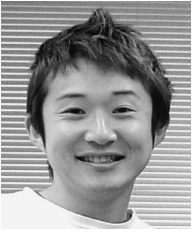


《若手研究者紹介》



薬物の消化管吸収に及ぼすトランスポーターの影響とその評価に関する研究

白 坂 善 之* Yoshiyuki Shirasaka
金沢大学医薬保健研究域薬学系薬物動態学研究室

1. はじめに

「ほんの些細な偶然によって今の自分がある」とは、著者の恩師である摂南大学薬学部教授の山下伸二先生の言葉であるが、振り返れば著者にも同じことが言える。何より小中高と続けてきたサッカーがポイントであり、大学においてもサッカー部へ入部したことで顧問の山下先生と出会い、その後は「大学院生でもサッカー部に参加できる」という不純な噂を聞きつけ薬剤学（山下）研究室に配属した。ところが、いつしか消化管吸収研究がサッカーと同じくエキサイティングなものだとのめり込み、挙句は山下先生の不摂生とも奇抜とも言える生き方に憧れアカデミックの世界にまで入門してしまった。そんなこんなで、両足でサッカーを、両手で薬剤学を楽しみながら、いつかはそのてっぺんを取らんと野心に満ちた今日の著者がいる。

こんな不純な動機で歩み出した著者とはいえ（笑）、山下先生指導の元で研究を行った摂南大学時代に始まり、金沢大学薬学系教授の玉井郁巳先生と共に歩んだ東京理科大学時代から金沢大学での現在に至るまで、とにかく薬物の消化管吸収研究には没

頭した。特に、消化管トランスポーターに関する研究を中心に取り組んできたわけだが、本稿では、著者のこれまで行ってきたその薬物消化管吸収研究をダイジェストながら紹介させて頂きたい。

2. Influx/Efflux トランスポーターを介した薬物の消化管吸収動態

複雑で多様な構造を持った新規医薬品候補化合物の開発に伴い、多種類のトランスポーターに基質として認識される医薬品が増加している。これに伴い、生理環境・種差などによる薬物動態特性の複雑さはより一層増大し、特に経口投与薬の有効性を決定する消化管吸収性の予測を困難にしている。そのため、現行の *in vitro* 吸収性評価システムの妥当性に混乱を招くに至っている。一方、現在、医薬品開発の早期段階で最も重要視されている消化管トランスポーターは P 糖蛋白質 (P-glycoprotein, P-gp) と言っても過言ではない。したがって、「薬物の消化管吸収における P-gp の影響を定量的に評価できる方法論の提唱」は、製薬企業における医薬品開発は勿論のこと臨床における医薬品適正使用に対しても期待される重要なテーマと言える。

一方、実際には *in vivo* においては *in vitro* から予想されるほど P-gp の影響が大きく観察されない場合も少なくなく、中には P-gp は消化管吸収にほとんど影響していないと考える研究者さえいる。このような論議については、市販医薬品が既に十分な吸収性が確保されている成功例であるからだという見解もあるが、基本的には、化合物自体の (i) 受動拡散の寄与が大きい、(ii) P-gp に対する affinity が高

*2007 年摂南大学大学院薬学研究科修了、博士（薬学）取得。東京理科大学薬学部助教を経て、2008 年金沢大学薬学系助教に就任。受賞歴：第 34 回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award, 日本薬剤学会第 24 年会最優秀発表者賞他。座右の銘：出すぎた杭は打たれない。趣味：サッカー、クラブ活動。好きなタレント：榮倉奈々、長澤まさみ、北川景子。
連絡先：〒 920-1192 金沢市角間町
E-mail: shira@p.kanazawa-u.ac.jp

