

1503 医薬品の胆汁排泄を担う排泄型薬物トランスポーター評価法の確立

川村 聡栄

(指導教員：川井 恵一教授)

要旨：医薬品の代謝に重要な肝臓での薬物代謝や胆汁排泄は個々人で異なる。従って医薬品をヒトに投与する前に、胆管側膜に発現している排泄型薬物トランスポーター活性を把握した上で、適切な医薬品の処方を行う個別化医療の確立が重要である。当研究室では、肝胆道系診断薬である $^{99m}\text{Tc-PMT}$ ($^{99m}\text{Tc-N-pyridoxyl-5-methyltryptophan}$) が、医薬品の胆汁排泄を担う排泄型薬物トランスポーターの中でも特定のトランスポーター機能を反映するイメージング薬剤として利用し得ることを提唱してきた。本研究では、新たな排泄型薬物トランスポーター評価法の確立を目的とし、投与後早期に胆嚢へ排泄される副腎皮質イメージング薬剤 $^{131}\text{I-adosterol}$ ($^{131}\text{I-6-}\beta\text{-iodomethyl-19-norcholesterol}$) に着目した。ヒト排泄型薬物トランスポーター単一発現ベシクルを用いて親和性を評価した結果、肝臓に発現しているトランスポーターのうち BCRP (breast cancer resistance protein) において排泄型薬物トランスポーター関与の指標となる顕著な ATP 依存性が認められた。次に、肝臓内での $^{131}\text{I-adosterol}$ の代謝変化を評価したところ、肝臓中では脱ヨウ素化以外の代謝物が認められなかった。更に、BCRP 阻害剤 Ko143 を負荷したマウスにおける $^{131}\text{I-adosterol}$ の体内分布を検討した結果、阻害剤を負荷しない場合と比較して肝臓の集積が向上したものの、胆嚢への胆汁排泄が相対的に低下した。以上より、 $^{131}\text{I-adosterol}$ は肝細胞内で代謝されにくく、その胆汁排泄には BCRP が関与していたため、 $^{131}\text{I-adosterol}$ の経時的胆嚢集積量が BCRP の評価指標になり得ると考えられた。

I. はじめに

肝臓における医薬品の代謝や胆汁排泄は個々人で異なり、その主な要因として胆管側膜に発現している排泄型薬物トランスポーターの活性の個人差が挙げられる。医薬品の胆汁排泄には、adenosine triphosphate (ATP) 依存的に機能する排泄型薬物トランスポーターのうち、multidrug resistance protein 1 (MDR1), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), breast cancer resistance protein (BCRP) 及び bile salt export pump (BSEP) の発現が報告されている^{1,2)}ことから、これらのトランスポーターの機能が低下すると、医薬品が排泄されにくくなり副作用や重篤な肝疾患を引き起こす可能性が高くなる。そのため、医薬品をヒトに投与する前に、胆管側膜に発現している排泄型薬物トランスポーター活性を把握し、適切な薬剤の処方を行う個別化医療の確立が重要である。当研究室では、胆汁排泄を担う排泄型薬物トランスポーターのイメージング薬剤として、臨床で肝胆道系診断薬として使用される $^{99m}\text{Tc-PMT}$ ($^{99m}\text{Tc-N-pyridoxyl-5-methyltryptophan}$) の利用を提唱してきた³⁾。しかし $^{99m}\text{Tc-PMT}$ では、胆管側膜に発現しているトランスポーターの一部である MDR1, MRP2 の活性を評価できるが、BCRP, BSEP の活性は評価できない。本研究では、投与後早期に胆嚢へ排泄される副腎皮質イメージング薬剤 $^{131}\text{I-adosterol}$ ($^{131}\text{I-6-}\beta\text{-iodomethyl-19-norcholesterol}$) を利用して、新たな排泄型薬物トランスポーター評価法の確立を目的とした。

