

^{99m}Tc -MIBI, Tetrofosmin の肝臓における 取込み及び胆汁排泄機序の検討

加藤 俊貴

(指導教員：川井 恵一教授)

要旨：心筋血流シンチグラフィは、 ^{99m}Tc -2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI)や ^{99m}Tc -tetrofosmin (^{99m}Tc -TF)などの放射性薬剤を用いて、心筋の血流分布を観察する検査法である。しかし、 ^{99m}Tc -MIBI, TF は心筋以外にも肝臓及び胆嚢に生理的に集積し、これらのバックグラウンドにより生じるアーチファクトが、検査時にコントラストの低下を引き起こしている。この肝胆道系のアーチファクトを低減させることで、心筋血流シンチグラフィの診断能の向上が期待される。本研究では肝胆道系アーチファクトの低減法の開発を目指して、 ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝臓における取込み及び胆汁排泄機序の解明を行った。 ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝細胞取込みに関与する SLC トランスポーターの寄与をヒト型 SLC トランスポーター強制発現 HEK 細胞を用いて評価した結果、 ^{99m}Tc -MIBI ではどの SLC トランスポーターの関与も認められなかったが、 ^{99m}Tc -TF では OCT1 の関与が認められた。また、胆汁排泄に関与する ABC トランスポーターの寄与をヒト型 ABC トランスポーター単一発現ベシクルを用いて評価した結果、 ^{99m}Tc -MIBI では P-gp と BSEP の関与が、 ^{99m}Tc -TF では P-gp と MRP2 の関与が認められた。本研究で ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝細胞取込み及び胆汁排泄機序を新たに解明したことで、両薬剤の肝臓への取込み阻害法や胆道系への排泄促進法を確立する基盤を構築できた。

I. はじめに

心筋血流シンチグラフィは、 ^{99m}Tc -2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI) や ^{99m}Tc -tetrofosmin (^{99m}Tc -TF) などの放射性薬剤を用いて、心筋の血流分布を非観血的に観察できる数少ない検査法である。 ^{99m}Tc -MIBI, TF は心筋へ集積し、その分布によって局所心筋の血流を表すことができるため、冠動脈病変による心筋血流の低下部位は、トレーサー集積の低下部位として表される¹⁾。

しかし、 ^{99m}Tc -MIBI, TF は心筋以外にも肝臓及び胆嚢への高い集積を示し、これらのバックグラウンド増強により生じるアーチファクトが、検査時にコントラストの低下を引き起こしている (Fig. 1)ことから、肝胆道系への集積を低減させることで、心筋血流シンチグラフィの診断能の向上が期待される。

現在、 ^{99m}Tc -MIBI, TF はその集積機序として、脂溶性の膜透過によって肝臓に取込まれ、adenosine triphosphate (ATP) 依存的に薬剤を輸送する ATP binding cassette (ABC) トランスポーターの1つである P-glycoprotein (P-gp) によって胆汁排泄されていると考えられている²⁻⁴⁾。しかし、肝臓には多くの取込み型及び排泄型薬物トランスポーターが発現しており、 ^{99m}Tc -MIBI, TF もこれらのトランスポーターによっても輸送されている可能性がある。

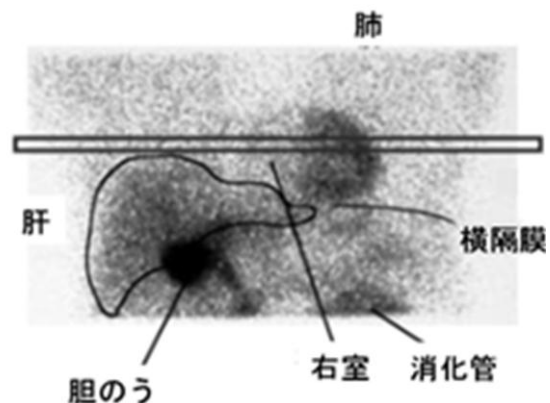


Fig. 1 ^{99m}Tc -MIBI の集積

肝胆道系アーチファクト低減法の開発の基盤とするため、本研究では、 ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝臓における取込み及び胆汁排泄機序の解明を行った。