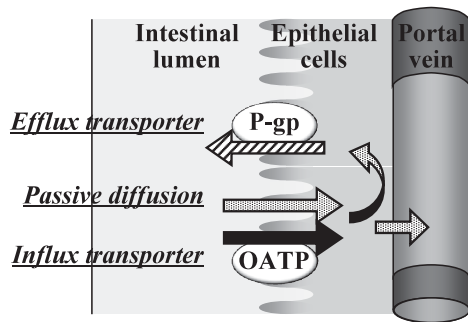


図1 薬物の吸収動態に対する influx/efflux トランスポーターの影響とその相殺性

い (消化管内で常に飽和状態), (iii) 単位 P-gp 当たりの最大輸送速度が小さい, などが考えられる。しかし, 著者は最近, (iv) influx トランスポーターの影響により P-gp による輸送活性が mask されている, という新たな仮説を導入した (図1)。すなわち, 著者は, *in vivo* では P-gp と influx トランスポーターがその影響を相殺しているのではないかと考えたのである。裏を返せば, 仮に *in vitro* における P-gp 評価が危機的な値を示したとしても, influx トランスポーターの確実な影響を示すことができれば *in vivo* で十分な吸収性を確保できると再評価できる。したがって, 「influx および efflux トランスポーターの影響を総合評価できるヒト経口吸収性予測システムの提唱」は, 企業や臨床において待望されるより重要かつ究極のテーマと言える。

3. 薬物の消化管吸収に及ぼす P-gp の影響とその評価に関する研究

現在, 薬物の膜透過に及ぼす P-gp の影響を簡便に評価する目的で Caco-2 細胞を初めとする各種培養細胞が繁用されている。しかし, そのような *in vitro* での結果から, 実際の *in vivo* における各組織の薬物移行過程に P-gp がどの程度影響を及ぼすのかを定量的に評価することは極めて困難である。そこで著者は, 消化管からの吸収における P-gp の影響を定量的に評価できる方法論の構築を最終的な目的として詳細な検討を行った¹⁻³⁾。

まず, P-gp 発現レベルの異なる種々の細胞 (Normal, P-gp-induced, P-gp-highly induced および MDR1-Knockdown Caco-2 cells, MDCKII/MDR1 cells) の単層膜を用いて, 3 種の P-gp 基質薬物 (quinidine, verapamil, vinblastine) の膜透過性に

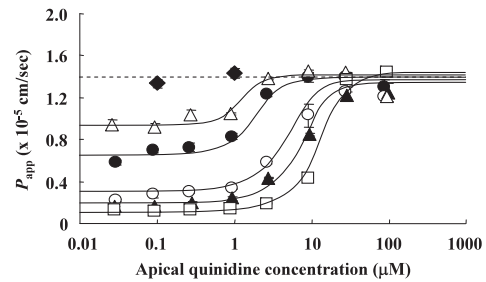


図2 Quinidine の膜透過性に及ぼす P-gp 発現レベルの影響

Normal Caco-2 cells (●); P-gp-induced Caco-2 cells (○); P-gp-highly induced Caco-2 cells (▲); MDR1-knockdown Caco-2 cells (△); MDR1-MDCKII cells (□); Inhibition of P-gp by alprenolol in normal Caco-2 cells (◆).

及ぼす薬物濃度と P-gp 発現レベルの影響を観察した。いずれの薬物において吸収方向への膜透過性は濃度依存的に増大し, 粘膜 (apical, AP) 側の薬物濃度に対してシグモイド型の関係を示した (図2に quinidine の結果を示す)。この時, 高濃度側では P-gp の飽和が認められ, 低濃度側では P-gp 発現量に依存した膜透過性の有意な低下が観察された。以上の知見から, 経口投与後のヒト消化管におけるこれら薬物の膜透過性を推定するためには, 膜透過性と AP 側 (消化管腔内) 薬物濃度および P-gp 発現レベルとの関係を速度論的に解析し, ヒト消化管膜の P-gp 発現レベルでの濃度依存的な膜透過性変化を simulate する必要があると考えられた。そこで, P-gp による排出過程を含む薬物膜透過モデルを構築し, 薬物の膜透過仮定を速度論的に解析した。膜透過モデルにおいては, AP 側から漿膜 (basal, BL) 側への輸送速度 (V_{AB}) を, AP 側から BL 側への受動的な膜透過速度 ($V_{passive}$) と Michaelis-Menten 式に従った P-gp による能動的な輸送速度 (V_{P-gp}) との差として表した (式 (1))。

$$V_{AB} = V_{passive} - V_{P-gp} = CL_{passive} \cdot C_a - \frac{V_{max} \cdot C_a^r}{K_{m(app)}^r + C_a^r} \quad (1)$$

