

clinically administered chemotherapeutic drugs. By far the best known major drug transporters, that is, ABCB1 (P-glycoprotein or MDR1), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2, cMOAT) and ABCG2 (BCRP), have been characterized in detail with respect to their structure and function. These drug transporters belong to the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family.

ATP-binding Cassette Transporter Genes and Proteins

ABC proteins form one of the largest protein families encoded in the human genome. More than 48 human ABC protein genes have been identified and sequenced (Klein *et al.*, 1999). It has been reported that mutations of ABC protein genes are causative in several genetic disorders in humans (Dean *et al.*, 2001). Many human ABC proteins are involved in membrane transport of drugs, xenobiotics, endogenous substances or ions, thereby exhibiting a wide spectrum of biological functions. Based on the arrangement of molecular structure components, that is, nucleotide-binding domains and topologies of transmembrane domains, hitherto reported human ABC proteins are classified into seven different subfamilies (A–G). The HUGO Human Gene Nomenclature Committee has developed a new system of nomenclature for the human ABC transporter family. The nomenclature scheme was implemented in 1999, and detailed information is available on the HGNC Gene Family Nomenclature website (see Web Links).

The primary structures of the transmembrane domains differ significantly among ABC transporters and have been recognized as the main determinants of substrate specificity. The ATP-binding cassettes, on the other hand, share an overall sequence identity of approximately 30%. They contain three core consensus motifs, known as Walker A, Walker B and Signature C (Higgins, 1992; Klein *et al.*, 1999), which are essential for ATP binding. The high conservation of the ATP-binding cassettes in the rapidly growing list of discovered ABC transporters suggests that these membrane proteins may use similar mechanisms to execute their transport activities.

ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1)

Human P-glycoprotein (multidrug resistance 1, MDR1) (now ABCB1) was identified because of its overexpression in cultured cancer cells associated with an acquired cross-resistance to multiple anticancer drugs (Ling, 1997). While P-glycoprotein was initially thought to play a role in modulating cellular perme-

ability (the 'P' stands for permeability) to drugs, it was later demonstrated to be an ATP-dependent efflux pump of hydrophobic anticancer drugs including colchicine, doxorubicin, daunorubicin, vincristine and VP16. Historically, P-glycoprotein provided one of the mechanistic explanations for the phenomenon of multidrug resistance. The function of human P-glycoprotein as a mechanism of multidrug resistance has been extensively investigated (Ambudkar *et al.*, 1999). It was assumed that P-glycoprotein functions as a membrane pore to export intracellularly located substrate. Subsequently, another model was proposed in which P-glycoprotein translocates a substrate from the inner leaflet side of the membrane to the outer leaflet side, thus functioning as a flippase or 'membrane vacuum cleaner'.

Molecular structure

Mammalian P-glycoproteins are single peptide chain, integral membrane proteins of an approximate length of 1280 amino acid residues. The apparent molecular weights of mature P-glycoproteins range from about 130 to 180 kDa, depending on the species and cell type in which they are expressed. P-glycoproteins are composed of two homologous halves, each of which consist of an *N*-terminal, hydrophobic membrane-associated domain (approximately 250 amino acid residues) and a *C*-terminal, hydrophilic nucleotide-binding fold (approximately 300 amino acid residues). The topology of P-glycoproteins is schematically illustrated in Figure 1. The plasma membrane associated domains in the two halves of P-glycoprotein

