消化管トランスポーターを意識した医薬品開発 (2)

— Efflux transporter —

特集 薬物の生体膜輸送特性と DDS

荻原琢男^{*1)}, 奥平典子^{*2)}

Contribution of intestinal transporters to drug absorption and the implications for drug discovery and development (2) : efflux transporters

Drug efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP), are expressed not only in resistant tumor cells, but also in many normal tissues, including the epithelial apical membrane of the intestine. Thus, efflux transporters may play an important role in the barrier function of the intestine against xenobiotic drugs. On the other hand, several researchers have suggested that the influence of P-gp on intestinal absorption of drugs is relatively limited, since the absorption rates of various P-gp substrates after oral administration are quite high in humans. The controversy remains to be resolved.

Here, we review the effects of intestinal efflux transporters on drug absorption, and discuss the evaluation and prevention of such effects.

消化管上皮細胞の mucosal membrane には、生体が“異物・毒物”と認識する化合物から自身を守るバリアー機能の一つとして efflux transporter が備わっている。最近、P-糖蛋白 (P-gp) や breast cancer resistance protein (BCRP) などの efflux transporter が、薬物の消化管吸収に与える影響を無視できない事例が報告されるようになった。企業における経口剤の探索・開発研究においても、医薬品の吸収率や薬物間相互作用への影響が懸念されるため、消化管 efflux transporter への取組みの重要性が増している。

本稿では、P-糖蛋白を中心に、efflux transporter が薬物の消化管吸収に与える影響や、その見積りかた、さらには DDS 的手法でこれらの影響を克服する試みについて、筆者らが遭遇した事例の紹介を交えながら、特に企業研究の視点から考察する。

Takuo Ogihara^{*1)}, Noriko Okudaira^{*2)}

key words : intestinal transporter, oral absorption, efflux, p-glycoprotein, BCRP

消化管上皮細胞には、生体が栄養を積極的に取り込むための influx transporter と、“異物・毒物”として認識する化合物から自身を守るバリアー機能の一つとして efflux transporter が備わっている (図 1)。前稿で述べたとおり、influx transporter が医薬品の経口吸収に有益であれば、逆に、P-糖蛋白 (P-gp, MDR, ABCB1) や breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) に代表される efflux transporter は、むしろ薬物の消化管吸収を妨げる要因と考えられる。

従来、efflux transporter の基質になっている多くの医薬品の吸収率はそれほど低くないことから、

消化管では efflux transporter は薬物の消化管吸収に影響しないという、企業関係者にとってはきわめて都合のよい報告もなされてきたが、最近、吸収挙動に与える影響を無視できない事例も知られるようになり、この結論はまだ定まっていない。

本稿では、“efflux transporter は化合物の消化管吸収に影響する”という立場から、まず、P-gp を中心にその具体例を筆者らが遭遇した事例を交えながら紹介する。また、どのような属性を持つ化合物が影響を受けるのか、あるいは、efflux transporter が薬物の吸収率に与える影響や相互作用をどのような見積りかた、という命題について、医薬品のスクリーニングという観点から考察する。

さらにはプロドラッグ化、あるいは添加剤の活用などの DDS 的手法で、これらの影響を克服する手法について考察する。なお、これらの研究はい

^{*1)} Pharmaceutical Research Center, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. 持田製薬株式会社創薬研究所

^{*2)} Drug Metabolism & Physicochemistry Research Laboratory, R&D Division, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd. 第一製薬株式会社研究開発本部創制代謝研究所

図1 消化管に発現しているトランスポーター

表1 P-糖蛋白の基質となる経口医薬品のヒトにおける吸収率

	F(%)		F(%)
Digitoxin	90	Amiodarone	46
Quinidine	80	Propranolol	26
Digoxin	70	Cyclosporin	23
Nifedipine	50	Verapamil	22

(各医薬品の添付文書から引用)

まだその端緒についたばかりであり、多分に筆者ら自身の見解を含むことを予めお許しいただきたい。また、BCRPやその影響の回避については、本号の特集“トランスポーター機能制御に基づく経口DDS”においても、Yamagataらが詳細な考察をしているので、併せて参照されたい¹⁾。

P-糖蛋白の消化管吸収に及ぼす影響

P-gpは肝、腎、脳、消化管などの体内のさまざまな臓器に発現し、肝や腎においては外来性薬物の体外への排出、脳においては脳内移行の制御、消化管においては体内への吸収抑制に関与している。P-gpが関与する臨床における相互作用では、併用によって薬物の脳内移行が高まることによる中枢毒性が特に注目されているが、消化管吸収における相互作用については重篤な報告例は比較的乏し

い。事実、P-gpの基質といわれている市販医薬品の生物学的利用率はそれほど低くなく、吸収率は比較的良好であることから(表1)、P-gpは消化管吸収にあまり影響を及ぼさないという主張も散見される²⁻⁶⁾。しかしながら、これは、临床上は消化管においてP-gpの影響が無視できると考えるよりは、P-gpの影響により臨床用量において吸収が低い薬物は、そもそも経口剤として成功していない結果だとも考えられる。