II. ¹³¹I-adosterol の排泄型薬物トランスポーターに対する親和性の検討

A) 実験方法と材料

¹³¹I-adosterol は富士フィルム RI ファーマから購入して使用した。ヒト排泄型薬物トランスポーターMDR1, MRP1-4, BCRP, BSEP の単一発現ベシクルと、その比較対象 control ベシクル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。阻害剤には、MRP 系阻害剤 MK-571 sodium salt (Cayman) と BCRP 阻害剤 Ko143 (Sigma) を購入して使用した。実験前日に、使用する膜フィルタを Mops-Tris 緩衝液に浸しておくとともに、各ベシクルを 0.05 mg/10 μL となるように 1.5 ml 用チューブに分注した。ベシクルに Mops-Tris 緩衝液を 50 mmol/9 μL 注入し、37 度で 5 分間プレインキュベーションを行った。各ベシクルが入ったチューブに、Table 1 のように調整した溶液を 31 μL 加えてタッピングした後、37 度で 5 分間インキュベーションを行った。その 5 分後に、Mops-Tris 緩衝液を 400 mmol/1 mL 加え反応を停止した。BSEP のベシクルでは、上記で述べた Mops-Tris 緩衝液の代わりに HEPES-Tris 緩衝液を用いた。その後、あらかじめ用意していた膜フィルタに濾過し、各緩衝液で 2 回洗浄した後、膜フィルタを試験管に入れ、オートウェルガンマカウンタ (AccuFLEXγ7000, Aloka) を使って膜フィルタに貯留したベシクル内の放射能を測定した。解析結果はタンパク 1 mg あたりに換算した集積薬剤のモル数で表した。

Table 1 各ベシクル溶液の調整法

MDR1, BCRP, control		MRP1-4		BSEP	
ベシクル溶液	10 μL	ベシクル溶液	10 μL	ベシクル溶液	10 μL
Mops-Tris 緩衝液 (50 mmol/L) or Ko143 (50 μmol/L)	0.5 μL	Mops-Tris 緩衝液 (50 mmol/L) or MK571 (50 μmol/L)	0.5 μL	HEPES-Tris 緩衝液 (50 mmol/L)	1 μL
ATP (または AMP) 溶液	20 μL	ATP (または AMP) 溶液	20 μL	ATP (または AMP) 溶液	20 μL
¹³¹ I-adosterol (37 kBq)	10 μL	¹³¹ I-adosterol (37 kBq)	10 μL	¹³¹ I-adosterol (37 kBq)	10 μL
Mops-Tris 緩衝液 (50 mmol/L)	0.5 μL	Glutathione	0.5 μL		

B) 結果と考察

本研究で利用したヒト排泄型薬物トランスポーター単一発現ベシクルでは, ^{131}I -adosterol と排泄型薬物トランスポーターとの親和性を, ATP 溶液と adenosine monophosphate (AMP) 溶液中のベシクル内への集積差によって評価することができる.

Fig.1 には各ベシクルに対する ^{131}I -adosterol の集積を示す. ^{131}I -adosterol では, MRP1 と BCRP において ATP 存在下の集積が AMP 存在下の集積と比較して有意に増加した. また, Fig. 2 において各排泄型薬物トランスポーターの阻害剤を加えた結果, MRP1, BCRP ともに ATP 存在下と AMP 存在下の集積差が見られなくなったことから, ^{131}I -adosterol の排泄型薬物トランスポーターMRP1 と BCRP への親和性が確認された. しかし, 胆管側膜には MRP1 は存在していないため, ^{131}I -adosterol の胆汁排泄には BCRP のみが発与していると考えられた.

