることが示唆された(2, 図 1)。このことは、ヒトやマウス皮膚組織において BCRP や P-gp 抗体を用いた免疫染色によってこれら膜輸送体が表皮の基底層や真皮の血管内皮に検出されること(2,3)からも支持される。皮膚は外来異物から生体を守る臓器と考えられている一方、これら ABC 膜輸送体が基質を表皮から真皮方向(吸収方向)に輸送することは興味深い。またこのことは、適切な阻害剤等を用いてこれら皮膚膜輸送体を制御することで、基質となる物質の皮膚での分布量を調節できる可能性を示唆する。しかしながらこれまで、皮膚 ABC 膜輸送体に及ぼす阻害剤の影響は全く報告されていない。

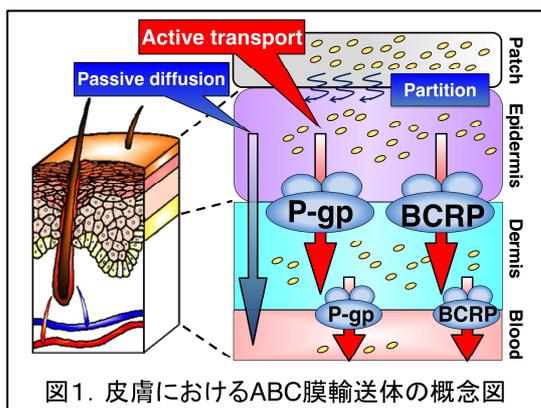


図1. 皮膚におけるABC膜輸送体の概念図

2. 研究の目的

皮膚 ABC 膜輸送体の機能を調節する目的で、経皮投与医薬品に含まれる添加剤に着目した。すなわち、添加剤による BCRP と P-gp の機能に及ぼす影響を解析し、これら膜輸送体に阻害効果を示すものを見出し、皮膚 ABC 膜輸送体機能制御による経皮投与薬の体内動態制御を目的とした。皮膚 ABC 膜輸送体を阻害することにより、当該輸送体で輸送される経皮投与薬の皮膚での滞留性を高める

一方、循環血中への吸収を抑えることが可能となる可能性がある。このことは皮膚局所で働く薬物の薬効を維持しながら副作用を軽減する方法論の構築にもつながる。

3. 研究の方法

(1) 試薬および実験動物

Rhodamine 123、Hoechst 33342 は Sigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO) より、FVB マウス(FVB/NJcl、雄性、7-8 週齢)は日本クレア(Tokyo, Japan)より購入した。動物はすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由に与えられた。すべての動物実験は金沢大学動物実験指針に従って行った。

(2) BCRP、P-gp 発現細胞を用いた輸送実験

BCRP ないし空ベクター安定発現 MDCKI 細胞(MDCKI/BCRP、MDCKI/mock)に、種々の濃度の添加剤を含む 5 μM Hoechst 33342 溶液を添加し、20 分後に蛍光観察した。画像解析ソフト Image J を用い、蛍光の強さを 10 回繰り返して測定し、これを 3 preparation で行い数値化した。P-gp 発現 LLC-pK1 (LLC-pK1/MDR1) 細胞、ないしは control の LLC-pK1 細胞における rhodamine 123 の経細胞輸送を種々の添加剤存在下で行い、添加剤による阻害効果を検討した。

(3) In vivo 経皮投与実験

実験開始 72 時間前に除毛した麻酔下 FVB マウスの胴体の毛を動物用バリカンで剃った後、除毛クリームを適量塗り温水で洗い流した。実験当日、セロテープを用いて腹部皮膚角質層を剥離後、投与液 100 μL (rhodamine 123 および添加剤) を染み込ませたパッチを腹部に貼付し、6 時間後に尾静脈から血液を採取した。70%エタノールを含ませたティッシュで腹部皮膚を拭き取り皮膚を採取した。

4. 研究成果

(1) BCRP、P-gp に及ぼす添加剤の影響

膜透過性が良いと思われる電気的中性物質、皮膚表面の電荷と比較的強く相互作用すると思われる極性物質など、幅広い極性を有する構造類似体を検討対象に 16 種類の添加剤による BCRP ならびに P-gp に対する阻害効果を、MDCKI/BCRP および LLC-pK1/MDR1 細胞で検討した。BCRP の典型的な蛍光基質として Hoechst 33342 を用い、種々の濃度の添加剤存在下で MDCKI/BCRP 細胞に添加し、添加剤濃度依存的な蛍光強度の上昇を阻害効果の指標としてスクリーニングしたところ、いくつかの添加剤による阻害効果が認められた。各添加剤の BCRP に対する阻害定数 (K_i 値; 50%阻害を与えるのに必要な濃度) を求めたところ、 K_i 値は分子量とは明確な相関を示さない一方、 $xlogP$ (オクタノール/水分配の計算値) とはやや相関関係が認められ、 $xlogP$ が 3~4 付近で最も低い K_i 値(強い阻害効果)が得られた(図 2)。