筆者ら⁷⁾は、ともにP-gpの基質であり、経口剤であるverapamilと静脈内投与製剤であるvinblastineを用いて、以下のような検討を行った。

Wild-typeのマウスとmdrをノックアウトしたマウス(mdr1a/1b(-/-))で、verapamilとvinblastineの経口投与後の血漿中濃度を比較してみると、verapamilでは両方のマウスで差が認められなかったが、vinblastineではノックアウトマウスの血漿中濃度の最大値(C_{max})およびAUCがwild-typeに比較して1.5倍に上昇した(図2,表2)。そこで、小腸内ループ法を用いて吸収部位を検討したところ、verapamilは小腸全般にわたって吸収されるのに対し、vinblastineはwild-typeのマウス十二指腸および回腸部分では吸収されるものの、その中間の空腸部分ではまったく吸収されなかった。この現象はノックアウトマウスでは観察されず、血漿中濃度のwild-typeとノックアウトの差は、少なくともその一部は小腸の吸収の違いに起因していることが示唆された(表3)。なお、理由は明らかではないが、このwild-typeに認められたvinblastineの吸収部位差は、P-gpの消化管部位による発現量の差とは関連しなかった。

Vinblastineで認められたマウスの小腸における極端な部位による吸収の差は、ラットにおいても同様に報告されており^{8,9)}、やはり空腸部分では吸収されない。そこで、vinblastineをラットに経口投与したときの血漿中濃度を測定したところ、投与後0.5時間に極大値を示したのち、いったん低下するが再び上昇し、投与後8時間に最大値を示すという、特徴的な二峰性を示した(図3)⁷⁾。

消化管においてP-gpの影響を大きく受ける薬物は、結果的に経口投与剤として成功する確率が低い

図2 $[^3\text{H}]$ ベラパミル(a)と $[^3\text{H}]$ ビンブラスチン(b)を wild-type マウス(●)と mdr ノックアウトマウス(□)に経口投与したときの血漿中放射能濃度の推移 (Ogihara T et al., accepted)⁷⁾
投与量はそれぞれ 1 mg/kg (Mean $\pm$ SD) (n=3)

表2 $[^3\text{H}]$ ベラパミルと $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンを wild-type マウスと mdr ノックアウトマウスに経口投与したときの血漿中放射能濃度のパラメーター (Ogihara T et al., accepted)⁷⁾

Substrate	Strain	$C_{\max}$	$T_{\max}$	$AUC_{0-24\text{hr}}$
		($\mu\text{g}/\text{mL}$ for verapamil) (ng/mL for vinblastine)	(hr)	($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$ for verapamil) (ng $\cdot$ hr/mL for vinblastine)
$[^3\text{H}]$ Verapamil	Wild-type	73.5 $\pm$ 9.6	8	1,479 $\pm$ 105
	mdr1a/1b ^{-/-}	67.8 $\pm$ 9.6	8	1,409 $\pm$ 92
$[^3\text{H}]$ Vinblastine	Wild-type	117 $\pm$ 27	8	2,423 $\pm$ 502
	mdr1a/1b ^{-/-}	170 $\pm$ 32*	8	3,714 $\pm$ 318*

投与量はそれぞれ 1 mg/kg (Mean $\pm$ SD) (n=3)

* : $p < 0.05$: Wild-type を対照群とする Student's t-test

表3 $[^3\text{H}]$ ベラパミルと $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの wild-type マウスと mdr ノックアウトマウスにおける消化管吸収の部位差 (Ogihara T et al., accepted)⁷⁾

Segment	Absorbed at 30 min (% of dose)			
	$[^3\text{H}]$ Verapamil		$[^3\text{H}]$ Vinblastine	
	Wild-type	mdr1a/1b ^{-/-}	Wild-type	mdr1a/1b ^{-/-}
Duodenum	50.9 $\pm$ 31.8	58.4 $\pm$ 10.4	44.6 $\pm$ 27.9	32.5 $\pm$ 14.4
Middle jejunum	47.1 $\pm$ 26.4	56.5 $\pm$ 6.42	5.51 $\pm$ 4.30	21.7 $\pm$ 11.6
Distal jejunum	38.0 $\pm$ 18.0	36.3 $\pm$ 22.6	0.01 $\pm$ 4.75	28.7 $\pm$ 15.1
Middle ileum	44.7 $\pm$ 33.6	53.8 $\pm$ 21.9	23.0 $\pm$ 4.03	40.3 $\pm$ 18.9
Terminal ileum	48.7 $\pm$ 14.2	40.9 $\pm$ 20.5	43.9 $\pm$ 10.2	42.5 $\pm$ 16.4

(Mean $\pm$ SD, n=3~4)

可能性を考えると, そのような薬物は探索創薬段階でいち早く“捨てる”決断をしなければならず, それに応える簡便なスクリーニング系が必要となる. そこで, いくつかの P-gp の基質を用いて Caco-2 細胞を用いて透過性の検討を行った. 図4は, 横軸に化合物の apical(A) 側から basal(B) 側への透過 ($P_{\text{app, influx}}$) を示し, 縦軸には efflux の influx に対す

る比 ($P_{\text{app, efflux}}/P_{\text{app, influx}}$) を示したもので, 縦軸の値が高いほど, 吸収方向よりも排出方向が強いことを示している. この検討によると, 経口剤になっている P-gp 基質は, おおむね吸収方向の透過は許容できる範囲にあり, $P_{\text{app, efflux}}/P_{\text{app, influx}}$ 比も 7 以下の値におさまっている. それに対し vinblastine は, 比較的吸収方向への透過が低く, 同時に $P_{\text{app, efflux}}/P_{\text{app, influx}}$ 比が 12 倍以上であり, きわめて排出方向が強いことが明らかになった.

