

## 薬学研究科・生物薬剤学研究室

### 1. 研究課題名

「医薬シーズの薬物動態特性の最適化」

### 2. 研究メンバー

岩城 正宏 近畿大学薬学部生物薬剤学研究室・教授

川瀬 篤史 近畿大学薬学部生物薬剤学研究室・講師

### 3. 研究成果

医薬シーズによる治療効果を向上させ、副作用を低減させるためには医薬シーズ摂取後の有効成分の体内動態について明らかにするとともに、効果部位への送達の最適化を行うことが重要である。薬物の体内動態を決定する因子として、チトクロム P450 (CYP)などの薬物代謝酵素以外に、最近では種々のトランスポーターの重要性が指摘されている。また、これらの因子は毒性発現の過程においても大きく関与していることが知られている。医薬シーズの薬物動態特性の最適化を考えるうえで、薬物の吸収に関与する薬物の膜透過性、代謝的安定性だけではなく、毒性の回避などを考慮する必要がある。これらはいずれも小腸、肝臓や腎臓に発現する CYP およびトランスポーターの機能と大きく関わっている。今回、絶食または脂質異常症のトランスポーター発現変動とそれが薬物動態へ及ぼす影響について検討を行ったので以下に成果の概略を示す。

<絶食および脂質異常症のトランスポーターおよび薬物動態に対する影響>

薬物動態を変動させる因子のひとつとして病態や食事が知られているが、これらの因子が CYP やトランスポーター機能に与える影響とそれに伴う薬物動態変動の関連については不明な点が多い。そこで、ラットを用い、絶食または脂質異常症モデルでのトランスポーター変動と薬物動態への影響について検討を行った。薬物動態変動の検討には肝への分布および胆汁排泄を評価することができる *in situ* 肝還流法を用いた。本研究では、基質の肝内への能動輸送に関わるトランスポーターおよび胆汁中への排出に着目し検討を行うため、肝内で代謝を受けず、トランスポーターによる輸送の寄与が大きい高脂血症治療薬プラバスタチン (PV)をモデル薬物として選択した。PV は脂溶性が低い有機アニオン系薬剤であり、血管側から肝臓内への輸送には organic anion transporter polypeptide (OATP) 1A1, 肝臓内から胆汁中への輸送には multidrug resistance protein (MRP) 2 がそれぞれ関与している。

モデル動物の作成は、7~8 週齢雌性 SD ラットを 3 群 (Control 群, Fasting 群および Hyperlipidemia 群)に分け、Fasting 群は処置 2 日前に絶食させ、Hyperlipidemia 群は 2 週間高脂肪食 (97.5% MF, 2% コレステロール, 0.5% コール酸)を与えた。Fig. 1 に体重および肝重量の変化を示した。体重は Fasting 群で有意に減少し、Hyperlipidemia 群で有意に上昇した。一方、肝重量は Fasting 群で有意な減少が、Hyperlipidemia 群で有意に増加した。ついで、Fasting 群およ

びHyperlipidemia群の血中コレステロール値を測定した (Fig. 2)。Fasting群では、有意な血中総コレステロールの低下が認められ、ケトン体の増加が見られた。また、Hyperlipidemia群では、総コレステロール値およびLDLコレステロール値の上昇とHDLコレステロール値の低下が認められた。

次に絶食時に肝臓のOatpおよびMrp2 mRNA発現量の変動をPCR法により検討した (Fig. 3)。Fasting群では、Oatp1a1 mRNA発現量が有意に増大 (約1.5倍) し、反対にMrp2 mRNA発現量は有意に減少 (約0.5倍) した。さらに、種々のトランスポーターおよびCYPを転写レベルで調節していることが知られている核内レセプター (NR) [constitutive androstane receptor (CAR)およびpregnane X receptor (PXR)]を測定したが、変化は認められなかった。これらの結果から、絶食によるトランスポーターのmRNA変動はCARやPXRといったNR非依存的に変動していることが示唆された。次にOatp1a1とMrp2についてタンパク質発現量をControl群またはFasting群ラットから調製した膜タンパク質を用いウエスタンブロッティング法により測定した (Fig. 4)。両トランスポーターともmRNA発現量変動を反映してOatp1a1では有意に上昇し、Mrp2では有意に低下した。このことより絶食によりPVの肝内取り込みの増加と胆汁排泄の減少が生じる可能性が示された。そこで、PVの肝内動態の変動を調べるため*in situ*肝還流を常法により検討した。還流液中のPVの初濃度は10 μMまたは25 μMとし、1時間還流を行い、経時的に還流液中および胆汁中のPVをHPLC法により測定した。HPLC条件としてカラムはInertsil ODS-2 (4.6 x 250 mm, 5 μm)、移動相はメタノール : 水 :

