

## 《若手研究者紹介》



## 創薬支援のできる薬物動態学研究者を目指して

荒 川 大\* Hiroshi Arakawa

高崎健康福祉大学薬学部薬理学系生物薬剤学研究室

現在筆者は高崎健康福祉大学薬学部生物薬剤学研究室（萩原琢男教授主宰）に助教として所属し、主に薬物動態におけるトランスポーターの役割を研究している。筆者の研究生活は、大学4年次より当時東京理科大学薬学部の教授であった玉井郁巳教授主宰の研究室に所属したことから始まった。東京理科大学大学院卒業後、金沢大学へ移った玉井先生を追いかけて博士課程へ進み、現在でも大学で研究を続けている。かれこれ研究を始めてまだ7年程であるが、色々なことがあったように思う。若輩者の経験ではあるが、本稿では筆者の研究経歴と共に、今後行いたいことを紹介したいと思う。

## 1. 卒業研究

筆者の研究生活は、玉井先生の研究室に所属することから始まった。トランスポーター研究では有名な玉井先生の研究室に入ったからには、最初から薬剤学関連の研究職を目指していたと思われるかもしれない。実のところ将来やりたいことがなかなか見つからず、就職がよいという噂と薬剤学を専攻すれば研究だけでなく臨床にも行きやすいのではないかといういい加減な選択理由であった。ただとにかく何かを身につけたいという思いがあり、自分を鍛える意味で厳しいという噂があった研究室に所属した。最初に触れることになったテーマは、「Involvement of organic anion transporting polypeptide 1a5

(Oatp1a5) in the intestinal absorption of endothelin receptor antagonist in rats」だった<sup>1)</sup>。薬物の消化管吸収、特に生体膜透過を考える際に、薬物の物理化学的要因に依存する単純拡散以外にも、トランスポーターを介した輸送系が存在する。有名などころでは薬物排出を担うP-糖タンパク質が知られているが、吸収方向にも輸送担体が存在する。現在では抗アレルギー薬フェキソフェナジンの消化管吸収に有機アニオントランスポーターOATP2B1 (Organic Anion Transporting Polypeptide 2B1) が関わっており、アップルジュースと共に服用すると吸収が低下することは市民権を獲得しているように思われるが、当時は薬物吸収にトランスポーターが関わっているかについてあまり知られていなかった。ともあれアニオン性の化合物のラットにおける消化管吸収にトランスポーターが介在しているかについて、Ussing Chamber 法や単離小腸上皮細胞を用いて調べた。論文を読んでも、あっさりと結果が出たような気になるが、評価系の構築や結果の妥当性評価など問題が山積みだった。玉井先生や大学院生の先輩方と相談しながら問題を解決していったことは今でもよい思い出である。幸運にしてこの研究は *Pharmaceutical Research* に掲載されたが、このときに試行錯誤してようやく出せた結果であることは、きっと忘れないと思う。

## 2. 修士課程研究

無事に薬剤師国家試験を通過し、修士課程における研究室生活が始まった。学部生時代のテーマは一段落したため、新たにキノロン系抗菌薬の消化管吸収というテーマで研究が始まった。キノロン系抗菌

\*2007年東京理科大学薬学部卒業。2009年同大学大学院薬学研究科修了。2013年金沢大学大学院自然科学研究科修了、博士(薬学)取得。同年高崎健康福祉大学薬学部助教。趣味：おいしい食べ物を求めて町を巡ること。読書、映画鑑賞。連絡先：〒370-0033 群馬県高崎市中大類町60 E-mail: arakawa@takasaki-u.ac.jp