式 (1) において, $CL_{passive}$ は受動的な膜透過クリアランス, C_a は AP 側薬物濃度, r は hill 係数を表している。また, V_{max} は P-gp による最大輸送速度, $K_{m(app)}$ は P-gp と薬物との親和性を表すパラメータである。ここで, P-gp の薬物結合サイトは細胞の脂

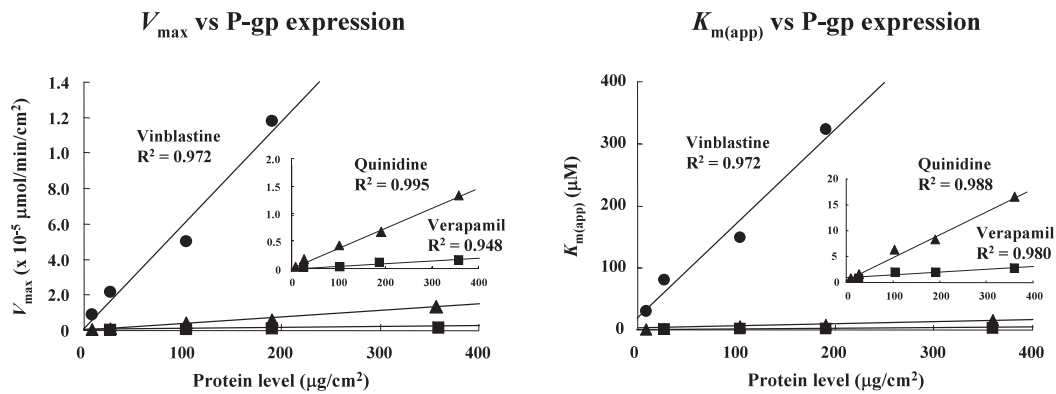


図3 速度論的パラメーター (V_{max} および $K_{m(app)}$) と P-gp 発現レベルとの関係

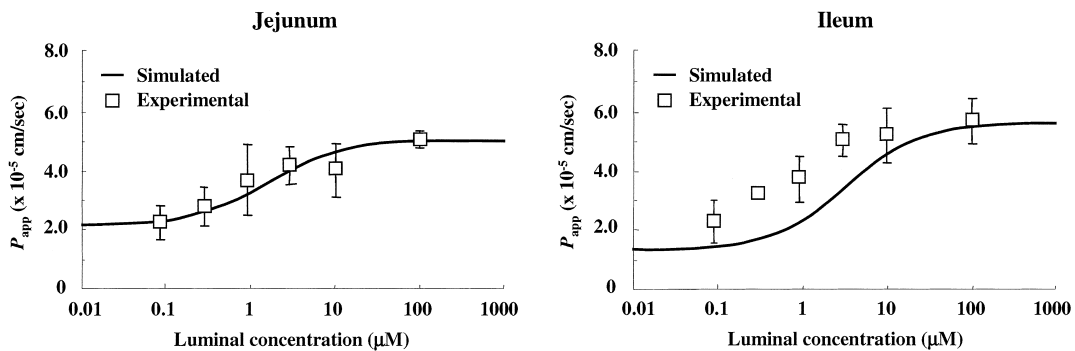


図4 Quinidine のラット小腸膜透過性 simulation

質二重膜内に存在することから、P-gp 結合サイト近傍の薬物濃度を正確に測定することは事実上不可能と考えられる。そこで本モデルにおいては、AP 側薬物濃度 (C_a) を基準として Michaelis-Menten 式を定義した。したがって、 $K_{m(app)}$ は P-gp に対する薬物の真の affinity (K_m) と、AP 側から P-gp 結合サイトへの薬物移行過程とのハイブリットなパラメータであり、P-gp に対する見掛けの affinity と定義できる。