創薬の探索段階においては, しばしば P-gp の基質に遭遇することがある. そのような薬物は, 物理的パラメーターや溶解性, 代謝安定性には問題がなくても, Caco-2 細胞を用いた検討では膜透過性は低く, 同時に $P_{\text{app, efflux}}/P_{\text{app, influx}}$ 比が 10 以上であると, ラットに経口投与したときにほとんど吸収されないか, 吸収されたとしても vinblastine と同様な独特な二峰性を示す¹⁰⁾. 一般化して議論することはまだ早計ではあるが, 消化管において P-gp の影響

図3 $[^3\text{H}]$ ピンブラスチン (1 mg/kg) をラットに経口投与したときの血漿中放射能濃度の推移 (Mean $\pm$ SD) (n=3) (Ogihara T et al., accepted)⁷⁾

図4 P-糖蛋白の基質となる医薬品の Caco-2 細胞における透過 (Ogihara T et al., accepted)⁷⁾ 2 例における平均値

を強く受ける薬物は、経口投与では臨床上的の使用が困難な可能性があると推測され、医薬品の探索段階では留意する必要があると思われる。

Efflux transporter の影響をどのように見積るか

前述のように、efflux transporter は基質によってはその消化管吸収に影響を及ぼすことから、その医薬品の生物学的利用率における寄与を見積ることは、特に薬物間相互作用においては重要である。医

表4 CYP3A4 による肝代謝が原因とされるヒトにおける薬物間相互作用の報告例 (各医薬品の添付文書から筆者がまとめたもの)

A \ B	シメチジン	リトナビル	エリスロマイシン	インジナビル	ミコナゾール	イトラコナゾール	ベラパミル	ジルチアゼム	カルバマゼピン	ニフェジピン	ミダゾラム	シクロスポリン	シンバスタチン	同等の基質認識性
シメチジン	\		○				○	○	○	○	○			
リトナビル		\	○		○	○	○	○	○	○	○	○		
エリスロマイシン	×	×	\						○	○	○	○	○	クラリスロマイシン
インジナビル				\		△				○	○	○		
ミコナゾール		×			\		○		○	○	○	○	○	ケトコナゾール
イトラコナゾール	×	×	△		\	○		△	○	○	○	○	○	フルコナゾール
ベラパミル	×	×			×	×	\		○		○	○		
ジルチアゼム	×	×						\	○	○		○		
カルバマゼピン	×	×	×	×	×	△	×	×	\					
ニフェジピン	×	×	×	×	×	×	×	×		\	○	○		DHP系降圧剤
ミダゾラム	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	\			トリアゾラム
シクロスポリン		×	×	×	×	×	×	×	×	×		\	○	タクロリムス
シンバスタチン		×	×		×	×						×	\	アトルバスタチン

○：A 欄の薬物が B 欄の薬物から影響を受ける。×：B 欄の薬物が A 欄の薬物から影響を受ける。△：相互に影響を受ける。たとえば、イトラコナゾールはリトナビルやエリスロマイシンから影響を受けて血中濃度が上昇するが、ベラパミルやニフェジピン、ミダゾラム、シクロスポリン、シンバスタチンに対しては、これらの薬物の血中濃度を上げる。またインジナビルやカルバマゼピンとは相互に影響し合う。さらに、イトラコナゾールとフルコナゾールとはほぼ同等の相互作用のスペクトルを示す。空欄の部分は添付文書に記述がない。□の薬物は、P-gp の基質あるいは阻害剤として報告されているもの¹¹⁾。

図5 相互作用検討マトリクス

CYP3A あるいは P-gp の基質であるか否かの確認は、それぞれの発現系を用いる。透過の方向性は、Caco-2 細胞で確認する。クリアランスの責任臓器を推定するためには、ラットを用いて、まず経口投与した薬物の門脈内血漿中濃度を測定したのち、今度は P-gp あるいは CYP3A の阻害剤を投与して同時に測定する。門脈内濃度を、単独投与と阻害剤を投与したときと比較することにより、消化管において efflux や代謝があるかどうかを明らかにする。同様に、薬物を門脈内に投与したときの静脈内濃度を測定したのち、阻害剤を併用して同様の試験を繰り返すことによって、肝臓におけるクリアランスの寄与を見積る。

表5 バクリタキセルの単独あるいはシクロスポリンを併用したときの血漿中濃度パラメーター
(Van Asperen J et al., 1998¹⁵⁾; Yang S et al., 2004¹⁶⁾; Woo JS et al., 2003¹⁷⁾)

Species	Treatment	C _{max} (ng/mL)	AUC (ng · hr/mL)	BA (%)
Mouse	Paclitaxel 5 mg/kg	90 ± 20	410 ± 30	9.3
	+ CsA 50 mg/kg	310 ± 40 (× 3.4)	3,020 ± 190 (× 7.4)	67.4 (× 7.4)
Rat	Paclitaxel 5 mg/kg	45 ± 7	1,453.6	12.6
	+ CsA 40 mg/kg	175 ± 25 (× 3.9)	2,203.6 (× 1.5)	19.1 (× 1.5)
Human	Paclitaxel 1.7 mg/kg	0.05μM		4
	+ CsA 15 mg/kg	0.20μM (× 4.0)		47 (× 11.8)