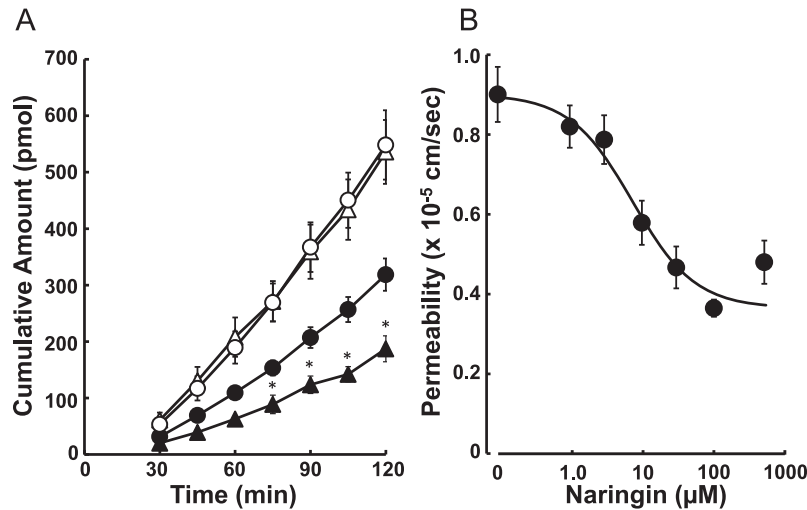


Fig. 1. Effect of naringin on ciprofloxacin transport by Ussing-type chamber method in rat ileum. (A) Mucosal-to-serosal and serosal-to-mucosal permeation of ciprofloxacin (10 mM) was calculated from sample in receiver-side by Ussing-type chamber method in rat ileum at pH 7.4 and 37°C. Circle and triangle symbols represent transported ciprofloxacin in the absence or in the presence of naringin (500 mM), respectively. Open and closed symbols represent serosal-to-mucosal and mucosal-to-serosal transport of ciprofloxacin, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 3–5) and \* indicates a significant differences from mucosal-to-serosal transport of ciprofloxacin in the absence of naringin ( $p < 0.05$ ) by Student's *t*-test. (B) Concentration dependent effect of naringin on absorptive permeability of ciprofloxacin was measured by Ussing-type chamber method in rat ileum. Mucosal-to-serosal transport of ciprofloxacin was performed in the presence of 1–500 mM naringin at pH 7.4 and 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 3–6).

薬は構造式の中にアニオンとカチオンを持つ両性アニオンである。これまでにその消化管吸収にはなんらかのトランスポーターが関与すると考えられていたが、その実態は不明であった。生物薬剤学研究室では以前にヒト消化管 Caco-2 細胞を用い、高活性と低活性のサブクローン株に発現するトランスポーターをマイクロアレイで比較することで、OATP1A2 がレボフロキサシンなどのキノロン系抗菌薬の取り込みを行っていることを示していた。筆者の担当した研究は、キノロン抗菌薬の一つであるシプロフロキサシンの消化管吸収に OATP がどこまで関与するかというテーマだった<sup>2)</sup>。この研究は摂南大学大学院の博士課程を修了し、生物薬剤学研究室に助教として就任した白坂善之先生と共にこのテーマに取り組んだ。テーマをもらって半年後、生体膜シンポジウムで研究成果を発表させて頂いた。初めての口頭発表であったにもかかわらず、準備が前日の夜 12 時までできておらず、そこから原稿作成のやり直しと発表練習を朝 4 時まで行い、朝一番で発表をした。発表自体はなんとか成功し、玉井先生や研究室の仲間からもほめてもらったが、行き当たりばったりな

発表はこれから控えようと思った。学会発表も終わり、自分では何か掴みかけている気がした。将来は薬剤師か、大学に進学して研究を続けようか迷っていた。その矢先、玉井先生の金沢大学への異動が急に決まった。筆者たち学生が異動のことを知らされたのは年末で、すぐに移動することが難しかったため東京理科大学製剤学研究室(当時芳賀信教授主宰)へ移った。テーマは共同研究という形で引き続きキノロン系抗菌薬の消化管吸収を行わせて頂いた。製剤学研究室では発現系評価とラット消化管膜透過の検討をした (Fig. 1)。研究環境が異なるため実験系の立ち上げなど、芳賀先生には多くのご迷惑をおかけしたが、結果として論文としてまとめることができた。修士課程で研究に楽しみを見出すことができたため、博士課程へ進学することにした。

### 3. 博士課程研究

博士課程から金沢大学大学院の薬物動態学研究室(玉井郁巳教授主宰)へ進学した。博士課程のテーマは修士から引き続き、消化管吸収、特に薬物食物間相互作用にしたいと思い、テーマを進めていた。と