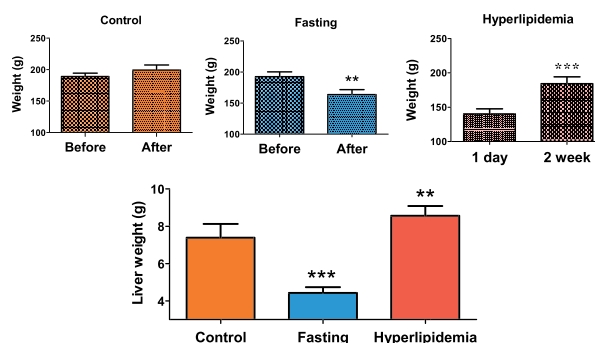


Fig. 1. 絶食によるタンパク質異常による体重と肝重量への影響

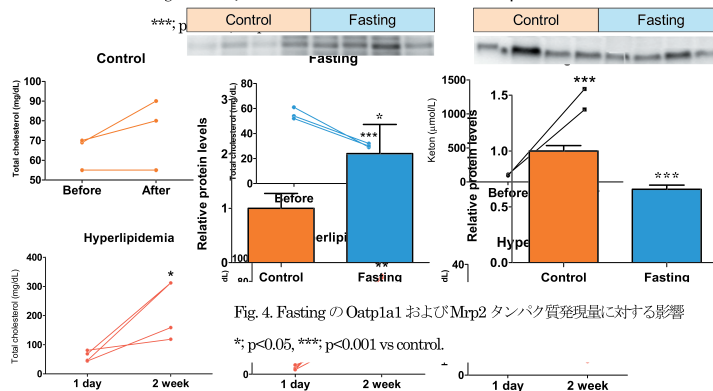


Fig. 4. FastingのOatp1a1およびMrp2タンパク質発現量に対する影響

Fig. 2. Fasting群とHyperlipidemia群における血中コレステロール濃度

\*\*\*; p<0.001, \*\*; p<0.01 and \*; p<0.05 vs before or 1 day.

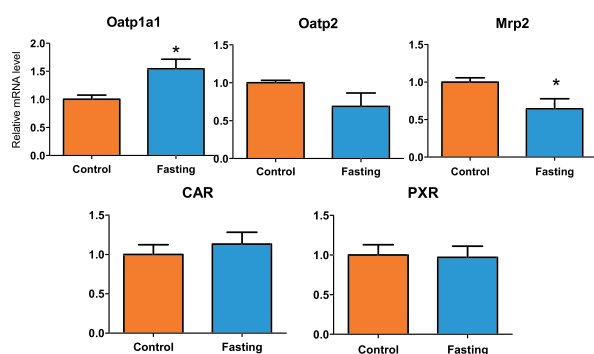


Fig. 3. Fastingのトランスポーターおよび核内レセプターmRNA発現量に対する影響

\*; p<0.05 vs control.

酢酸 : トリエチルアミン = 600:400:1:1 (v/v), 流速 0.7 mL/min, カラム温度 35 °C, 検出波長をUV 238 nmとし、内部標準物質として imipramineを用いた。還流液中のPV濃度推移を測定し (Fig. 5aおよび6a), これらのデータをモーメント解析により得られた速度論的パラメーターをTable 1に示した。Fastingにより肝

取り込みに関与するOatp1a1 発現が上昇しているにも関わらず、還流液中からのPVの消失速度定数 ( $k_d$ )および消失クリアランス (CL)は変化が認められなかった。一方、Mrp2 発現の減少にともなって、特に 10 mMのPV濃度において顕著に低下した (Fig. 5bおよび 6b)。Hyperlipidemia群についても同様に肝取り込み過程が影響すると考えられる還流液からのPV消失にControl群と差異は認められなかった。一方、Mrp2 による胆汁排泄は増大した (Fig. 6)。今回の結果から、絶食および脂質異常症モデルラットにおけるOatp1a1 の増減は、PVの消失に影響しないことが判明した。この原因は明らかでないが、肝重量の変化にともない全体の取り込み活性は変化していないためと考えられる。これは肝重量で補正した消失クリアランス ( $CL_{nor}$ ) が絶食では増大し、脂質異常症では減少していることから支持される。また、PVの肝から還流液中への排出に関与する輸送が存在し、それが全体のクリアランスを打ち消している可能性も考えられる。この点については今後検討する必要がある。今回のMrp2 タンパク発現量の検討では、膜タンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法により評価したが、近年、裏打ちタンパク質であるRadixinがMrp2 の膜局在と機能において重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、肝臓の凍結切片を作製し、免疫組織染色法により膜におけるMrp2 分布について検討を行った (Fig. 7)。Fasting群ではControl群に比べ、Mrp2 とRadixinの膜上での共局在が減少していることが観察され、Fasting群でのMrp2 発現量低下とともに膜での局在低下によりPVの胆汁中排泄が低下したものと考えられた。