一般的な薬物トランスポーターによる薬剤の輸送では、薬剤は血流に乗って肝臓まで運ばれ、薬剤の細胞への取込みに関する solute carrier (SLC) トランスポーターによって肝臓に取込まれる。その後、薬剤の細胞外排泄に関与する ABC トランスポーターによって主に胆管へと胆汁排泄される (Fig. 2)。

本研究では、SLC トランスポーターのうち肝臓に発現していると報告されている organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1), OATP1B3, OATP2B1, organic anion transporter 2 (OAT2), organic cation transporter 1 (OCT1), 及び Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)^{5,6)} の 6 つに加え、肝臓での発現は報告されていないが、 ^{99m}Tc -MIBI, TF の輸送に関与が予想される OCT2 の合計 7 つの SLC トランスポーターの ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝細胞取込みに対する寄与をヒト型 SLC トランスポーター強制発現 human embryonic kidney (HEK) 細胞を用いて評価した。

また、一般的な薬剤の胆汁排泄に関与する ABC トランスポーターとして既に報告されている P-gp, multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), bile salt export pump (BSEP), breast cancer resistance protein (BCRP)^{5,6)} の ^{99m}Tc -MIBI, TF の胆汁排泄への寄与をヒト型 ABC トランスポーター単一発現ベシクルを用いて評価した。

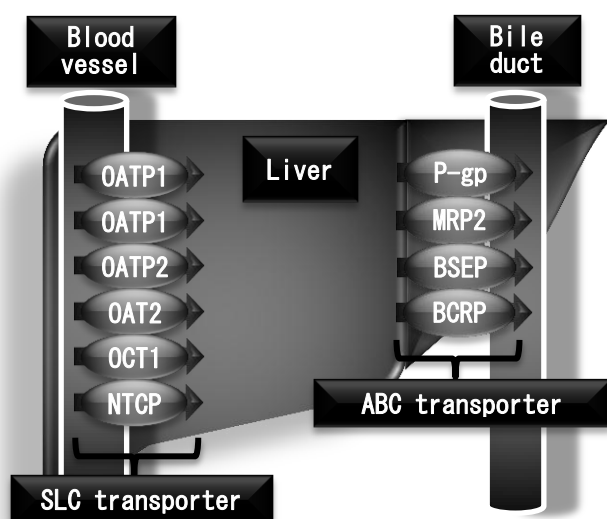


Fig. 2 肝臓への薬剤の取込みと排泄に関与する薬物トランスポーター

II. ヒト型 SLC トランスポーター強制発現 HEK 細胞を用いた ^{99m}Tc -MIBI, TF の肝臓における取込み機序の検討

A) 実験方法と材料

^{99m}Tc -MIBI は富士フィルム RI ファーマよりカーディオライト第一を、 ^{99m}Tc -TF は日本メジフィジックスよりマイオビューを購入して使用した。

SLC トランスポーターの阻害剤には、OATP 阻害剤 bromosulphthalein (BSP), OAT 阻害剤 *p*-aminohippuric acid (PAH), OCT 阻害剤 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP), NTCP 阻害剤 taurocholate hydrate (TC) を Sigma より購入して使用した。

ヒト型 OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT2, OCT1, OCT2 をそれぞれ遺伝子操作によって、

強制的に高発現させた HEK 細胞と、どの SLC トランスポーターも強制発現させていない Mock 細胞を用いて、各 SLC トランスポーターの取込みへの関与を評価した。また、今回の実験では、各 SLC トランスポーターの阻害剤を ^{99m}Tc -MIBI または ^{99m}Tc -TF と同時に投与し、阻害効果の有無による評価によってより特異的に各 SLC トランスポーターの寄与を判定した。