ころが、なかなか思うような結果が出ず、ほとんど何の結果も得られないまま1年が過ぎようとしていた。思い切ってテーマを変更し、かねてから興味があったがん増殖におけるトランスポーターの役割について准教授の中西猛夫先生とともに研究を始めた。これまでOATPについて研究していたこともあり、OATPの基質の一つであるデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体(DHEAS)に着目した。前立腺がんは基本的には男性ホルモン受容体の活性化に依存した増殖を行う。そのため臨床では精巣のテストステロン合成を阻害するためLH-RH(性腺刺激ホルモン放出ホルモン)アナログ製剤を投与する。ところがある程度の期間後、この療法に抵抗性を持つ去勢抵抗性前立腺がんCRPCへと進行し、転移能の増加や化学療法耐性が上昇する。しかし、CRPCに対する有効な療法は確立されておらず、効果的な標準治療の開発が急務とされる。CRPCにおいても男性ホルモン受容体の活性が観察されることから、何らかのメカニズムで男性ホルモンを合成しているのではと考えた。先ほど紹介したDHEASは副腎から分泌されるホルモン前駆体であり、硫酸抱合の外れたDHEAは男性ホルモンの前駆体になることが知られていた。このため、前立腺がんは男性ホルモン遮断療法中にOATPの発現上昇によりDHEASを効率的に取り込み、細胞内で男性ホルモンを合成しているという仮説を立てた。この仮説を実証するためにはホルモンが無い状態で前立腺がん細胞におけるOATPの発現量が上昇することを示す必要がある。活性炭処理を行ったウシ胎児血清(FBS)を用いていることにより、ステロイドなど脂溶性ホルモンを除くことができるため、活性炭処理を行ったFBSではOATPの発現が上昇するかについて調べた。これについては幸運なことに、OATPの発現が上昇する結果がすぐに得られた。次に、ホルモン枯渇状態におかれた前立腺がん細胞が、DHEASにより増殖促進が行われるかについて調べた。結果として、仮説通りにDHEASは前立腺がん細胞の増殖を促進することが示された(Fig. 2)。実験自体は単純だが、実はなかなかよい実験結果が得られなかった。仮説に従う傾向は得られるものの、良い結果が得られるときと、得られないときがあったのだ。今思えば、細胞操作のハンドリングや、使用している細胞が継代を繰り返すことにより性質が変わりやすいも

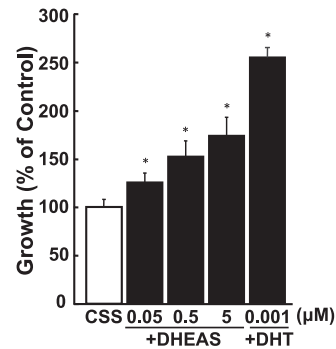


Fig. 2. DHEAS-induced cell proliferation in LNCaP cells. LNCaP cells cultured in RPMI1640 with 10% Charcoal Stripped FBS (CSS) were seeded at 8,000 cells each in the presence or absence of androgen. Growth of LNCaP cells was monitored by means of SRB assay for up to 7 days. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. (n=6), and \* indicates a significant difference from the cell growth of LNCaP cultured in RPMI1640 supplemented with 10% CSS ( $p < 0.05$ ) by Student's *t*-test.

のであったことが原因であった。それらを見直すことで安定した結果が得られるようになったが、それまでは悶々とした毎日を送っていた。実験がうまく進まないながらも、2009年4月に台南で開催された4th Asian Pacific ISSX (APISSX)でポスター発表する機会を得た。初めての海外の学会でモチベーションは上がり、自分の実力に不安はあったが体当たりで参加した。結果、pre-doctorial部門で第1位の発表賞を頂くことになり、この受賞が筆者にとって今でも自信につながっているように思える。結果的にこの研究はBiochemical Pharmacologyに掲載された<sup>3)</sup>。その他がん研究では乳がんにおけるOATPの役割や、卵巣がん細胞におけるアミノ酸トランスポーターの役割等について関わらせて頂いた<sup>4,5)</sup>。