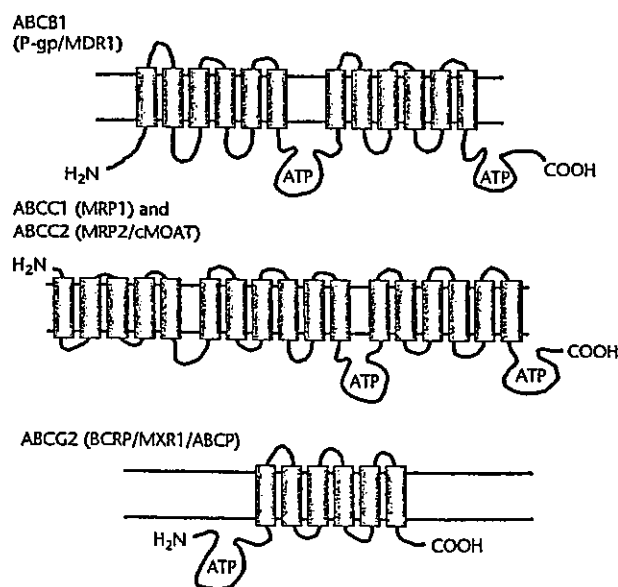


Figure 1 Schematic illustration of ABCB1 (P-glycoprotein (P-gp)/MDR1), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2/cMOAT) and ABCG2 (BCRP/MXR1/ABCP).

each consist of six transmembrane domains, which are followed by an intracellular ATP-binding cassette.

In order to elucidate the transport mechanism and structure of P-glycoproteins, mutational analysis was carried out using site-directed mutagenesis. A relatively large number of mutations alter the substrate specificity of the transporter, in particular those in transmembrane domains 5, 6 and 12. Accordingly, photoaffinity labeling studies indicated that such domains are probably of major importance in substrate binding.

Gene structure

Human P-glycoproteins are encoded by two genes *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1)* (formerly known as both *MDR1* and *PGY1*) and *ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 (ABCB4)* (formerly *MDR2*, *MDR3* and *PGY3*) adjacently located at chromosomal region 7q21. *ABCB1* encodes a drug transporter directly associated with multidrug resistance to cancer drugs, whereas *ABCB4* encodes the flippase translocating phospholipids. Three genes are present in rodents: *Abcb1a*, *Abcb1b* and *Abcb4*. In the mouse, the genes are clustered on chromosome 5 whereas they are located at chromosomal region 4q11–12 in the rat. In rodents, both *Abcb1a* and *Abcb1b* functionally correspond to *ABCB1* in humans.

Transcription of the *ABCB1* gene appears to be regulated by multiple factors. For example, the proximal promoter region has a GC-rich region, at approximately –100 to –120 base pairs (bp) from the transcriptional start codon, which contains a site responsible for the repression of transcription. Also, basal transcription appears to involve a consensus site that binds NF-Y transcription factors at a Y box (inverted CCAAT box) between –70 and –80 bp. In addition, a binding site for SP-1 and members of the early growth response (EGR) family of transcriptional factors is present that overlaps with the NF-Y consensus site. A 13 bp region around the initiation site involved in accurate initiation of the transcription has also been identified. *ABCB1* is expressed at a high frequency in tumor cells and both v-H-Ras and mutant forms of p53 have been shown to activate the *ABCB1* promoter. On the other hand, *MYC* and *MYCN* expression is apparently inversely correlated with *ABCB1* expression. In addition to such transcriptional regulation, the stability of messenger ribonucleic acid (mRNA) and posttranslational regulation are also considered important in the regulation of *ABCB1* expression.

ABCB1 in normal tissues

It is important to know that *ABCB1* is expressed not only in cancer cells but also in many normal tissues.

For example, it is located in the apical domain of the enterocytes of the gastrointestinal tract (jejunum and duodenum) and limits the uptake and absorption of drugs and other substrates from the intestine into the systemic circulation by excreting substrates into the gastrointestinal tract. Likewise, the expression of *ABCB1* on the luminal membrane of capillary endothelial cells of the brain restricts drug distribution into the central nervous system. This function appears to be very important in protecting the central nervous system from the attack of toxic compounds. Evidence for the protective role of *ABCB1* in the blood–brain barrier has been demonstrated in several studies using *Abcb1a* knockout mice (Schinkel *et al.*, 1994). A similar protective role to limit the distribution of potentially toxic xenobiotics into tissues was suggested for *ABCB1* expressed in the placenta and the testis. *ABCB1* expressed in the canalicular domain of the hepatocyte and the brush border of the proximal renal tubule plays a role in the biliary and urinary excretion of xenobiotics and endogenous compounds.