実験 2 日前に 5 % CO_2 , 37°C で、Mock 細胞を加えた 8 つの HEK 細胞それぞれを 4×10^5 cells/well で 12 ウェルチャンバーに、10 % fatal bovine serum (FBS), 抗生物質 250 μL を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培養液として 0.8 mL 播いた。

実験当日に培地を除去、測定用培地 (modified hanks' balanced salt solution, pH7.4) を両側に 30 秒間隔で 700 μL 加え、5 分間プレインキュベートした。その後、阻害剤無負荷のコントロールとして ^{99m}Tc -MIBI (37 kBq, 100 μL), TF (150 kBq, 100 μL) のみの単独投与群、阻害剤の効果の確認のための同量の ^{99m}Tc -MIBI, TF と各 SLC トランスポーターの阻害剤を同時に加えた阻害剤同時投与群をそれぞれインキュベートした。30 秒間隔で ^{99m}Tc 製剤を含んだ測定用培地を取り除き、冷やした 800 μL の測定用培地で 2 回ずつ洗浄した。1M NaOH を 1000 μL で細胞を溶解し、そのうちの 800 μL を採取し、オートウェルガンマカウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で測定した。測定結果は 1 mg の蛋白量あたりに含まれた放射性薬剤の濃度で表した。その後、阻害剤無負荷時の集積量をコントロールとして、各阻害剤を負荷した場合の集積量と比較した。

B) 結果と考察

コントロールと、各阻害剤を負荷した場合の ^{99m}Tc -MIBI, TF の HEK 細胞と Mock 細胞への集積に対する阻害剤負荷の影響をそれぞれ Fig. 3 と Fig. 4 に示す。

HEK 細胞で高発現している SLC トランスポーターの阻害剤を投与することで、阻害剤を負荷していないコントロールよりも、阻害剤負荷時の集積が減少した場合、これはその強制発現させた SLC トランスポーターが取込みに関与していると考えられる。