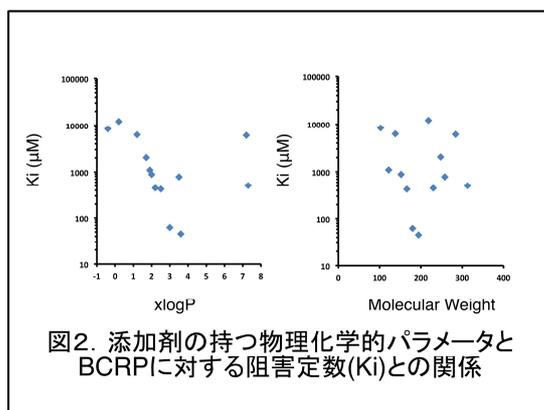


図2. 添加剤の持つ物理化学的パラメータとBCRPに対する阻害定数(Ki)との関係

続いて、BCRP に対する阻害効果をより明確に示す目的で、BCRP による Hoechst 33342 の経細胞輸送に対する添加剤の効果を検討したところ、control においては BCRP による排出を反映して basal から apical 方向が逆方向よりも高かったのに対して、添加剤共存下ではそのような方向性が低下した（図3）。一方で、P-gp に及ぼすこれら添加剤の影響を LLC-pK1/MDR1 細胞における rhodamine 123 の経細胞輸送に対する影響を指標に検討したところ、陽性対照として用いた vitamin E TPGS では阻害効果が見られた一方で、明確な阻害効果を示す添加剤は見出せなかった。

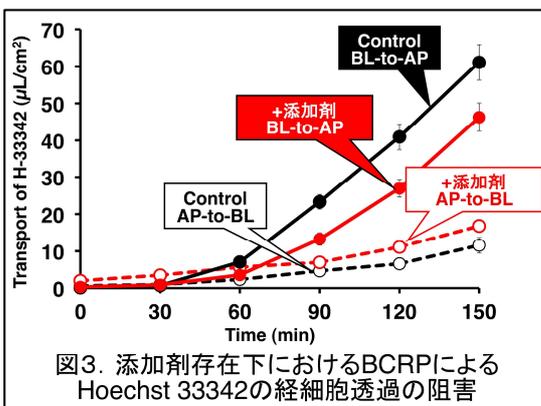


図3. 添加剤存在下におけるBCRPによるHoechst 33342の経細胞透過の阻害

(2) In vivo 経皮投与実験

BCRP に対する阻害効果を示す添加剤について、in vivo での阻害効果を実証する目的で、除毛マウス皮膚に rhodamine 123 と同時投与したところ、投与後の表皮中 rhodamine 123 濃度に対してほとんど影響を示さない一方で、真皮中濃度と血漿中 rhodamine 123 濃度はともに低下した。このような阻害効果は、BCRP や P-gp 阻害剤 ketoconazole と同様(2)であり、当該添加剤が in vivo で膜輸送体阻害効果を示すことが示唆された。

(3) 考察

以上より、添加剤の一部が皮膚に発現する ABC 膜輸送体の機能を阻害することが示唆された。さらに in vivo での rhodamine 123 の経皮吸収に対して一部の添加剤が阻害効果を示したことは、当該添加剤が皮膚 ABC 膜輸送体に影響を与えることを示唆した。経

皮投与された rhodamine 123 の循環血中への吸収には BCRP と P-gp が関与することが、遺伝子欠損マウスや阻害剤を用いた実験から示唆されている(2)。一方で、rhodamine 123 は膜輸送体の典型的基質に過ぎず、生体に効果を示す薬物に対して皮膚 ABC 膜輸送体などの程度の役割を果たすかについては、未だ十分に解明されていない。現在、我々はこの点の検討を進めており、preliminary な結果ながら、一部の貼付薬の皮膚からの吸収に ABC 膜輸送体が関与することを示唆するデータを得ている。今後のさらなる検討により、皮膚 ABC 膜輸送体の役割の全容を解明し、その機能調節による新たなドラッグデリバリーシステム構築につなげることが求められる。

<引用文献>

- (1) Li Q, Tsuji H, Kato Y, Sai Y, Kubo Y, Tsuji A. Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin. *J Control Rel* 110(3): 542-556, 2006.
- (2) Hashimoto N, Nakamichi N, Uwafuji S, Yoshida K, Sugiura T, Tsuji A, Kato Y. ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate. *J Controlled Rel* 165(1): 54-61, 2013.
- (3) Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM. P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Exp Dermatol* 20(5): 450-452, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) 中道範隆、及川真志、加藤将夫
皮膚に発現するトランスポーターとその役割 *コスメテックジャパン* 4(2): 17-21, 2014. 査読無
- (2) 加藤将夫 トランスポーターと医薬品毒性の複雑な関係 *谷本学校毒性質問箱：他では聞けない、くすり開発現場の基礎知識* (サイエンティスト社), 15号: 41-49, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計2件)

- (1) Kato Y, Masuo Y and Nakamichi N. ABC transporters involved in xenobiotics disposition in the skin. Meet the Experts: Transporter Conference Tokyo 2015, May 13, 2015, Tokyo Marriott Hotel, Japan. (招待講演)
- (2) 加藤将夫 創薬、薬物治療への応用を目

指すトランスポーター研究 第 50 回薬
剤学懇談会 6月26日-28日、2013、シ
ャトレーゼ ガトーキングダムサッポロ、
札幌（招待講演）

〔図書〕（計1件）

- (1) Sugiura T, Umeda S, Tsuji A, Kato Y. PEPT
(SLC15A) family. In: "Pharmacogenomics of
Human Drug Transporters," edited by
Ishikawa T, Kim RB, König J, Aptara Inc.,
pp223-242, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 将夫 (KATO, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中道 範隆 (NAKAMICHI, Noritaka)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：10401895

若山 友彦 (WAKAYAMA, Tomohiko)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70305100

(4)研究協力者

加納 聡 (KANO, Satoshi)