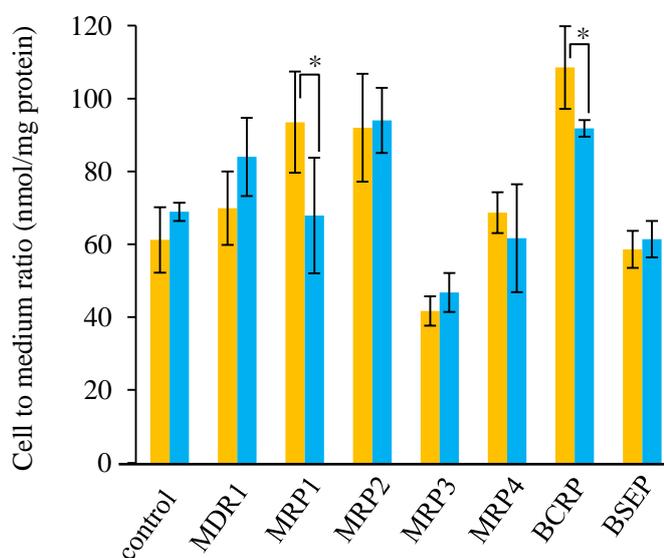


Fig.1 ^{131}I -adosterol の集積

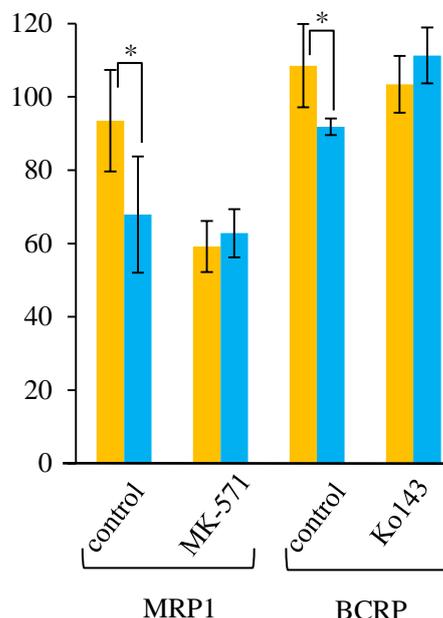


Fig.2 阻害剤負荷時の ^{131}I -adosterol の集積

■ ATP ■ AMP * $p < 0.05$ compared with AMP

III. ^{131}I -adosterol のマウス体内分布

A) 実験方法と材料

マウス (ddY, 雄, 6 週齢) に ^{131}I -adosterol を 1 匹あたり 18.5 kBq/100 μL ずつ投与した. 排泄型薬物トランスポーター阻害剤負荷時の体内分布実験では, ^{131}I -adosterol に 1.0 mM の BCRP 阻害剤 Ko143 を溶解して同量投与した. 一定時間 (5, 10, 20, 30, 60, 120 分, 阻害剤負荷時では 5, 10, 30 分) 経過後, イソフルラン麻酔下にて心臓から 200 μL 採血して屠殺し, 脳, 肺, 心, 脾, 脾, 肝, 胆嚢, 胃, 腎, 小腸, 大腸, 皮膚を摘出して, 湿重量を測定した. オートウェルガンマカウンタで血液及び各臓器の放射能を計測し, 組織重量集積率を算出した.

B) 結果と考察

正常マウスの摘出組織のうち高集積率を示した血液と、排泄組織である肝臓、胆嚢の組織重量集積率を Fig.3, Table 2 に示す。血液内の放射能が他の臓器に比べて顕著に高い数値を示したことから、投与後早期には ^{131}I -adosterol が各臓器へ移行しにくいことが分かった。また、BCRP 阻害剤負荷時の組織重量集積率を Fig.4, Table.2 に示す。BCRP 阻害剤負荷時において血液、肝臓の集積が高くなっており、投与後 10 分における値は、血液では無負荷時の 1.44 倍、肝臓では 1.29 倍であった。一方、胆嚢では投与後 10 分における集積率は無負荷時の 1.08 倍とあまり変化が見られなかった。胆嚢への胆汁排泄が相対的に低下したことから、阻害剤が BCRP による胆汁排泄を阻害していると考えられた。従って、Fig.3 の投与後 120 分での胆嚢への集積増加は、肝臓に移行した ^{131}I -adosterol が胆汁とともに胆嚢へ排泄されたものであると考えられ、マウスの体内分布においても ^{131}I -adosterol の胆汁排泄には BCRP が関与していることが確認された。