ABCC1 (MRP1) and *ABCC2* (MRP2/cMOAT)

The '*ABCC*' gene family comprises the members of multidrug resistance-associated proteins (MRP), sulfonyleurea receptors (SUR) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Figure 2). Human *ABCC1* (formerly known as *MRP1*) was first identified by Cole *et al.* (1992) in molecular cloning from human multidrug resistant lung cancer cells. Subsequently, rat *Abcc2* characterized as the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) was cloned from rat liver complementary DNA (cDNA) libraries. The *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (ABCC1)* gene (formerly known as *MRP1*) is expressed almost universally in many different organs and cell types, whereas the expression of *ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (ABCC2)* (formerly *MRP2*) is restricted to liver, kidney and gut. Molecular cloning studies further identified seven members in the human *ABCC* gene subfamily and two related members (i.e. *ABCC11* and *ABCC12*) (Figure 2). These latter two genes exhibit different patterns of organ-dependent expression.

Gene structure

The human *ABCC1* gene is located on chromosome 16p13.1 and spans at least 200 kb, consisting of 31 exons. *ABCC1* encodes a 1531 amino acid protein which has a molecular weight of 190 kDa in its mature glycosylated form. In the promoter region of the *ABCC1* gene there are a number of putative transcription factor motifs, such as the activator proteins AP1 and AP2 (Sp1), glucocorticoid response elements

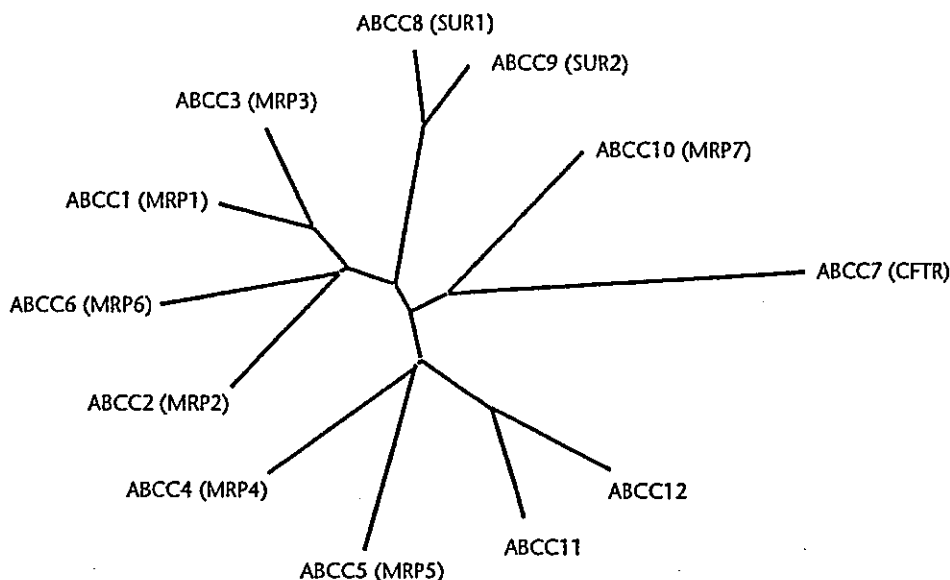


Figure 2 Phylogenetic tree of ABCC subfamily members.

(GREs) and estrogen response elements (EREs) and cAMP response elements (CREs). At least in tumor cells, it is suggested that the loss of wild-type p53 function and/or an increase in Sp1 activity upregulates *ABCC1*.

Human *ABCC2* is a 1545 amino acid protein whose exon gene is located in chromosomal region 10q23–24. Although there is limited sequence similarity between *ABCC1* and *ABCC2* (49%), the primary structure and membrane topology of the two proteins are similar (Figure 1). In addition, the two transporters also have similar substrate characteristics.

