17S2-02 医薬品開発における薬物トランスポーター寄与率評価の重要性：特異的阻害剤を用いたアプローチ

楠原 洋之、杉山 雄一

東京大学大学院薬学系研究科

IMPORTANCE OF EVALUATING CONTRIBUTIONS OF TRANSPORTERS IN DRUG DEVELOPMENT: AN APPROACH USING SELECTIVE INHIBITORS

Hiroyuki KUSUHARA and Yuichi SUGIYAMA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

[目的]近年、ヒトも含めて薬物トランスポーター遺伝子のクローニングが急速にすすみ、多くの薬物トランスポーター遺伝子が単離されている。また、アフリカツメガエル卵母細胞あるいは哺乳類細胞をホストとした遺伝子発現系を用いた輸送実験により、個々のトランスポーターの基質選択性が明らかにされており、薬物トランスポーターは広範な基質を有していること、基質選択性に重複がみられることが明らかにされている。従って薬物の細胞膜透過過程には、複数のトランスポーターが関与していることが予想される。

薬物間相互作用あるいは遺伝的多型など、あるトランスポーターの輸送能が阻害されるあるいは輸送能に個人差があるときに、結果としてその基質となる薬物の体内動態がどの程度変動するか、という問いに定量的に答えるためには、その薬物の動態特性だけではなく、膜透過過程に占めるトランスポーターの寄与率が必要になる。多くのトランスポーター遺伝子が単離されている現在、そのおのおのが個体レベルでどの程度の寄与しているのか評価する手法を確立することが次の課題である。評価法の一つとして阻害剤を用いたアプローチがある。すでに P-450 の領域では、選択的な基質・阻害剤が整理されており、マイクロゾームを用いた代謝反応から各 isozyme の寄与率が評価され、薬物動態の個人差・薬物間相互作用の可能性について検討する重要な情報となっている。一方、トランスポーターの分野においては、まだ十分に整理されておらず、阻害剤の選択性に関して系統だてて比較・整理していくことが必要である。我々は肝臓、腎臓の取り込み過程ならびに血液脳関門・血液脳脊髄液関門に発現されるラット有機アニオントランスポーター (rat organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1~3, rat organic anion transporter (Oat) 1~3) に焦点をあてた。肝臓のシヌソイド側膜には、rOatp1, rOatp2, rOatp4, rOat2, rOat3 が発現しており、腎側底膜では rOat1 ならびに rOat3 が、血液脳関門では rOatp2、脈絡叢側底膜では rOatp1, rOatp3, rOat3 が発現していることから、この組み合わせにおいて、個々のトランスポーターの寄与率を評価するための、阻害剤の探索をす

めた。

[方法] 各有機アニオントランスポーター (Oatp1~3, Oat1~3) の遺伝子発現系をブタ腎由来の LLC-PK 1 細胞を用いて作成した。細胞を 12 穴ディッシュに培養し、常法に従い輸送実験を行った。阻害定数 (K_i 値) は、それぞれのトランスポーターの典型的な基質となる薬物の取り込み初速度に対して算出した。肝臓への取り込み過程は常法に従い調製した遊離肝細胞を、腎取り込み過程については腎スライス切片を用いて、輸送実験を行った。血液脳関門・血液脳脊髄液関門での輸送評価は、BEI 法ならびに単離脈絡叢を用いて行った。

[結果・考察]

得られた K_i 値に基づいて、阻害剤の選択性を評価すると、Oatp の典型的な基質となる taurocholate は rOatp1~3 の中では同程度の親和性 (K_m 値 $\sim 45 \mu\text{M}$) を示すが、rOat1~3 に対する親和性は低かった (K_i 値 $>300 \mu\text{M}$)。反対に、OAT family の典型的な基質となる p-aminohippurate (PAH) は rOatp1~3 に対して阻害効果を示さないものの、rOat1 (K_m 値 $85 \mu\text{M}$)、rOat3 (K_i 値 $400 \mu\text{M}$) は阻害する。これらの阻害剤により、両 family 全体の寄与率を評価できる。digoxin は rOatp2 に対して (K_i 値 $1 \mu\text{M}$)、cimetidine (K_i 値 $10 \mu\text{M}$)、benzylpenicillin (PCG; K_m 値は $53 \mu\text{M}$) は rOat3 に対して比較的選択的な阻害剤となる。pravastatin は rOatp1, rOatp2 (rOatp3 は未測定)、rOat3 に対して同程度の K_i 値 ($\sim 30 \mu\text{M}$) であるが、rOat1, rOat2 に対する親和性は非常に低い。indomethacin や ketoprofen などは、適切な濃度を用いることで、rOat2 に対する選択性を有することが示唆された。以上の組み合わせにより、各有機アニオントランスポーターの寄与率を評価することが可能となるものと考えている。rOatp1, rOatp3, rOat1 に対して選択的な阻害剤は見つかっておらず、引き続き探索を続けていくつもりである。