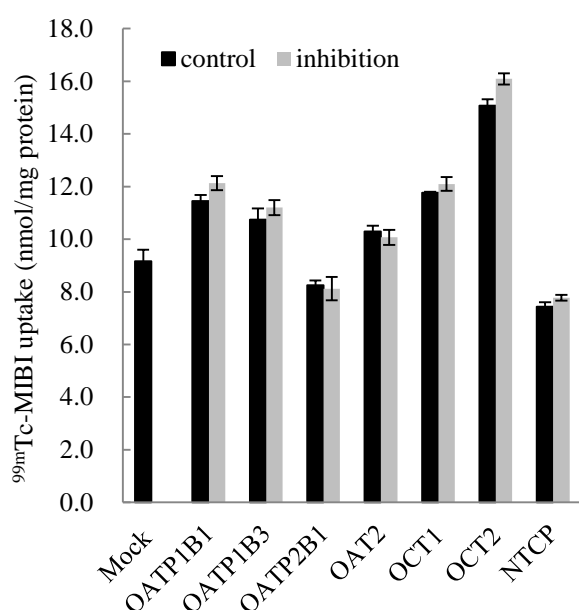


Fig. 3 ^{99m}Tc -MIBI の細胞への集積と阻害剤の影響

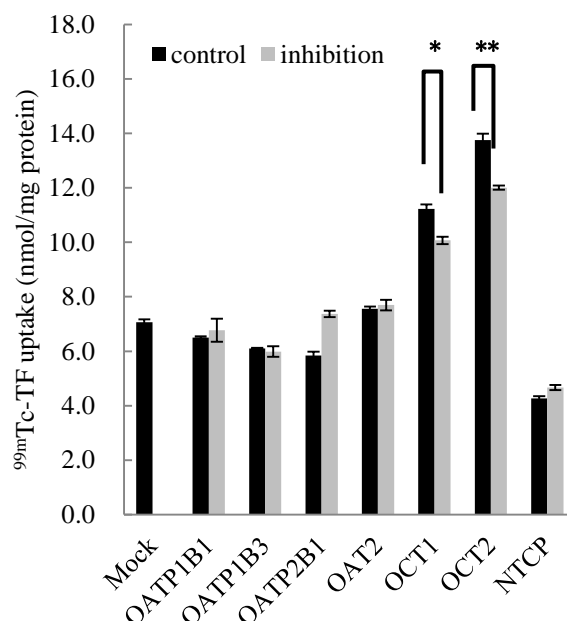


Fig. 4 ^{99m}Tc -TF の細胞への集積と阻害剤の影響

** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$ compared with control

阻害剤負荷時とコントロールを比較した結果、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ においてはどの SLC トランスポーターにも有意な阻害効果は見られなかった。そのため、 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ の肝細胞取込みには今回の実験で調べた SLC トランスポーターの関与は認められないと考えられた。

それに対して、 $^{99m}\text{Tc-TF}$ では OCT1 及び OCT2 において、阻害剤負荷時の集積量がコントロールに比べて有意に低下した。したがって、 $^{99m}\text{Tc-TF}$ の肝細胞への取込みには受動的な脂溶性の膜透過だけではなく、SLC トランスポーターの関与があることが示唆された。

$^{99m}\text{Tc-MIBI}$ を用いた場合の OATP1B1 や 1B3 強制発現細胞、 $^{99m}\text{Tc-TF}$ の 2B1 強制発現細胞などへの集積で阻害剤負荷時の集積量がコントロールに比べて増加する現象は他の放射性薬剤を用いた先行研究においても発生しており、その原因として、今回用いた阻害剤には期待した輸送系阻害効果以外の作用があったためだと考えられた。

III. ヒト型 ABC トランスポーター単一発現ベシクルを用いた $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, TF の胆汁排泄機序の検討

A) 実験方法と材料

ヒト型 ABC トランスポーター単一発現ベシクル (P-gp, MRP2, BSEP 及び BCRP) 及びベシクル専用試薬キットは GenoMembrane 社から購入して使用した。また、ベシクルに投与する薬液の調整方法はキット内に同封されていたマニュアルを、実験手順はベシクルの容器内に同封されていたマニュアルを参考にして実験を行い、ベシクルを捕集したフィルタの放射能をオートウェルガンマカウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で測定した。解析結果は、1 mg の蛋白量あたりに含まれた放射性薬剤の濃度で表した。

B) 結果と考察

ベシクルは正常な細胞の細胞膜が反転したような構造であり、単一の排泄型薬物トランスポーターを発現させてある。そのため、発現している単一の排泄型薬物トランスポーターの排泄への関与をベシクルの集積量として評価することができる。また、ABC トランスポーターは ATP をエネルギーとして使用するため、薬剤は ATP 依存的に輸送される。よって、ATP 存在下での集積量が、エネルギーとして利用されない AMP 存在下での集積量に比べて有意に増加した場合、そのベシクルに単一発現している ABC トランスポーターが薬剤の排泄に関与していることが確認できる。ベシクルへの $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, TF の集積と ATP 依存性をそれぞれ Fig. 5 と Fig. 6 に示す。