Biological function

Both *ABCC1* and *ABCC2* transport a wide range of organic anions, including glutathione disulfide (GSSG), glutathione–metal complexes, glutathione conjugates and glucuronate and sulfate conjugates. These findings are consistent with the idea that *ABCC1* and *ABCC2* play a role in the GS-X pump in the phase III system of xenobiotic metabolism (Ishikawa, 1992). Leukotriene C_4 , a potent proinflammatory mediator, is an important endogenous substrate for both *ABCC1* and *ABCC2*. Mice carrying a homologous deletion (knockout) of the *Abcc1* gene exhibit an impaired response to inflammatory stimuli. In the knockout mice, transport of leukotriene C_4 from inflammatory cells (e.g. eosinophils and mast cells) is significantly reduced. In *Abcc2* mutant rats, such as GY, TR⁻ or EHBR, hepatobiliary transport of cysteinyl leukotrienes is defective. In humans, mutations of the *ABCC2* gene are causative for Dubin–Johnson syndrome, an autosomal recessive benign

disorder with hyperbilirubinemia. In Dubin–Johnson patients, the liver tissue has a characteristically dark color due to accumulation of lysosomal pigments.

ABCC1 in cancer cells

Elevated expression of *ABCC1* mRNA and/or protein levels has been observed in many multidrug-resistant cancer cells. Transfection of *ABCC1* cDNA in cultured cells resulted in enhanced resistance to many cytotoxic agents including doxorubicin, vincristine and VP-16. ATP-dependent transport of these anticancer drugs can be enhanced by the presence of glutathione (GSH) in membrane vesicles prepared from *ABCC1*-overexpressing cells, suggesting that *ABCC1* cotransports anticancer drugs and GSH. Supporting this idea, it has been reported that depletion of intracellular GSH by buthionine sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), resulted in a complete reversal of drug resistance in *ABCC1* cDNA-transfected lung carcinoma cells. Based on the results, three different modes could be proposed for *ABCC1*-mediated transport of drugs and endobiotics (Figure 3), namely, transport of GSH conjugates, cotransport of drugs and GSH and transport of multivalent organic anions. These transport modes give a wide spectrum of substrate specificity of *ABCC1*.

Patients with colorectal cancers frequently overexpress *ABCC1* and γ -GCS, a rate-limiting enzyme of GSH biosynthesis, as compared with the surrounding normal tissue. The frequency of *ABCC1* expression in carcinoma was higher than that in adenoma

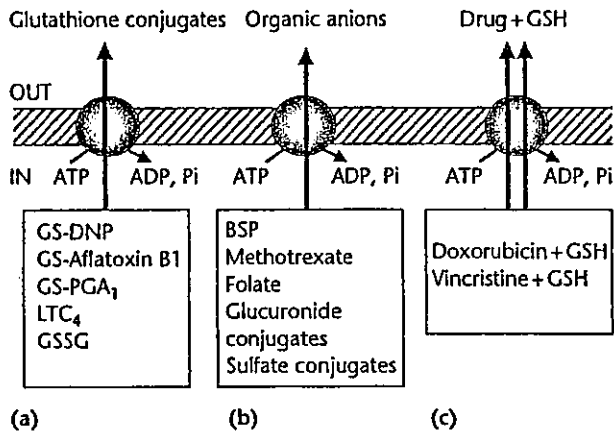


Figure 3 Three different modes in ABCG2-mediated transport of xenobiotics: (a) transport of GSH conjugates; (b) transport of multivalent organic anions; (c) cotransport of drugs with GSH. GSH: glutathione; GS-DNP: dinitrophenyl-S-glutathione conjugate; PGA₁: prostaglandin A₁; LTC₄: leukotriene C₄; GSSG: glutathione disulfide; BSP: bromosulphophthalein; ATP: adenosine triphosphate; ADP: adenosine diphosphate; Pi: inorganic phosphate.

($P < 0.0001$). The ABCG2 upregulation and the p53 status were significantly correlated.