式 (1) に、各細胞の単層膜を用いて測定した薬物の膜透過速度と AP 側濃度の関係を当てはめることにより、各薬物について V_{max} および $K_{m(app)}$ 値を算出した。その結果、興味深いことに、いずれの薬物においても、P-gp 発現レベルが高くなるにつれて V_{max} 値のみならず $K_{m(app)}$ 値も大きくなることから明らかとなった (図 3)。そこで、各薬物の $K_{m(app)}$ 値と各細胞における P-gp 発現レベルとの相関を観察したところ、両者の間に極めて良好な正の直線関係が認められた。本結果は、P-gp 発現レベルから、その細胞における基質薬物の $K_{m(app)}$ 値を推定することが可能であることを示すものである¹⁾。そこで実

際に、ラット消化管膜に対する quinidine, verapamil および vinblastine の V_{max} および $K_{m(app)}$ 値を推定し、各薬物についてラット消化管膜透過性と基質薬物濃度の関係の simulation を試みた。まず、ラット小腸各部位 (空腸および回腸) における P-gp 発現レベルを測定し、*in vitro* 膜透過実験から算出した各薬物の V_{max} および $K_{m(app)}$ 値と P-gp 発現レベルとの関係式に代入することによって、ラット小腸各部位における V_{max} ならびに $K_{m(app)}$ 値を算出した。得られたパラメータを用い、各薬物のラット小腸膜透過性と濃度との関係を simulate した。さらに、実際にラット小腸各部位を用いた *in situ* 灌流実験 (single pass 法) によって薬物の膜透過性を実測したところ、いずれの薬物についても simulation 結果とほぼ一致する結果が得られ、今回用いた方法論の妥当性が確認された (図 4 に quinidine の結果を示す)。

以上、本研究を介して、種々の細胞を用いた *in vitro* 実験からヒト *in vivo* における P-gp 基質薬物の消化管膜透過性を予測する方法論を提唱した。本成果は P-gp 基質薬物の経口剤としての開発に極め

て重要な知見であり、今後、本研究で構築された消化管膜透過性の新規評価法が、実際の医薬品開発に役立つものと期待される²⁾。

4. OATP/P-gp の相殺性に基づく 薬物吸収動態解析

近年、トランスポーターの基質となる医薬品における薬物間相互作用 (drug-drug interaction, DDI) や薬物 - 食物間相互作用 (drug-food interaction, DFI) が懸念されつつある。例えば、上述した P-gp の基質薬物は、他の基質薬物との相互作用によりその吸収性が増大し、様々な副作用を生じる危険性を有している。一方、P-gp を含む複数のトランスポーターに認識される薬物の場合、その吸収性や相互作用はより複雑化する可能性がある。例えば、非代謝性の β_1 受容体遮断薬 talinolol は、グレープフルーツジュース (grapefruit juice, GFJ) の併用により、ラットにおいては AUC の上昇が、ヒトにおいては AUC の低下が報告されている。著者は、本現象の要因が P-gp (multidrug resistance, MDR1/Mdr1a) と OATP/Oatp (organic anion transporting polypeptide) の相殺的な関与によると推察し、その影響について詳細な検討を試みた。

まず、MDR1/Mdr1a 発現 LLC-PK1 細胞により talinolol がヒト MDR1 およびラット Mdr1a の基質となることが示され、さらに、OATP/Oatp 発現