Paclitaxel は、単独でヒトに経口投与したときの生物学的利用率(BA)は4%であるのに対し、cyclosporin を経口で併用すると、そのBAはおおよそ12倍(47%)に上昇することが知られている¹⁵⁾。同様な相互作用の試験を実験動物で行った場合、cyclosporin の併用でラットのBAは1.5倍の上昇にとどまっております¹⁶⁾、マウスにおいても7.4倍である¹⁷⁾。

薬品の創製においては、可能なかぎり代謝酵素や efflux transporter の影響は回避したいと考えており、クリアランスの責任臓器がどこなのか、またその実体が代謝酵素なのかトランスポーターなのかを把握することは、スクリーニングの方向性や順番、タイミングを決めるうえで重要な要素になる。

医薬品の添付文書によると、薬物間相互作用の事例は、おおむね肝臓における代謝酵素の作用で語られていることが多いが、そのなかのいくつかは、小腸における代謝、あるいは efflux で理解できることも多い。特に代謝酵素 CYP3A4 は、その基質認識性が P-gp と類似しており、このことがさらに議論を複雑にしている¹¹⁾(表4)。

それでは、これらの責任臓器や実体を区別して判断するにはどのような手法を用いればよいのだろうか。図5は、クリアランスにおける責任臓器とその実体を見積るための概念・手法を、P-gp と CYP3A を中心に示したものである。CYP3A あるいは P-gp の基質であるか否かの確認は、それぞれの発現系を用いれば比較的簡便にスクリーニングできる。透過の方向性を確認するのであれば、前項で述べた Caco-2 細胞を用いたスクリーニングを併用する。クリアランス(や相互作用)の責任臓器を推定するためには、ラットを用いた *in vivo* の検討が比較的簡便である。すなわち、被験薬物を単独で、あるいは P-gp や CYP3A の阻害剤とともに経口したときの門脈内濃度、あるいは門脈投与したときの静

脈内濃度を測定することにより、消化管において無視できない efflux や代謝があるかどうか、あるいはクリアランスは消化管と肝臓のどちらが優位であるかが明らかになる。無論、本来は基質認識性や血漿中濃度推移についても、基質や阻害剤の濃度を変えて詳細な速度論的な解析^{12,13)}をするべきであり、これだけの検討でクリアランスの責任臓器やその実体を特定、あるいはその寄与率を定量的に見積ることは難しい。しかしながら、多くの新規化合物を一刻も早く評価・処理しなければならない創薬の現場においては、相互作用の可能性やそのメカニズムを推定するうえで有効な手法であると思われる。なお、「ラットの結果からヒトを類推できないのではないか？」という反論がこの手の動物実験には常に付きまとうが、ラットやマウスで観察される薬物間相互作用は、ヒトではむしろエンハンスされることがあり、実験動物で観察された事象は、けっして過小評価できないことに留意するべきである(表5)^{14~16)}。

Efflux transporter を回避する試み (1)

創薬研究においては、臨床における薬物間相互作用や生物学的利用率の変動が予測されつつも、efflux transporter の基質を開発候補品として選定せざるをえない場合もあるだろう。運わるくそのような状況に陥った場合には、efflux transporter の影響を可能なかぎり避けるための DDS 的な研究

図6 シクロスポリンの二つの製剤における血漿中濃度の推移 (ネオールの添付文書より)²⁴⁾
 サンディミュンで吸収不良を示す20例の腎移植患者におけるクロスオーバー試験

を、原薬の開発研究と同時並行で進める必要がある。

Efflux transporter の影響を避けるためには、原理的には基質として認識される構造をマスクする、あるいはトランスポーターをなんらかの方法で“麻痺”させる、などの方策が考えられ、具体的には“原薬の構造を変えない”阻害剤や溶解剤などの利用、あるいは“構造を修飾する”プロドラッグ化や高分子化などがあげられる。このうち後者については次項で触れることとし、ここでは“原薬の構造を変えない”手法について述べる。

阻害剤の利用については、P-gp の基質となる医薬品に阻害剤として KR-30031¹⁷⁾ や MS-209¹⁸⁾, cyclosporin¹⁹⁾, PSC 833, GF120918, LY335979, R101933²⁰⁾ などを同時に経口投与する試みがなされている。また、グレープフルーツジュース²¹⁾ やある種のフラボノイド²²⁾ にも P-gp に対する阻害作用があることが見いだされている。また、これらの阻害剤のなかには P-gp だけでなく、BCRP や multidrug resistance protein 2 (MRP2) のような他の efflux transporter も同時に阻害するものが見いだされている²³⁾。これらの阻害剤の多くは、がん化学治療において耐性克服剤として研究されてきたものであるが、経口で同時投与することにより P-gp の基質である抗がん剤の吸収を亢進することが期待される。

近年、一品目の開発コストが上昇するなかで、既存医薬品の寿命を延ばすさまざまな工夫がなされている。その最も常套な手段は、従来の製品の

表6 シクロスポリンの二つの製剤における血漿中濃度のパラメーター
 (Martin-Facklam M et al., 2002)²⁵⁾

パラメーター	サンディミュン	ネオール
AUC _{0-12hr} /Dose (ng·hr/mL/mg)	17.4 ± 6.8	32.2 ± 8.3 (× 1.9)
C _{max} /Dose (ng/mL/mg)	3.93 ± 1.87	10.49 ± 3.00 (× 2.7)
C _{min} /Dose (ng/mL/mg)	0.58 ± 0.23	0.77 ± 0.26 (× 1.3)
T _{max} (hr)	2.4 ± 1.1	1.4 ± 0.5