From a public health perspective, colorectal cancer is one of the most prevalent and lethal malignant diseases. This tumor type progresses through easily recognizable stages ranging from small polyps (adenomas) to frank malignancy (carcinomas). Genetic defects associated with many steps during this process have been identified, including mutations in APC, MSH, MLH, DCC and p53 loci. While the identification of these genetic abnormalities represents an important milestone in understanding the genetic basis of colorectal carcinogenesis, and has provided a paradigm for investigation of other human neoplasms, it remains unclear as to how drug resistance evolves during multistep tumorigenesis. Because drug resistance is the major factor controlling the efficacy of chemotherapy in cancer treatment, a better understanding of how different drug resistance genes are regulated in different tumor systems is of great importance for the development of effective strategies to circumvent drug resistance in cancer chemotherapy.

ABCG2 (BCRP/MXR1/ABCP)

A novel ABC transporter, breast cancer resistant protein (BCRP), has recently been discovered in doxorubicin-resistant breast cancer cells. Since the same transporter has also been found in the human placenta as well as in drug-resistant cancer cells selected in mitoxantrone, the transporter was also

called ABCP or MXR1. In comparison with the molecular structures of ABCB1 and ABCC1, this new ABC transporter is a so-called 'half-transporter' bearing six transmembrane domains and one ABC (Figure 1). This ABC transporter protein is now called ABCG2 and has been classified in the G-subfamily of human ABC transporter genes. In the same subfamily, ABCG1, ABCG5 and ABCG8 have been reported to be critically involved in the regulation of lipid- and sterol-trafficking mechanisms in macrophages, hepatocytes and intestinal mucosa cells (Schmitz *et al.*, 2001).

Gene structure

The *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2)* gene is located on chromosome 4q22 and spans over 66 kb, consisting of 16 exons and 15 introns (Bailey-Dell *et al.*, 2001). ABCG2 is transcribed by a TATA-less promoter with several Sp1 sites, which are downstream from a putative CpG island. The sequence 312 bp directly upstream from the ABCG2 transcriptional start site conferred basal promoter activity.

ABCG2 in cancer

ABCG2 is amplified or involved in chromosomal translocations in cancer cell lines selected with mitoxantrone, topotecan or doxorubicin treatment, and ABCG2 was shown to confer resistance to anticancer drugs. Overexpression of ABCG2 is related to resistance of cancer cells to camptothecin-based anticancer drugs, such as topotecan and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38: active metabolite of irinotecan). SN-38-selected PC-6/SN2-5H human lung carcinoma cells were shown to overexpress ABCG2 with the reduced intracellular accumulation of SN-38 and its glucuronide metabolite. Plasma membrane vesicles prepared from those cells transported both SN-38 and SN-38-glucuronide in an ATP-dependent manner, suggesting that ABCG2 is involved in the active extrusion of SN-38 and its metabolite from cancer cells.

It is suspected that ABCG2 functions as either a homodimer or a heterodimer. Current evidence indicates that at least one of the active forms of ABCG2 is a homodimer, although heterodimeric forms with a hitherto unknown transporter partner, or splice variant/mutant of ABCG2, are possible, and may determine the drug resistance phenotype.

ABCG2 in normal tissues

ABCG2 is expressed not only in cancer cells, but also endogenously in placental trophoblast cells, the epithelium of the small intestine and liver canalicular membrane, as well as in ducts and lobules of the breast. In particular, the high expression of ABCG2 in

trophoblast cells suggests that the pump is responsible either for transporting compounds into the fetal blood supply or removing toxic metabolites. The apical localization in the epithelium of the small intestine and colon indicates a possible role for ABCG2 in the regulation of the uptake of orally administered drugs. Furthermore, it has most recently been reported that ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells, and a potential role has been suggested for it in the regulation of hematopoietic development (see below). To date, however, endogenous substrates of ABCG2 have not been identified.