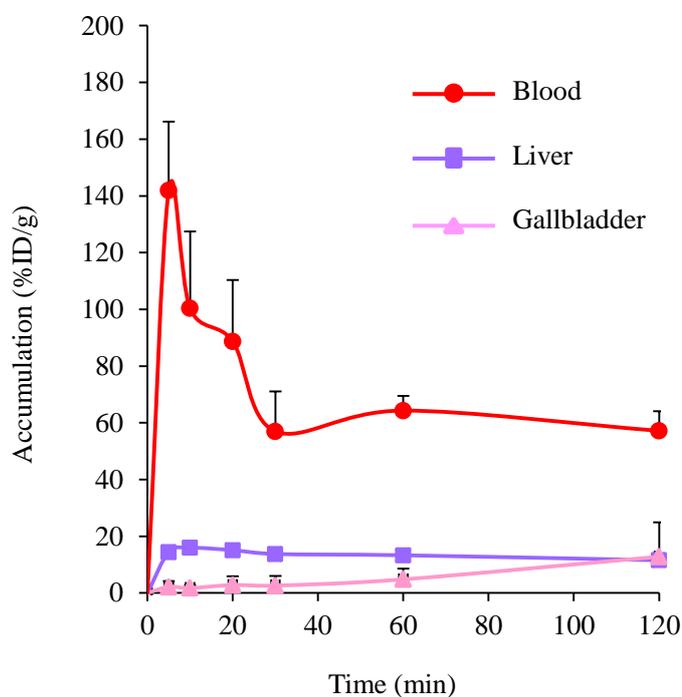


Fig.3 正常マウス体内分布

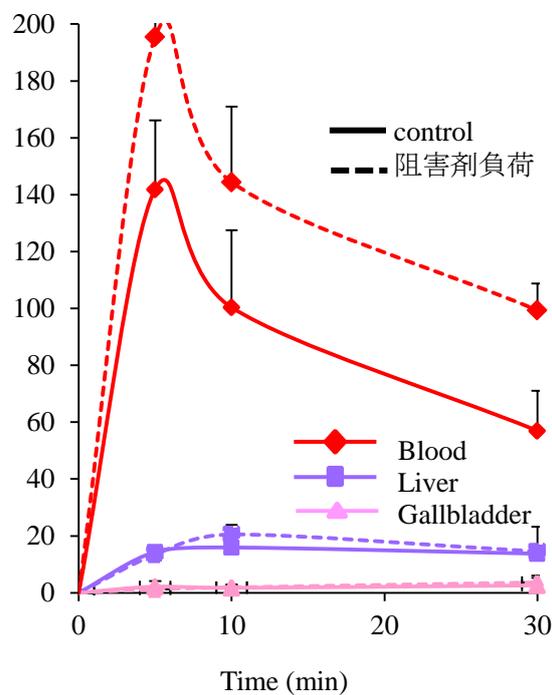


Fig.4 阻害剤負荷時との比較

Table 2 重量集積率 (%ID/g)

投与後時間 (min)	正常マウス(control)						阻害剤負荷時		
	5	10	20	30	60	120	5	10	30
Blood	141.89	100.36	88.65	56.98	64.31	57.17	195.51	144.42	99.36
	24.24	27.15	21.71	14.09	5.12	6.97	24.24	27.15	14.09
Liver	14.39	15.93	15.09	13.75	13.30	11.53	13.44	20.52	14.53
	0.89	1.77	1.87	1.63	1.35	1.80	0.89	1.77	1.63
Gallbladder (GB)	2.17	1.74	2.80	2.61	4.80	12.79	1.25	1.89	3.65
	2.00	1.03	3.12	3.40	3.76	12.16	2.00	1.03	3.40
GB/ Liver ratio ($\times 10^{-1}$)	1.51	1.09	1.86	1.90	3.61	11.09	0.93	0.92	2.51

上段：mean 下段：SD

IV. ^{131}I -adosterol のマウス肝臓中代謝物分析

A) 実験方法と材料

マウスの肝臓に集積した ^{131}I -adosterol の代謝物分析を検討するために、肝臓に存在する放射性物質をシリカゲル薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography : TLC) を用いて分析した。マウス肝ホモジネートにリン酸緩衝液 (pH 7.4), ^{131}I -adosterol (370 kBq), NADPH 生成系, 精製水を加え, 37 度で 60 分間インキュベーションを行った。60 分後反応を停止させ, 遠心分離後の上清 5 μL を 2 種類の展開溶媒, ①ヘキサン:エーテル:酢酸エチル=1:1:4, ②アセトニトリル=100 でシリカゲル薄層板 (Merck) に展開し, 分析した。 ^{131}I -adosterol の未変化体の Rf 値は, 展開溶媒①で 0.00, 展開溶媒②で 1.00, ^{125}I の Rf 値は展開溶媒①で 0.58-0.67, 展開溶媒②で 0.75-0.83 であることを確認したため, その Rf 値以外に検出された放射性物質を ^{131}I -adosterol 由来の放射性代謝物と推定して分析を行った。