以上のことより、絶食および脂質異常症において Oatp1a1 や Mrp2 発現変動し、これら基質となる薬物の薬効および副作用に影響する可能性があり、今後さらに検討を進める必要があると考えられる。

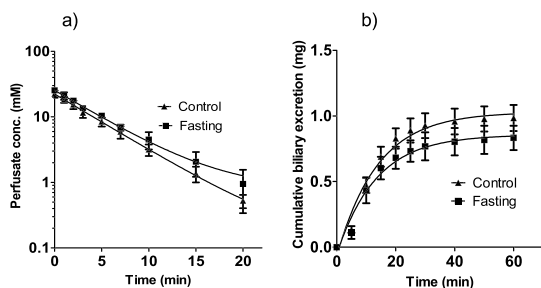


Fig. 5. ControlおよびFastingラットにおける25  $\mu$ M PV肝還流時のa) 還流液濃度およびb) 累積胆汁排泄量

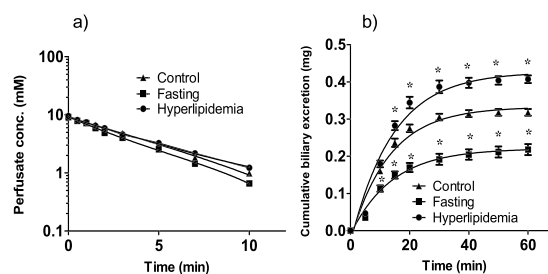


Fig. 6. Control, Fasting およびHyperlipidemia ラットにおける10  $\mu$ M PV肝還流時のa) 還流液濃度およびb) 累積胆汁排泄量

\*;  $p < 0.01$  vs control.

Table 1. 還流実験の結果より算出した各パラメーター値

Parameter	Init. Conc.	Control	Fasting	Hyperlipidemia
$k_{el}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	10 $\mu\text{M}$	0.23 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02
	25 $\mu\text{M}$	0.19 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02	-
AUC ( $\text{ng/mL} \cdot \text{min}$ )	10 $\mu\text{M}$	18.5 $\pm$ 1.0	15.6 $\pm$ 1.2	19.6 $\pm$ 2.0
	25 $\mu\text{M}$	57.6 $\pm$ 8.6	65.0 $\pm$ 2.7	-
$Vd_{ss}$ (mL)	10 $\mu\text{M}$	105 $\pm$ 4.0	110 $\pm$ 9.0	114 $\pm$ 4.0
	25 $\mu\text{M}$	100 $\pm$ 7.0	93.0 $\pm$ 13.0	-
CL ( $\text{mL/min}$ )	10 $\mu\text{M}$	24.1 $\pm$ 1.3	29.8 $\pm$ 3.1	23.0 $\pm$ 2.2
	25 $\mu\text{M}$	19.7 $\pm$ 2.9	17.2 $\pm$ 0.7	-
$CL_{\text{nor}}$ ( $\text{mL/min/liver g}$ ) <sup>#</sup>	10 $\mu\text{M}$	3.74 $\pm$ 0.27	5.82 $\pm$ 0.32 <sup>*</sup>	2.66 $\pm$ 0.31 <sup>*</sup>
	25 $\mu\text{M}$	2.65 $\pm$ 0.21	3.81 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>	-

<sup>#</sup>: Clearance normalized by liver weight  
<sup>\*</sup>: p<0.05 vs control.

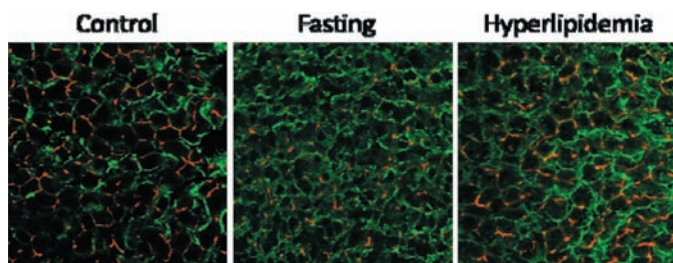


Fig. 7. Fasting およびHyperlipidemia ラット肝臓における MRP2 およびRadixin の局在 赤; MRP2, 緑; Radixin