New Aspects

ABC transporters in stem cells

Hematopoietic stem cells can be purified based on the efflux of fluorescent dyes such as rhodamine 123 and Hoechst 33342. Expression of *Abcg2*, a murine ortholog of human ABCG2, is a conserved feature of murine stem cells from different sources, for example the bone marrow, skeletal muscle and embryonic stem cells. *Abcg2* mRNA is expressed at high levels in primitive murine hematopoietic stem cells, and is sharply downregulated with differentiation. Enforced expression of the ABCG2 cDNA directly conferred the side population phenotype to bone marrow cells. At the present time (late 2002), however, the physiological function of ABCG2 and other ABC transporters expressed in stem cells is not well characterized.

Gene therapy to protect bone marrow cells

Another active area of investigation with regard to altering ABCB1 (P-glycoprotein) function is gene therapy, that is, the delivery of cDNA encoding ABCB1 into specific cells and tissues, such as bone marrow and other drug-sensitive sites, to protect them against the toxic effects of cancer chemotherapy. The feasibility of this concept has been demonstrated in transgenic mice and gene transfer experiments, and clinical trials to test the hypothesis in humans are ongoing.

Genetic polymorphism of ABC transporters

Several preclinical reports have already noted naturally occurring polymorphisms in ABCB1 and their effects on drug absorption, distribution and elimination, although the clinical relevance of these and other drug transporter polymorphisms has not yet been fully elucidated. Recently, evidence has been provided for multiple polymorphisms in the *ABCB1* gene. One of those mutations in particular, a C-to-T variant in exon

26 of the *ABCB1* gene, was significantly correlated with ABCB1 expression and function; as a result, individuals homozygous for the polymorphism expressed significantly less duodenal ABCB1 and significantly more plasma digoxin. It is inferred that this polymorphism might affect the absorption and tissue concentrations of numerous other substrates of ABCB1. Genetic polymorphisms of human ABC transporters are being studied in several laboratories worldwide. In the near future, the discovery and characterization of ABC transporter gene polymorphisms may lead to a diagnostic test for discriminating between different alleles and better strategies for designing molecules of new anticancer drugs.

See also

ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Supergene Family: Genetics and Evolution

References

- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, *et al.* (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 361–398.
- Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA and Ross DD (2001) Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1520: 234–241.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, *et al.* (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650–1654.
- Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* 11: 1156–1166.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8: 67–113.
- Ishikawa T (1992) ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 463–468.
- Klein I, Sarkadi B and Váradi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 237–262.
- Ling V (1997) Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer, Chemotherapy and Pharmacology* 40: S3–S8.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, *et al.* (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood–brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77: 491–502.
- Schmitz G, Langmann T and Heimerl S (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 42: 1513–1520.

Further Reading

- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 347–357.
- Bunting KD (2002) ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 20: 11–20.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, *et al.* (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3473–3478.
- Kalow W, Meyer UA and Tyndale RF (eds.) (2000) *Pharmacogenomics*. New York, NY: Marcel Dekker.
- Kuo MT, Bao J-J, Curley SA, *et al.* (1996) Frequent coordinated overexpression of the MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase in human colorectal cancers. *Cancer Research* 56: 3642–3644.
- Mickisch GH, Merlino GT, Galski H, Gottesman MM and Pastan I (1991) Transgenic mice that express the human multidrug-resistance gene in bone marrow enable a rapid identification of agents that reverse drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 547–551.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, *et al.* (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271: 1126–1128.
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, *et al.* (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin–Johnson syndrome. *Human Molecular Genetics* 7: 203–207.
- Zaman GJR, Lankelma J, van Tellingen O, *et al.* (1995) Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7690–7694.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* 7: 1028–1034.
- ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1); Locus ID: 5243. LocusLink: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=5243>
- ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 (ABCB4); Locus ID: 5244. LocusLink: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=5244>
- ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (ABCC1); Locus ID: 4363. LocusLink: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=4363>
- ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (ABCC2); Locus ID: 1244. LocusLink: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=1244>
- ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2); Locus ID: 9429. LocusLink: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=9429>
- ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1); MIM number: 171050. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispnim?171050>
- ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 (ABCB4); MIM number: 171060. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispnim?171060>
- ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (ABCC1); MIM number: 158343. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispnim?158343>
- ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 (ABCC2); MIM number: 601107. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispnim?601107>
- ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2); MIM number: 603756. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispnim?603756>