oocyte によりヒト OATP1A2, OATP2B1 およびラット Oatp1a5 の基質となることが明らかとなった^{4,5)}。一方、Oatp1a5 による talinolol 輸送は GFJ の主成分である naringin により阻害され、その IC_{50} 値は $12.7 \mu\text{M}$ と算出された。また、Mdr1a による talinolol 輸送も naringin により阻害され、その IC_{50} 値は $603.8 \mu\text{M}$ と算出された。したがって、低濃度の naringin により Oatp1a5 が阻害され吸収性が低下し、高濃度の naringin により Oatp1a5 に加え Mdr1a も阻害され吸収性が回復する可能性が考えられた。そこで次に、talinoalol の消化管吸収に及ぼす Oatp1a5 の影響を観察することを目的に、種々濃度の naringin 併用下におけるラット小腸膜透過性の評価を試みた (図 5)。その結果、talinoalol の小腸膜透過性は低濃度 ($200 \mu\text{M}$) naringin 存在下で有意に低下し、高濃度 ($2000 \mu\text{M}$) naringin 存在下で有意に上昇した。さらに、実際の GFJ の影響を観察することを目的として、市販の GFJ (naringin 含有量は $1198 \mu\text{M}$ であった) を用いて同様の検討を試みた (図 6)。その結果、talinoalol のラット小腸膜透過性は GFJ 存在下で有意に上昇した一方で、6 倍希釈 GFJ (naringin 含有量は約 $200 \mu\text{M}$ となる) 存在下では有意に低下し、naringin 濃度依存的な影響と矛盾のない結果が得られた。また、*in vivo* 経口投与後における talinoalol の AUC も同様な naringin 濃度依存的な変動傾向が観察されたことから、talinoalol の吸収過程

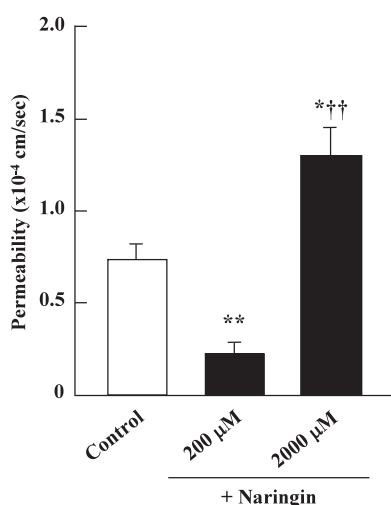


図 5 Talinolol のラット小腸膜透過性に及ぼす naringin の影響
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs control. † $p < 0.01$, vs $200 \mu\text{M}$ naringin.

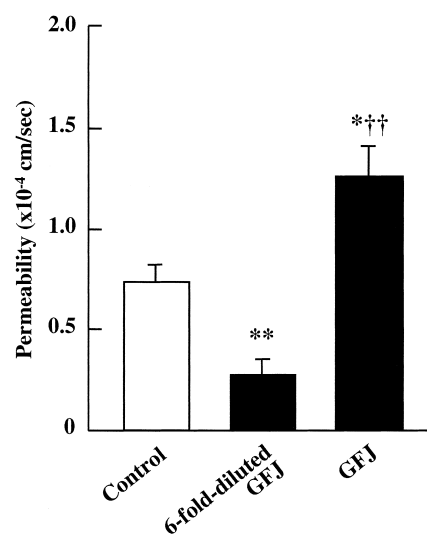


図 6 Talinolol のラット小腸膜透過性に及ぼす GFJ の影響
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs control. † $p < 0.01$, vs 6-fold-diluted GFJ.