サンディミュンで吸収不良を示す20例の腎移植患者におけるクロスオーバー試験

製剤を改良することにより、新たな製剤特許を取得することであり、ノバルティス社が、免疫抑制剤の cyclosporin (製品名：サンディミュン：ヒトにおける経口吸収率 23%) の添加剤を改良し、吸収性のよい新製剤 (製品名：ネオール：吸収率 38%) の開発に成功したことはその好例であろう。

サンディミュンの添加成分はポリオキシエチレンヒマシ油のみであるが、ネオールはグリセリン脂肪酸エステルやプロピレングリコール、エタノール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などを含むマイクロエマルジョン製剤である。サンディミュンに対し吸収不良を示す20例の腎移植患者にネオールを投与した臨床試験において、cyclosporin の血漿中濃度は AUC で 1.9 倍、C_{max} で 2.7 倍の上昇が認められ、サンディミュンでしばしば観察される血漿中濃度の二峰性の消失が認められた(図6, 表6)²⁴⁾。ネオールでは吸収速度の上昇をもたらしていることから、メカニズムの一つとして消化管にお

図7 ME3229の化学構造およびその代謝物

図8 プロドラッグの消化管吸収

a: 細胞間隙ルートを介した吸収. b: 受動拡散による膜透過
 c: Apical membrane 上の efflux transporter による管腔側への排出
 d: Basal membrane 上の efflux transporter による血管液側への排出
 e: 代謝活性化. P: プロドラッグ. M: 代謝物(活性体)

ける溶解度が改善され, cyclosporin 分子が消化管細胞に“殺到する”ことによる P-gp の飽和が想定される。

最近, ある種の界面活性剤には, たんに溶解度を上昇させる, あるいは消化管内の溶解持続時間を延長させる効果だけでなく, efflux transporter を直接阻害する効果があることが明らかになった^{25,26)}。溶解剤(界面活性剤)を選択する際には, 臨界ミセル濃度(cmc)²⁷⁾と HLB(hydrophile-lipophile balance)値²⁸⁾という尺度がある。Efflux transporter を実効的に阻害する濃度は一般にその溶解剤の cmc 以下であり, 薬物の溶解に最適な濃度とは必ずしも同じではない。また, efflux transporter に対する阻害作用にはそれぞれの溶解剤によって至適な HLB 値が存在することが示唆されている^{29,30)}。溶解度の担保と efflux transporter に対する阻害作用の両方を期待するのであれば, これらのパラメーターは最適

図9 Ampicillin の Caco-2 細胞からの efflux
 (Chanteux H et al., 2005)⁴⁰⁾

Caco-2 細胞の apical 側 メディウムに 0.2 mM の pivampicillin を添加し, 37℃ で 1hr インキュベーションした (pulse)。その後, 薬物を含まないメディウム中に細胞を移し (chase), pivampicillin より細胞内で生成した ampicillin の apical 側および basal 側への efflux 量を測定した。

(Mean $\pm$ SD) (n=3)

-ATP: 細胞を 5 mM NaN_3 および 60 mM 2-D-deoxyglucose で 1h 前処理することにより ATP を枯渇。Pulse-chase 実験のメディウムにも NaN_3 および 2-D-deoxyglucose を添加

+Probenecid, +MK-571: MRP の阻害剤である probenecid (5 mM) または MK-571 (100 μ M) を両側のメディウムに添加

な添加剤やその濃度を選択する際の指標になると考えられる。

Efflux transporter の阻害作用を期待した溶解剤や界面活性剤, 包接化合物の応用については, 総説が発表されており^{31~34)}, また, 2005 年 Vol.20 (No.4) の本誌においても, Morishita が基質と溶解剤, 実験条件についての一覧を提示している³⁵⁾。さらに本特集号において, Yamagata らが阻害作用のメカニズムについて考察しているので, 併せて参照いただきたい¹⁾。

Efflux transporter を回避する試み (2)

Efflux transporter を回避する DDS 的手法の一つとしてプロドラッグ化があげられる。これは, プロドラッグ化によりトランスポーターに対する基質認識性を消失させる効果と, 脂溶性を調節して膜透過性を改善させ消化管細胞内の濃度を高く保つことにより, efflux transporter を飽和させる効果が期待

図 10
P-gp の基質である抗がん剤の耐性細胞での
挙動と高分子化の効果
(Guillemard V et al., 2004⁴⁴)より改変)

エンドサイトーシスで取り込まれた薬物-高分子複合体は、小胞を形成して lysosome に移行するルートに乗る。したがって、薬物が効率よく遊離できれば高い抗腫瘍効果が期待できる。これに対して、フリー体として取り込まれた薬物は細胞内に取り込まれ、効果をあらわす以外に、拡散による流出、efflux transporter による排出のルートもあるため、抗腫瘍効果を発揮する濃度に到達しない。

