

# 薬物の腎排泄および消化管吸収に及ぼすトランスポーターの影響とカニクイザルにおける低吸収性の要因

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/26745">http://hdl.handle.net/2297/26745</a>

氏名	西村 友宏
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第907号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	薬物の腎排泄および消化管吸収に及ぼすトランスポーターの影響とカニクイザルにおける低吸収性の要因
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	官本 謙一(医学部附属病院・教授), 横井 毅(医学系研究科・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授), 松下 良(自然科学研究科・助教授)

To investigate the involvement of transporters in gastrointestinal absorption and renal secretion of organic anions, we initially aimed to clarify the mechanism of uptake of organic sulfates (novel loop diuretic, M17055, and estrone-3-sulfate). Uptake and its inhibition study by Caco-2 cells and mouse small intestine suggest that OATP2B1 and Oatp1a plays a major role in the uptake of these organic sulfates from apical membranes, respectively. Transport studies using renal cortical slices and brush border membrane vesicles suggest that plural organic anion transport systems are involved in M17055 transport in the proximal tubules, a part of the renal uptake being mediated by OAT1.

Oral bioavailability of some drugs is substantially low in cynomolgus monkeys than in various other species, including humans. In the present study, midazolam and etoposide were used as a model drug to investigate the reason for the lower bioavailability in these monkeys. To examine the roles of intestinal metabolism and transport, I evaluated apical-to-basal and basal-to-apical transport of midazolam and etoposide using an Ussing-type chamber. Thus, I conclude that an asymmetric distribution of metabolic activity in the small intestine, leading to extensive metabolism during uptake from the apical cell-surface, accounts for the minimal oral bioavailability of midazolam in cynomolgus monkeys. Furthermore, our kinetic analysis indicated apical uptake limited etoposide absorption in monkey small intestine.

経口で投与される薬物は服用後、消化管より吸収され、全身に分布し、主に肝臓での代謝や腎臓での排泄によって消失する。近年、このような薬物の体内動態のうち吸収、分布、排泄の各過程で薬物トランスポーターが寄与し、薬物の組織移行を制御していることが示されつつある。しかし、多数の医薬品のうちトランスポーターが体内動態に影響していることを示された例はまだ少なく、依然としてほとんどの医薬品の体内動態機構は未解明な点が多い。多種多様な医薬品および医薬品候補化合物のヒトでの体内動態機構が非臨床試験から予測できるようになるためには、多くの薬物の体内動態機構をヒトおよび実験動物において明らかにする必要がある。本研究では上記のトランスポーターによる制御では説明がつかない薬物をモデル薬物に選択し、その体内動態機構を明らかにすることを試みた。

また近年、医薬品の臨床試験において薬物動態特性が原因で開発を中止する例は減ってきているものの、ヒトにおける薬物動態特性の予測は依然として困難であるのが現状である。ヒトに遺伝的に近い動物であるほど、ヒトと類似した特性を備えていると期待されるが、実際にはカニクイザルなどサルを用いた薬物動態試験はヒトと乖離しており、本研究においては現在最も問題であると思われるサルの消化管吸収特性を明らかにすることを試みた。

消化管におけるトランスポーターの重要性を検討するために、生理的な pH において主にイオン型として存在し、単純拡散の影響を受けにくいと考えられるが、経口投与時において消化管吸収が良好であり、消失過程におけるトランスポーターの関与を検討するために、肝、腎に血中濃度よりも高い濃度の薬物が移行するか、もしくは腎クリアランスが糸球体濾過速度で説明できない薬物として新規ループ利尿薬 M17055 を選択した。M17055 は分子内に硫酸残基を持つアニオン性薬物であるが、水溶性が高く、pKa が 2.39 であることから生理的 pH においては大部分がイオン形で存在すると考えられる。健常人ボランティアによる臨床試験では M17055 のバイオアベイラビリティは比較的良好で約 42-60% 程度であり、このように生理的 pH においてイオン形で存在する化合物は、pH 分配仮説に基づいた膜透過理論では良好な消化管吸収性を説明できない。したがって、小腸において何らかの吸収機構を介すると考えられた。また一方でラットにおいて、算出された M17055 の腎クリアランスは糸球体濾過速度よりも顕著に高く、腎排泄機構に薬物トランスポーターが関与すると考えられた。

ヒトの消化管吸収を *in vitro* で解明するために、ヒト大腸がん由来で広く消化管吸収のモデル細胞として用いられている Caco-2 細胞を用いることとした。Caco-2 細胞への M17055 の取込み輸送を検討し、その取込み輸送に飽和性が観察された。M17055 の Caco-2 細胞への取込み輸送の特性を評価する為に様々な化合物を用いて阻害効果を検討したところ、これまでに OATP2B1 の基質となることが報告されている E3S、BSP、pravastatine で顕著な阻害効果が観察された。これらの結果から、M17055 の Caco-2 細胞への取込み輸送にはトランスポーターが関与することが示唆され、その分子実体として OATP2B1 が関与すると考えられた。また、OATP2B1 による M17055 の取込み輸送における  $K_m$  値は、Caco-2 細胞における M17055 の取り込み輸送の高親和性の輸送担体の  $K_m$  値と同程度の値を示した。本研究において新規ループ利尿薬である M17055 の Caco-2 細胞への取り込み輸送は HEK293/OATP2B1 細胞による輸送特性と極めて近いことが明らかとなった。これは、Caco-2 細胞に発現する OATP2B1 が M17055 の取り込み輸送に大きく寄与していることを示唆する。これはループ利尿薬の消化管吸収においてトランスポーターが取り込み輸送に関与していることを示したという点で新しい知見である。