B) 結果と考察

Fig.5 (a), (b) より, 両展開溶媒において, TLC 上の放射性物質は ^{131}I -adosterol 原体及び ^{125}I と同じ Rf 値となったため, 脱ヨウ素化以外の代謝物はほとんど存在しないと考えられた。当研究室のこれまでの検討では, イオン型の ^{125}I は排泄型薬物トランスポーターとの親和性がほとんどないことを確認しているため, マウス体内分布実験における胆嚢への集積は, ^{131}I -adosterol 未変化体の胆汁排泄, 即ち肝臓の胆管側膜に発現している BCRP 機能を反映していると思われた。

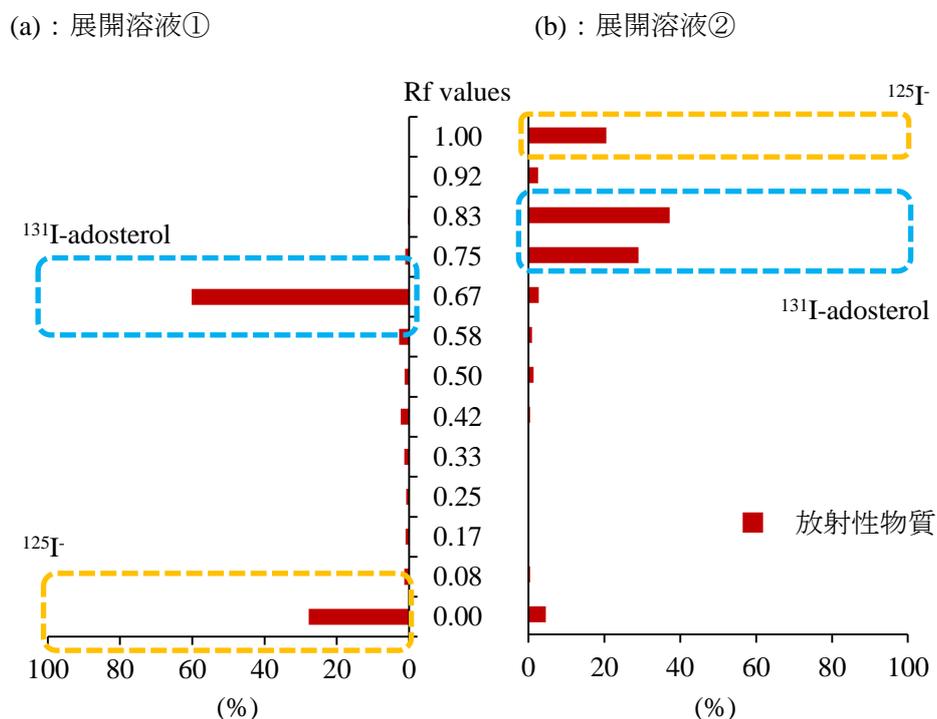


Fig.5 マウス肝ホモジネート TLC 分析

V. 結語

本研究では、¹³¹I-adosterol を用いた新たな排泄型薬物トランスポーター評価法の確立を目指して検討した結果、以下の3点が確認された。

- (1) 胆管側膜に発現している排泄型薬物トランスポーターMDR1, MRP2, BCRP 及びBSEPのうち、¹³¹I-adosterol は BCRP のみに親和性を示した。
- (2) BCRP を阻害することにより肝臓の集積が向上し、胆嚢への胆汁排泄が相対的に低下したことから、¹³¹I-adosterol の胆汁排泄に BCRP が関与していた。
- (3) 血液から肝臓内に移行した ¹³¹I-adosterol は脱ヨウ素化以外の代謝はされずに胆嚢へ排泄されていた。

以上より、¹³¹I-adosterol の胆嚢集積を継時的に観察することで、肝臓の胆管側膜に発現している排泄型薬物トランスポーターBCRP 機能の評価指標になり得ると考えられた。

VI. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、健康増進科学センター小林正和助教、ご協力いただきました外間つづみさんをはじめとする当研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) 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.
- 2) Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y: Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 689-723.
- 3) Kobayashi M, Nakanishi T, Nishi K, Higaki Y, Okudaira H, Ono M, Tsujiuchi T, Mizutani A, Nishii R, Tamai I, Kawai K: Transport mechanisms of hepatic uptake and bile excretion in clinical hepatobiliary scintigraphy with ^{99m}Tc-*N*-pyridoxyl-5-methyltryptophan. *Nucl Med Biol* 2014; 41: 338-342.