できる。

ME3277 とそのプロドラッグである ME3229 (図 7) の一連の研究は、プロドラッグの吸収に影響を与える efflux transporter の作用を如実に示した発見といえる。ME3229 は、glycoprotein II b/III a 拮抗薬である ME3277 のジエステル型プロドラッグである。ME3277 は分子内に二つのカルボン酸を有する水溶性化合物で、ほとんど経口吸収されず、また、カルボン酸をエステル化することにより Caco-2 膜透過性は改善したものの、経口吸収性は改善されなかった。この原因を追求するなかで、ME3277 は、ラット小腸を用いた透過実験で serosal 側から apical 側への排出方向の透過が apical 側から serosal 側(吸収方向)への輸送を上回ることが示された^{36,37)}。

その後 Kondo らにより、bcrp1 ノックアウトマウスの腸管灌流実験において、ノックアウトマウスでは wild-type にくらべて ME3277 の吸収率が高いことが示され、ME3277 が BCRP の基質であることが明らかとなった³⁸⁾。プロドラッグ ME3229 は、その脂溶性に応じた速度で腸管上皮細胞内に取り込まれるが、消化管細胞内で生成した代謝物(活性本体の ME3277 およびモノエステル体代謝物)が、門脈血中に移行する以上に BCRP によって管

腔側に戻るため、プロドラッグ化によっても期待した吸収率の向上が図れないものと考えられた(図 8)。

ME3229 の研究を通じてわかったこと、すなわち、「消化管の上皮細胞で活性体が生成され、それが efflux transporter によって管腔側に戻ってしまう比率が高いと、プロドラッグ化して膜透過を改善させても、吸収率の上昇につながらない」、これが正しければ、逆にプロドラッグの成功例では、薬物が上皮細胞から循環血側へ効率よく移行しているのだろうか。

Pivampicillin (PIVA) は、MRP の基質である ampicillin (AMPI) の側鎖をピバロイルエステル化したプロドラッグである。ヒトに PIVA を経口投与したときの AMPI の尿中排泄率は、AMPI を投与した場合(25~29%)の2倍以上の約 70%³⁹⁾と報告されていることから、エステル化の効果が充分発揮されたプロドラッグの好例であるといえる。

Chanteux らは、PIVA の Caco-2 細胞膜透過過程を詳細に検討した⁴⁰⁾。PIVA を Caco-2 細胞の apical 側に添加すると、basal 側には未変化体の PIVA と活性本体の AMPI が出現する。細胞内には AMPI が高濃度に存在することから、取り込まれた PIVA は細胞内で AMPI に加水分解され

図 11 デンドリマーの構造

デンドリマーとは、core, interior および surface の三つの要素で構成される樹木状構造をしたポリマーである。3要素の組み合わせで、さまざまな物理化学的な性質を持つデンドリマーが多数合成されているが、そのなかの一つであるポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーは、難溶性薬物の可溶化、遺伝子導入、化学療法剤のターゲティングなど、DDSの分野でよく研究されている。

(Sigma-Aldrich のカタログから引用)

ることがわかる。また、apical 側から PIVA を取り込ませたのち、薬液を含まないメディウム中に細胞を移し、apical および basal 側への AMPI の efflux を検討した結果、吸収方向を表す basal 側への移行速度は、apical 側への戻り方向にくらべて約 2 倍の値を示した。また、MRP2/3 の阻害剤である probenecid および MK-571 を試験系に添加すると、透過の方向性が消失することが示された(図 9)。

以上の結果から、消化管細胞内で PIVA から生成された AMPI は、MRP2 により消化管側へ、あるいは MRP3 により血液側へ efflux される(図 1)が、血液側への吸収方向の efflux が消化管側への排出方向の efflux を上回るため、プロドラッグ化により apical membrane の透過性を改善することが、経口吸収性の改善につながったものと考察され、ME3229 の研究で得られた推論が支持された。

前稿においては、aciclovir をアミノ酸で修飾することにより influx transporter の PEPT1 に認識

され、経口吸収率が大幅に改善したプロドラッグ、valaciclovir の例を紹介したが、これには efflux transporter の影響を受けにくくなった効果も示唆されている。Landowski らは、ヒトに valaciclovir を経口投与したときの aciclovir の AUC と消化管のトランスポーター発現量との関係を検討したところ、吸収量の指標である AUC が P-gp や MRP2 の発現量と負の相関を示すことを見いだした。Aciclovir 自身は P-gp の基質であることを考慮すると、PEPT1 を介して吸収されることにより、efflux transporter の影響を受けにくくなったことも吸収改善に寄与していると考えられる⁴¹⁾。Influx transporter の形成する空間にプロドラッグが存在するため、efflux transporter と接触するチャンスが低下したのではないかと想像される。

このほかにも quinidine のプロドラッグ化により吸収率の安定化に成功している事例⁴²⁾があり、消化管の efflux transporter の影響を克服するうえで一つのヒントとなると思われる。

がん化学療法における課題の一つが多剤耐性の問題であり、その原因は P-gp や MRP, BCRP などの efflux transporter による排出であることがよく知られているが、これを回避する代表的な方法が高分子化である。抗がん剤を高分子化するとエンドサイトーシスで取り込まれるようになり、膜小胞を形成して efflux transporter と接触することなく膜を透過するため、耐性を獲得した細胞に対しても抗腫瘍効果を示すと考えられている(図 10)^{43~45)}。薬物が経口吸収されるには、消化管上皮細胞の apical membrane を透過して細胞内に取り込まれるだけでなく、さらに細胞内から basal membrane を透過して血液側へ移行しなければならず、腫瘍細胞へのターゲティングにくらべてさらに複雑な過程である。