ラットの腎皮質切片および刷子縁膜小胞を用いた取り込み試験により、少なくとも M17055 は腎近位尿細管の基底膜において有機アニオントランスポーターを介して取り込まれることが示され、さらにその実体として、rOAT1 が一部関与していることが示された。また刷子縁膜での輸送にも一部有機アニオンを認識するトランスポーターが関与すると考えられた。

本研究で M17055 の体内動態において小腸では OATP2B1 が吸収に関与し、腎臓では OAT1 が一部関与していることが示された。このように一つの薬物であっても、投与後、各臓器において発現する様々なトランスポーターの認識を受け体内動態は制御されている。体内動態特性のよい薬物を開発する為には、それぞれの臓器に発現するトランスポーターにバランスよく認識されることで吸収、排泄が速やか、すなわち入りやすく、溜まりにくい薬物が開発できると期待される。また、臓器への取り込み活性の高いトランスポーターの認識性に合わせることで、薬効発現部位に特異的に薬物を集中させることも可能であろう。今後、薬物の体内動態を最適化する為には、各臓器において寄与の大きいトランスポーターの分子種をさらに明らかにしていくことが必要である。

上述の様に私は Caco-2 細胞において主に OATP2B1 を介して吸収されていることを示し、ヒト消化管においては少なくとも一部は OATP2B1 を介してこれらの薬物は吸収されていると考えられるが、その寄与率は明らかではなく、他のトランスポーターなどにより吸収されている可能性もある。したがって、より生理的な条件の小腸の薬物吸収においても、OATP2B1 の機能が重要であるかを調べるため、本研究においてはマウス小腸における OATP の薬物吸収への関与を明らかにすることを試みた。

OATP2B1 の代表的基質である E3S はマウス小腸においても顕著な飽和性を示し、また有機アニオン性の化合物によって強く阻害を受けたことからトランスポーターによって取り込まれることを示唆した。しかし、マウスにおいて Oatp2b1 は E3S に対してほとんど輸送活性を示さず、小腸取り込みに対する寄与は少ないと考えられた。一方、OATP1A subfamily に分類される Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1a5 の基質であり、内因性ホルモンである DHEAS や甲状腺ホルモンの triiodothyronine により阻害がかかることから、マウス小腸での E3S 取り込みに関与する分子の実体として Oatp1a subfamily が関与する可能性が高いと考えられた。このようにトランスポーターに関する知見を前臨床試験に生かすためには、トランスポーターの輸送活性の種差に関する検討をさらに行い、これらトランスポーターがどのように基質分子を認識し、輸送するのかをさらに研究する必要がある。種差を分子レベルで明らかにすることにより、新規薬剤の開発にはどの動物種がヒトに近いと考えられるかの指標となるであろう。

医薬品の大部分は主に経口投与により患者に投与され、消化管から吸収された後、循環血中に到達し、標的臓器、組織において薬効を発揮する。このため、経口投与後のバイオアベイラビリティ(BA)は薬効の発現に重要である。しかしながら実際には、ヒトにおけるBAを予測することは容易ではない。

創薬の非臨床試験において、サルはヒトに遺伝的に最も近い哺乳類として用いられる。サルのBAがヒトよりも低い傾向があることが最近報告され、私はサルのBAが低い原因が小腸の初回通過効果ではないかと考え、消化管における薬物の透過機構とその種差に注目した。近年では、P-gp および CYP3A が小腸上皮細胞において機能的に共役しており、CYP3A で代謝された薬物を P-gp で排出するといった効率の良い解毒機構として働いていると提唱されている。薬物トランスポーターおよび代謝酵素として最も重要であると考えられる分子として、それぞれ P-gp および CYP3A を想定し、モデル薬物を用いた体内動態試験を *in vivo* および *in vitro* で行うことにより、これらの分子の消化管吸収への関与とその種差を明らかにすることを研究の目的とした。

Midazolam および etoposide をそれぞれ CYP3A と P-gp のモデル薬物として用いることで消化管吸収過程における代謝と膜透過の種差を検討することにした。経口投与による試験から midazolam および etoposide はヒトに比べて顕著に消化管吸収性が低いと考えられた。