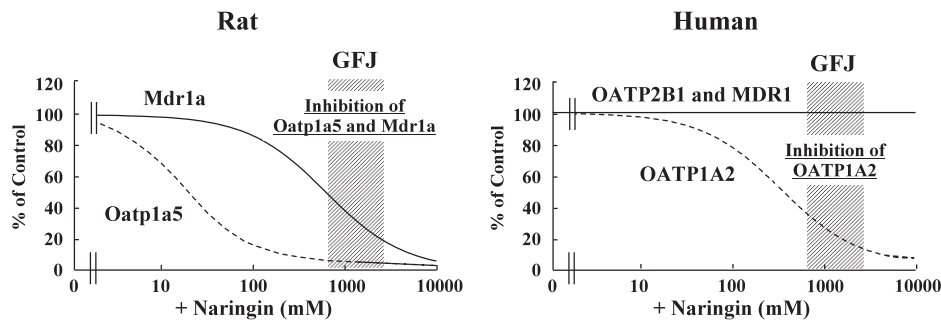


図7 OATP/Oatp および MDR1/Mdr1a を介した talinolol 吸収に及ぼす GFJ の影響とその種差

において Oatp1a5 と Mdr1a が相殺的に機能している可能性が示唆された。

一方、OATP1A2、OATP2B1 および MDR1 を介した talinolol 輸送に対する naringin の阻害効果は、その IC_{50} 値としてそれぞれ $342.7 \mu\text{M}$ 、 $>2000 \mu\text{M}$ および $>2000 \mu\text{M}$ と算出された。したがって、実際に市販 GFJ 中の naringin 濃度が $1198 \mu\text{M}$ であったことを考慮すると、GFJ の併用によりラットでは Mdr1a および Oatp1a5 が阻害されることにより吸収性が上昇し、ヒトでは OATP1A2 のみが阻害されることにより吸収性が低下する可能性が推察できる(図7)。すなわち、talinoalol-GFJ 間相互作用に見られるヒト/ラット間種差は naringin の親和性 (IC_{50} 値) の違いに起因していると考えられた。

以上、著者は、モデル化合物として talinolol を用い、薬物の消化管吸収において P-gp と OATP/Oatp がその影響を相殺的に関与している可能性を示すと共に、それらの影響についてヒトと動物との間に種差が存在することを明らかにした^{4,5)}。本研究の成果から、*in vitro* による単純な P-gp 評価のみからでは、試験化合物の *in vivo* 吸収性やそれに対する P-gp の影響を定量的に予測することは困難となる可能性が示唆された。したがって、より精度の高い消化管吸収性予測を行うためには、efflux トランスポーターのみならず OATP/Oatp のような influx トランスポーターの影響を含めた総合的な消化管吸収動態解析が重要と考えられる。

5. 終りに

はじめに述べたように、著者の最終的な目的である「influx/efflux トランスポーターの影響を総合評価できるヒト経口吸収性予測システムの提唱」は、医薬品開発の効率化あるいは DDI や DFI など

した医薬品適正使用に対し大きく貢献できる壮大なテーマと言える。今後は、このテーマを相手にスパーゴールを決めるため、華麗なドリブルとパスワーク、イマジネーション豊かな戦術を駆使しながら、ファンタスティックに研究を進めていきたい。

終わりに臨み、本稿で紹介した研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 山下伸二教授、金沢大学薬学系 玉井郁巳教授ならびに Mainz 大学 Peter Langguth 教授に深甚なる謝意を表します。

引用文献

- 1) Y. Shirasaka, T. Sakane, S. Yamashita, Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 553–565 (2008).
- 2) Y. Shirasaka, Y. Masaoka, M. Kataoka, S. Sakuma, S. Yamashita, Scaling of *in vitro* membrane permeability to predict P-glycoprotein-mediated drug absorption *in vivo*, *Drug. Metab. Dispos.*, **36**, 916–922 (2008).
- 3) Y. Shirasaka, R. Konishi, N. Funami, Y. Kadowaki, Y. Nagai, T. Sakaeda, S. Yamashita, Expression levels of human P-glycoprotein in *in vitro* cell lines: Correlation between mRNA and protein levels for P-glycoprotein expressed in cells, *Biopharm. Drug Dispos.*, **30**, 149–152 (2009).
- 4) Y. Shirasaka, Y. Li, Y. Shibue, E. Kuraoka, H. Spahn-Langguth, Y. Kato, P. Langguth, I. Tamai, Concentration-dependent effect of naringin on intestinal absorption of β_1 -adrenoceptor antagonist talinolol mediated by P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide (Oatp), *Pharm. Res.*, **26**, 560–567 (2009).
- 5) Y. Shirasaka, E. Kuraoka, H. Spahn-Langguth, T. Nakanishi, P. Langguth, I. Tamai. Species difference in the effect of grapefruit juice on intestinal absorption of talinolol between human and rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **332**, 181–189 (2010).