ところで、博士課程に所属していた薬物動態学研究室は国際交流も盛んで、どのタイミングでも一人は外国人研究者がいた。特に、筆者の隣の席には中国人の大学院生が座っており、彼は日本語が話せなかったため度々英語でdiscussionしていたことは懐かしい。おかげで英会話はなんとか話せるようになり、この経験がAPISSXでの受賞につながったことは疑いない。

#### 4. 現在、そして今後の研究

現在、高崎健康福祉大学薬学部の生物薬剤学研究室の助教に着任し、引き続きトランスポーターを中

心として薬物動態の研究を行っている。最近ではトランスポーターを創薬に役立てることを目的としている。一つの例として、ペプチドトランスポーター PEPT1 (Peptide Transporter 1) の非代謝性プローブの探索を行っている。PEPT1は消化管に強い発現がみられ、構造式中のペプチド結合を認識するため、薬物にペプチドを結合させることでドラッグデリバリーに応用が可能なトランスポーターである。PEPT1を評価する際に、放射標識体の $^3\text{H}$ Glycylsarcosin (Gly-Sar)がよく使われている。 $^3\text{H}$ Gly-Sarは非代謝性かつ測定も簡便という利点を持つが、放射標識体のためヒトにおける使用に制限があり、また基質認識性がそこまで高くないという欠点を持つ。そこで筆者らは*in vivo*で検討可能な非放射標識体L-Phenylalanyl- $\Psi$ [CS-N]-L-Alanine (Phe- $\Psi$ -Ala)のPEPT1認識性について調べた。その結果Phe- $\Psi$ -AlaはPEPT1に対して高い認識性を示し、また代謝的に安定であることが示された。このため薬物間相互作用等の解析にPhe- $\Psi$ -Alaが有用なツールになりうることを示唆された。さらにこの研究を基盤として、ある刺激を受けた後に短時間で生じるPEPT1のトラフィック変化について研究している。この他にもヒト肝細胞の三次元培養法を利用した代謝試験や毒性試験の構築など創薬に向けた検討を行っている。今後は薬物動態の知識を応用したツールを世に発信していきたい。

## 5. おわりに

本稿では筆者がこれまでに行ってきた研究生活について簡単に紹介させて頂いた。思い返せばいつも真っすぐ進むというよりは右往左往し、試行錯誤し

ながら進んでいたように思う。ただそれでもやってこられたのは、ご指導くださった諸先生方や多くの先輩、後輩方のおかげであったと思う。今後も壁にぶつかりながらも粘り強く研究を続け、その成果や経過を通じて多くの人々と関わっていききたいと思う。

## 引用文献

- 1) T. Tani, L. K. Gram, H. Arakawa, A. Kikuchi, M. Chiba, Y. Ishii, B. Steffansen, I. Tamai, Involvement of organic anion transporting polypeptide 1a5 (Oatp1a5) in the intestinal absorption of endothelin receptor antagonist in rats, *Pharm. Res.*, **25**, 1085–1091 (2008).
- 2) H. Arakawa, Y. Shirasaka, M. Haga, T. Nakanishi, I. Tamai, Active intestinal absorption of fluoroquinolone antibacterial agent ciprofloxacin by organic anion transporting polypeptide, Oatp1a5, *Biopharm. Drug Dispos.*, **33**, 332–341 (2012).
- 3) H. Arakawa, T. Nakanishi, C. Yanagihara, T. Nishimoto, T. Wakayama, A. Mizokami, M. Namiki, K. Kawai, I. Tamai, Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions, *Biochem. Pharmacol.*, **84**, 1070–1077 (2012).
- 4) T. Maeda, M. Irokawa, H. Arakawa, E. Kuraoka, T. Nozawa, R. Tateoka, Y. Itoh, T. Nakanishi, I. Tamai, Uptake transporter organic anion transporting polypeptide 1B3 contributes to the growth of estrogen-dependent breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **122**, 180–185 (2010).
- 5) X. Fan, D. D. Ross, H. Arakawa, V. Ganapathy, I. Tamai, T. Nakanishi, Impact of system L amino acid transporter 1 (LAT1) on proliferation of human ovarian cancer cells: a possible target for combination therapy with anti-proliferative aminopeptidase inhibitors, *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 811–881 (2010).