しかしながら、最近、前述の抗がん剤と同様、高分子化との複合体を形成させることにより P-gp の基質である propranolol の Caco-2 細胞膜の透過を上昇させた例が報告されている(図 11)。D'Emanuele らは、G3 polyamidoamine dendrimer (G3)、およびこの表面を修飾した lauroyl-G3 (G3Lx) という樹状構造を持つ高分子の 1 個当たり、propranolol の 2-6 分子を結合させた高分子複

合体プロドラッグを合成し、その透過性を検討した。Propranolol自身の透過性は、Caco-2細胞のbasal側からapical側への排出方向の輸送が優位であり、阻害剤としてcyclosporinを共存させると輸送の方向性が消失したが、同じ条件でこれらのプロドラッグの透過性を測定すると、apical側からbasal側への吸収方向が優位であり、cyclosporinを添加しても透過定数の変化が認められず、さらにエンドサイトーシスの阻害剤であるcolchicineにより透過が低下した⁴⁶⁾。G3およびG3Lx自身は、エンドサイトーシスによりCaco-2細胞に取り込まれ、細胞内では小胞を形成することが報告されている⁴⁷⁾ことから、この高分子プロドラッグは小胞に包まれてエンドサイトーシスされて吸収されることにより、P-gpの影響を受けにくくなったものと考えられる。

ただこのようなアプローチは、複合体から活性体の遊離過程をコントロールすることが困難な場合が多く、今後のさらなる検討が期待される。

おわりに

以上のとおり、消化管におけるトランスポーターの意義や応用性を紹介したが、吸収のみならず分布や排泄においても、医薬品の生体内動態や相互作用を解釈するうえでトランスポーターの関与を想定した多くの事例が見いだされている。幸いにも企業内におけるトランスポーターの認知度は日増しに高まってきており、研究者が自らの発想と裁量で研究を行える企業内環境が整いつつある。

トランスポーター研究は、薬物の体内動態を正當に評価し、その本質を理解するためのみならず、薬理作用や毒性を説明する手段としていまや避けては通れない関門であることを、われわれ自身が再認識するべきであろう。トランスポーター研究が創薬研究の重要な原動力となる、来たるべき時代の胎動を感じる。

前稿および本稿で使用したすべての図・表について、Springer Science and Business Media社をはじめとする出版社、学会および論文の著者の方か

ら、快よく引用の許諾をいただきました。心より感謝いたします。

文 献

- 1) Yamagata T, Morishita M : Oral drug delivery system based on controlling intestinal transporter function. *Drug Delivery System* 21 : 119-125, 2006.
- 2) Sakaeda T, Okamura N, Nagata S, Yagami T, Horinouchi M et al : Molecular and pharmacokinetic properties of 222 commercially available oral drugs in humans. *Biol Pharm Bull* 24 : 935-940, 2001.
- 3) Toyobuku H, Tamai I, Ueno K, Tsuji A : Limited influence of P-glycoprotein on small-intestinal absorption of cilostazol, a high absorptive permeability drug. *J Pharm Sci* 92 : 2249-2259, 2003.
- 4) Chiou WL, Chung SM, Wu TC, Ma C : A comprehensive account on the role of efflux transporters in the gastrointestinal absorption of 13 commonly used substrate drugs in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 39 : 93-101, 2001.
- 5) Lin JH : How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake? *Drugs Today* 40 : 5-22, 2004.
- 6) Lee YJ, Chung SJ, Shim CK : Limited role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of cyclosporin A. *Biol Pharm Bull* 28 : 760-763, 2005.
- 7) Ogihara T, Kamiya M, Ozawa M, Fujita T, Yamamoto A et al : What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006, (accepted).
- 8) Saitoh H, Hatakeyama M, Eguchi O, Oda M, Takada M : Involvement of intestinal P-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine. *J Pharm Sci* 87 : 73-75, 1998.
- 9) Nakayama A, Eguchi O, Hatakeyama M, Saitoh H, Takada M : Different absorption behaviors among steroid hormones due to possible interaction with P-glycoprotein in the rat small intestine. *Biol Pharm Bull* 22 : 535-538, 1999.
- 10) Ogihara T : 19th JSSX Meeting, 18S4A-7, 2004.
- 11) Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB : Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein) : recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75 : 13-33, 2004.
- 12) Woo JS, Lee CH, Shim CK, Hwang SJ : Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031. *Pharm Res* 20 : 24-30, 2003.
- 13) Drescher S, Glaeser H, Mordt T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF : P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther* 73 : 223-231, 2003.
- 14) Meerum Terwogt JM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Schellens JH : Co-administration of cyclosporin enables oral therapy with paclitaxel. *Lancet* 285 : 352, 1998.
- 15) van Asperen J, van Tellingen O, van der Valk MA, Rozenhart M, Beijnen JH : Enhanced oral absorption and decreased elimination of paclitaxel in mice cotreated with cyclosporin A. *Clin Cancer Res* 4 : 2293-2297, 1998.
- 16) Yang S, Gursoy RN, Lambert G, Benita S : Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm Res* 21 : 261-270, 2004.
- 17) Woo JS, Lee CH, Shim CK, Hwang SJ : Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the