これらの阻害剤の選択性を利用して、これまでに血液脳関門を介した排出輸送、脈絡叢、

肝臓、腎臓への取り込み過程に占める有機アニオントランスポーターの寄与率の評価を行った。血液脳関門においては、rOatp2 が脳毛細血管内皮細胞の脳側・血液側いずれの細胞膜にも発現していることが報告されている。estradiol 17 β glucuronide (E217 β G) をモデル薬物として、脳内投与後の消失を BEI 法により評価すると、比較的短い半減期 (~20 分) で脳内より消失する。digoxin による阻害効果を検討すると、最大で 40% 程度でしか阻害がかからない。rOatp2 の寄与率もこの程度とすると、他のトランスポーターの関与も示唆されている。

脈絡叢刷毛縁膜では PCG の取り込み機構が存在することは、従来からの速度論解析から示唆されてきた。すでに局在が明らかになっている rOatp1 とは異なることも明らかにされている。rOat3 安定発現系と脈絡叢への PCG の取り込みに対して、PCG ならびに cimetidine を含む阻害剤の K_m 値、 K_i 値を比較すると、両者はよく一致しており、rOat3 により脈絡叢で PCG の輸送の大部分が説明されることが示唆されている。同様に腎臓においても、PCG を阻害剤として用いた場合、PAH と pravastatin の輸送に対する K_i 値は異なっており、PAH の腎取り込みは rOat1 により、pravastatin の腎取り込みは rOat3 によりそれぞれ説明されることが明らかとなっている。

[総括] ラットでは安定発現系と単離組織との間で阻害剤の選択性に比較的良好な相関がみられ、阻害剤が寄与率を評価する有効な方法で

あることが示された。現在のところ、rOatp1 あるいは rOatp3、rOatp4 に対する阻害剤が見つかっていないことから、これらのトランスポーターの重要性については不明である。更に阻害剤の探索を続けて、これらのトランスポーターの重要性を明らかにしていきたい。Oatp、Oat がそれぞれ肝臓・腎臓の取り込み過程で重要な役割を果たしていることから、これらトランスポーターの基質認識が肝腎振り分けの重要な要因の一つである。更に個々の薬物の膜透過を担うトランスポーターを同定することで、肝腎振り分けについても遺伝子レベルで説明できるようになるものと期待している。そのために、今後ヒトトランスポーターに対して類似の実験を行い、ヒトの体内動態を支配する薬物トランスポーターを同定していく必要がある。

また、P-glycoprotein あるいは一部の CYP isozyme で報告されているように、基質依存的な阻害効果も観察された。そのメカニズムの詳細は明らかになっていないが、この点についても今後の検討が必要である。

[謝辞] 本研究は大学院生の杉山大介君、森田直美さん、長谷川真絹さん、留学生の何仲貴さん、研究生の永田吉範さん、北里大の設楽悦久先生の成果です。鈴木洋史先生、加藤将夫先生には有益なご助言をいただきありがとうございました。cDNA を供与していただきました東北大学の阿部高明先生、杏林大学の遠藤仁先生、University Hospital, Zurich の Peter J. Meier 先生に深謝いたします。

[Abstract] Recently, molecular cloning methodologies have enabled us to clone the cDNA of transporters, and characterize the transport activity using cDNA transfectants. It is necessary to examine in future studies the contribution of each transporter to the overall disposition of some drugs. The contribution of a transporter can be evaluated using selective inhibitors. In this study, we focused on organic anion transporters such as organic anion transporting polypeptides (OATPs; rOatp1~3) and organic anion transporters (OATs; rOat1~3). Stable cDNA transfectants have been established using LLC-PK1 cells as host and inhibition studies for the uptake of their typical ligands were carried out. Digoxin is a specific inhibitor for rOatp2, while cimetidine and benzylpenicillin (PCG) are selective inhibitors for rOat3. Taurocholate has similar affinity for rOatp1~3, but quite low affinity for rOat1~3. *p*-Aminohippurate (PAH) is a inhibitor for rOat1 and rOat3, but not for rOat2 ($K_i > 1$ mM) and rOatp1~3. Using these inhibitors, we have evaluated the contribution of rOatp2 on the blood brain barrier, and that of rOat3 to the uptake of PCG and PAH, and pravastatin into the choroid plexus and kidney, respectively, has been evaluated. Estradiol 17 β glucuronide is rapidly eliminated from the brain (elimination half life is approximately 20 min). By examining inhibitory effect of digoxin, the contribution of rOatp2 has been estimated at most 40% and additional uptake system is present on the blood-brain barrier. The uptake of PCG and PAH, and pravastatin into the choroid plexus and kidney is mainly accounted for by rOat3.

[1] Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T., Meier, P.J., Sekine, T., Endou, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. (2001). "Characterization of the efflux transport of 17 β -estradiol-D-17 β -glucuronide from the brain across the blood-brain barrier." *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 316-22., [2] Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H. and Sugiyama, Y. "Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.