このような経口バイオアベイラビリティの種差の原因を明らかにするため、サル小腸を用いて薬物透過試験および代謝試験を行った。Apical側から取り込まれた midazolam の粘膜抽出率がラットでは小さかったのに対し、サルでは1に近く、大部分が小腸上皮細胞内で代謝されることが示唆された。basal側から取り込まれる場合には代謝がやや少ないことから、apical側から取り込まれた midazolam がよりも速やかに代謝される割合( $f_{met}$ )を考慮に入れた two - steps metabolism model を考案し速度論的解析を行った。

Midazolam のサルにおける消化管吸収のモデル解析によって、代謝活性に非線形性が示された。apical側からの取り込み後速やかに代謝されるのは、サルでは顕著であるがラットではあまり起こらないと考えられ、この $f_{met}$ が小腸における主な代謝機能の種差と考えられた。本研究の範囲内においては $f_{met}$ はサルに特異的であり、ラットや *in vitro* が中心であったこれまでの非臨床試験からはこの $f_{met}$ が考慮に含まれてこなかったと考えられる。ただし、細胞内への取り込みや細胞内における代謝を担うタンパク質(トランスポーターや代謝酵素)は細胞内における局在が異なると考えるのが一般的であり、見かけ上 apical側からの取り込み過程において代謝されるという概念は単純化されており、生理的に薬物取り込みと代謝が直接関連しているかは未だ不明である。

Etoposide はヒトにおいては比較的良好なバイオアベイラビリティを示すが、

サルにおいてはヒトよりも顕著に低いバイオアベイラビリティを示した。さらに特に etoposide は全身クリアランスが小さく、肝アベイラビリティは1に近いと推察されることから、etoposide のバイオアベイラビリティは主に消化管における初回通過で決まると考えられた。したがって、etoposide はヒトでは比較的良好に吸収されるが、サルにおいては吸収されにくいと考えられる。

Etoposide の消化管吸収機構を調べるため、Ussing-type chamber を用いて AP-to-BL および BL-to-AP 方向での輸送試験を行った。速度論的解析の結果、etoposide のサル小腸における吸収は apical 側での取り込み速度が律速となっており、取り込み活性が低いために、吸収性が低いと結論づけられた。

これまでにサルの消化管吸収においては代謝による小腸初回通過が大きいことを示唆する報告は存在したが、本研究ではサルの小腸を用いて薬物吸収と代謝を同時に評価することにより、直接的に小腸初回通過の重要性を示した。

本研究では決して実験方法としては新しくはない Ussing-type chamber を用いて消化管吸収機構を評価したが、大動物であるサルにおいても小腸の薬物輸送と代謝を同時に評価でき、また、微小パラメータを解析することで薬物の小腸通過時の挙動を示せたことにより得られた知見は大きい。

CYP3A の代表的な基質である midazolam は apical 側から小腸上皮細胞内に取り込まれた際、一部が速やかに代謝されることが本研究により示された。CYP3A は幅広い基質認識特性があり、サル小腸においては多くの薬物が代謝を受け、小腸の初回通過時に消失してしまうことが示唆される。また、etoposide など P-gp の基質になる薬物のサルにおける消化管吸収性はヒトよりも低いと推察されたが、サル小腸における P-gp の機能はほとんど観察されず、消化管吸収性が低い原因は P-gp による吸収抑制ではなく、小腸組織への取り込みが行われなためであると考えられた。

以上のように、本研究によってサル小腸において薬物の吸収性が低下している原因の一部が示された。今後の創薬段階におけるサルを用いた消化管吸収の評価は、ヒト予測のためのモデルと考えるのではなく、むしろ極めてわずかであってもサルにおいて吸収される薬物はヒトにおいても吸収されうると考えるほうが妥当であろう。

## 学位論文審査結果の要旨

実験動物とヒトにおける薬物動態試験結果の著しい乖離が経口薬開発上の問題となっているが、その乖離がどのような原因で生じるのかは明らかではない。申請者は、薬物の体内動態制御に関与するトランスポーターの特定と、その種差に関する研究に取り組み、以下に示す新規な成果を得た。

新規利尿薬の腎排泄と小腸からの吸収に有機アニオントランスポーターが関与することを示した。特に、本利尿薬の小腸取込みに関与するトランスポーターOATP1A および 2B サブファミリーの輸送活性においてヒトとげっ歯類との間に種差があることを認めた。申請者はこの研究結果を踏まえ、サルとラットを用い、ヒトでの吸収率が既知の midazolam, etoposide, digoxin を対象として経口投与後の吸収率の測定、消化管摘出標本による *in vitro* 膜透過と代謝実験により、取込みと排出に関わるトランスポーターと代謝酵素活性に種差があることを認め、これらの体内動態制御因子の種差がこれらの経口薬のサルとヒトおよびげっ歯類との動態上の乖離の原因となっていることを初めて明らかにした。

本研究は、薬物の体内動態制御に関わるトランスポーターと代謝酵素の種差を考慮した医薬品開発の重要性を示したものであり、経口吸収性に優れた薬剤の開発に寄与する意義深いものと認め、博士（薬学）論文に値すると判定した。