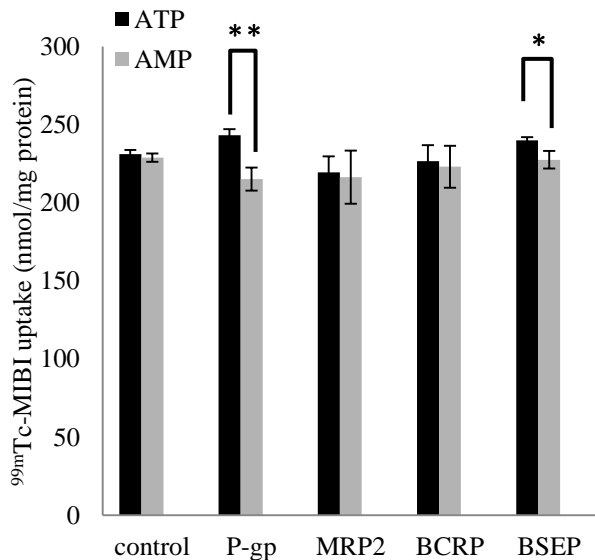


Fig.5 ^{99m}Tc-MIBI のベシクル集積と ATP 依存性

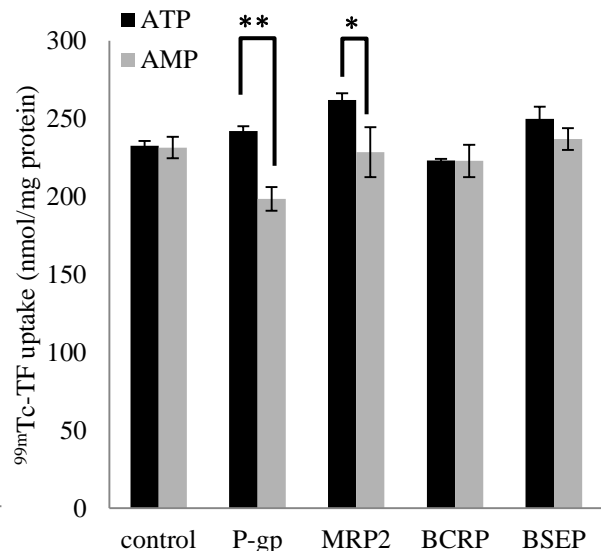


Fig.6 ^{99m}Tc-TF のベシクル集積と ATP 依存性

** :p<0.01 * :p<0.05 compared with AMP

** :p<0.01 * :p<0.05 compared with AMP

コントロールベシクルへの集積量は両製剤において有意差はなかったため、ATPの有無によるベシクルへの非特異的集積や吸着はないものと判断した。

^{99m}Tc-MIBI では P-gp 及び BSEP 発現ベシクルにおいて、^{99m}Tc-TF では P-gp 及び MRP2 発現ベシクルにおいて、AMP 負荷時に比べて ATP 負荷時に有意に集積が増加したため、^{99m}Tc-MIBI では従来の報告にある P-gp への親和性に加え、BSEP への親和性が、^{99m}Tc-TF では P-gp, MRP2 への親和性が認められた。

IV. 結語

本研究によって、肝臓における ^{99m}Tc-TF の細胞取込みへの SLC トランスポーターの OCT1 の関与が認められた。また、^{99m}Tc-MIBI, TF の胆汁排泄においては ^{99m}Tc-MIBI では P-gp 及び BSEP の関与が、^{99m}Tc-TF では P-gp 及び MRP2 の関与が認められた。

^{99m}Tc-MIBI, TF の肝臓への取込み阻害法や胆道系への排泄促進法を確立するための基盤として必要である両製剤の薬物トランスポーターによる肝細胞取込み及び胆汁排泄機序を本研究で新たに解明することができた。

V. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、金沢大学医薬保健研究域附属健康増進科学センターの小林正和助教、金沢大学附属病院の飛坂実さん、及びご協力いただいた本研究室の方々々に心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) 日本核医学技術学会 編集: 核医学技術総論, 山代印刷株式会社, 2010: pp.235-254.
- 2) Hendrikse NH, Kuipers F, Meijer C, Havinga R, Bijleveld CM, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG. In vivo imaging of hepatobiliary transport function mediated by multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54: 131-138.
- 3) Gomes CM, Abrunhosa AJ, Pauwels EK, Botelho MF. P-glycoprotein versus MRP1 on transport kinetics of cationic lipophilic substrates: a comparative study using [^{99m}Tc]sestamibi and [^{99m}Tc]tetrofosmin. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24: 215-227.
- 4) Vergote J, Moretti JL, de Vries EG, Garnier-Suillerot A. Comparison of the kinetics of active efflux of ^{99m}Tc-MIBI in cells with P-glycoprotein-mediated and multidrug- resistance protein-associated multidrug-resistance phenotypes. *Eur J Biochem* 1998; 252: 140–146.
- 5) Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 2013; 34: 45–78.
- 6) Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 689–723.