- P-glycoprotein inhibitor KR30031. *Pharm Res* 20 : 24-30, 2003.
- 18) Kimura Y, Aoki J, Kohno M, Ooka H, Tsuruo T, Nakanishi O : P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* 49 : 322-328, 2002.
 - 19) Meerum Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H et al. : Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clin Cancer Res* 5 : 3379-3384, 1999.
 - 20) Bardelmeijer HA, Ouwehand M, Beijnen JH, Schellens JH, van Tellingen O : Efficacy of novel P-glycoprotein inhibitors to increase the oral uptake of paclitaxel in mice. *Invest New Drugs* 22 : 219-229, 2004.
 - 21) Takanaga H, Ohnishi A, Matsuo H, Sawada Y : Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in caco-2 cells. *Biol Pharm Bull* 21 : 1062-1066, 1998.
 - 22) Varma MV, Panchagnula R : Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS : effect on solubility and permeability *in vitro*, *in situ* and *in vivo*. *Eur J Pharm Sci* 25 : 445-453, 2005.
 - 23) Kruijtzter CM, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M et al. : Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* 20 : 2943-2950, 2002.
 - 24) ネオールの添付文書 : http://www.novartis.co.jp/product/neo/pi/pi_neo02.html#a08
 - 25) Martin-Facklam M, Burhenne J, Ding R, Fricker R et al. : Dose-dependent increase of saquinavir bioavailability by the pharmaceutical aid cremophor EL. *Br J Clin Pharmacol* 53 : 576-581, 2002.
 - 26) Tayrouz Y, Ding R, Burhenne J, Riedel KD, Weiss J et al. : Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clin Pharmacol Ther* 73 : 397-405, 2003.
 - 27) http://www.dojindo.co.jp/letterj/095/reviews_01.html
 - 28) <http://ja.wikipedia.org/wiki/HLB>
 - 29) Batrakova EV, Li S, Li Y, Alakhov VY, Kabanov AV : Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharm Res* 21 : 2226-2233, 2004.
 - 30) Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV : Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 304 : 845-854, 2003.
 - 31) Wasan KM : Formulation and physiological and biopharmaceutical issues in the development of oral lipid-based drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 27 : 267-276, 2001.
 - 32) Hugger ED, Audus KL, Borchardt RT : Effects of poly (ethylene glycol) on efflux transporter activity in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* 91 : 1980-1990, 2002.
 - 33) Chiu YY, Higaki K, Neudeck BL, Barnett JL et al. : Human jejunal permeability of cyclosporin A : influence of surfactants on P-glycoprotein efflux in Caco-2 cells. *Pharm Res* 20 : 749-756, 2003.
 - 34) Arima H, Yunomae K, Hirayama F, Uekama K : Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *J Pharmacol Exp Ther* 297 : 547-555, 2001.
 - 35) Morishita M : The functional role of transporters in the intestine and their contribution to drug absorption. *Drug Delivery System* 20 : 424-432, 2005.
 - 36) Okudaira N, Komiya I, Sugiyama Y : Polarized efflux of mono- and diacid metabolites of ME3229, an ester-type prodrug of a glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist, in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 295 : 717-723, 2000.
 - 37) Okudaira N, Tatebayashi T, Speirs GC, Komiya I, Sugiyama Y : A study of the intestinal absorption of an ester-type prodrug, ME3229, in rats : active efflux transport as a cause of poor bioavailability of the active drug. *J Pharmacol Exp Ther* 294 : 580-587, 2000.
 - 38) Kondo C, Onuki R, Kusuhara H, Suzuki H, Suzuki M et al. : Lack of improvement of oral absorption of ME3277 by prodrug formation is ascribed to the intestinal efflux mediated by breast cancer resistant protein (BCRP/ABCG2). *Pharm Res* 22 : 613-618, 2005.
 - 39) Roholt K, Nielsen B, Kristensen E : Clinical pharmacology of pivampicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 6 : 563-571, 1974.
 - 40) Chanteux H, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM : Accumulation and oriented transport of ampicillin in Caco-2 cells from its pivaloyloxymethylester prodrug, pivampicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 49 : 1279-1288, 2005.
 - 41) Landowski CP, Sun D, Foster DR, Menon SS, Barnett JL et al. : Gene expression in the human intestine and correlation with oral valaciclovir pharmacokinetic parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 306 : 778-786, 2003.
 - 42) Jain R, Majumdar S, Nashed Y, Pal D, Mitra AK : Circumventing P-glycoprotein-mediated cellular efflux of quinidine by prodrug derivatization. *Mol Pharm* 1 : 290-299, 2004.
 - 43) Minko T, Kopecková P, Pozharov V, Kopecek J : HEMA copolymer bound adriamycin overcomes MDR1 gene encoded resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *J Control Release* 54 : 223-333, 1998.
 - 44) Guillemard V, Uri Saragovi H : Prodrug chemotherapeutics bypass p-glycoprotein resistance and kill tumors *in vivo* with high efficacy and target-dependent selectivity. *Oncogene* 23 : 3613-3621, 2004.
 - 45) Koziara JM, Lockman PR, Allen DD, Mumper RJ : Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. *J Control Release* 99 : 259-269, 2004.
 - 46) D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D : The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J Control Release* 95 : 447-453, 2004.
 - 47) Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D, D'Emanuele A : Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. *J Control Release* 97 : 259-267, 2004.