Web Links

HGNC Gene Family Nomenclature. Human ABC transporter genes <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>

第8章

薬物トランスポーターと創薬

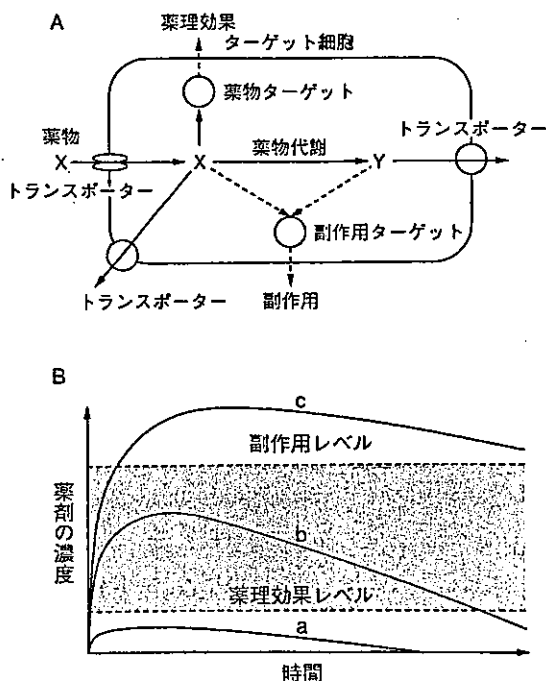
辻 彰・石川智久

Key words 【1 次性能動輸送】 【2 次性能動輸送】 【オリゴペプチド】
 【トランスポーター】 【有機アニオントランスポーター】
 【有機カチオントランスポーター】 【カルニチントランスポーター】
 【SLCファミリー】 【ABCトランスポーター】 【排出ポンプ】 【小腸吸収】 【臓器分布】 【血液脳関門】
 【薬物動態】 【遺伝子多型】 【薬剤応答性】

はじめに 創薬化学者は、ややもすると *in vitro* での実験結果をもとに、標的とする受容体や酵素に対し最高の活性を示す「切れ味のいい」医薬品を求める傾向があるが、これは大きな誤りである。1950年代にいわゆる pH 分配仮説が提唱されて以来、生体外由来の異物としての薬物はその脂溶性に依存して生体内組織細胞膜を単純拡散の機構により透過すると広く信じられてきたために、創薬化学者は pH 分配仮説に照らして合理的な分子デザインと思いついているきらいがある。そのために高脂溶性で、水に難溶なものが開発候補としてあげられ、開発途中でドロップアウトすることが多い。事実、開発中止のケースの約 30% は薬物動態の不具合（すなわち、低い吸収率、低血中濃度レベル、早いクリアランスなど）に起因する。前臨床および臨床開発の段階で数多くの開発候補化合物がドロ

図 8.1 薬物の薬理効果と副作用に対する薬物トランスポーターと代謝酵素の役割(A)およびターゲット部位での薬剤濃度の経時変化と薬剤応答性との関係(B)

A: 薬剤が細胞内ターゲット分子（たとえば酵素や核内受容体）と作用するには、まず細胞の内部に輸送されなくてはならない。しかしながら細胞膜には薬剤を排出するトランスポーターがあり、ターゲット部位での薬剤濃度は抑えられる。また薬剤は酵素によって代謝され、その代謝物はトランスポーターによって細胞外へ排出される。しかし、排出トランスポーターの機能が不十分な場合、薬剤やその代謝物が細胞内に蓄積して、予期せぬターゲットと作用して副作用が現れる。B: ターゲット部位で薬剤は、薬理効果を示す最低濃度と副作用を起こす最低濃度との間、すなわち“therapeutic window”内のレベルで十分な時間存在しなければならない（タイムコース b）。タイムコース a は薬剤実行濃度が低すぎた場合で、タイムコース c は高すぎた場合を示す。



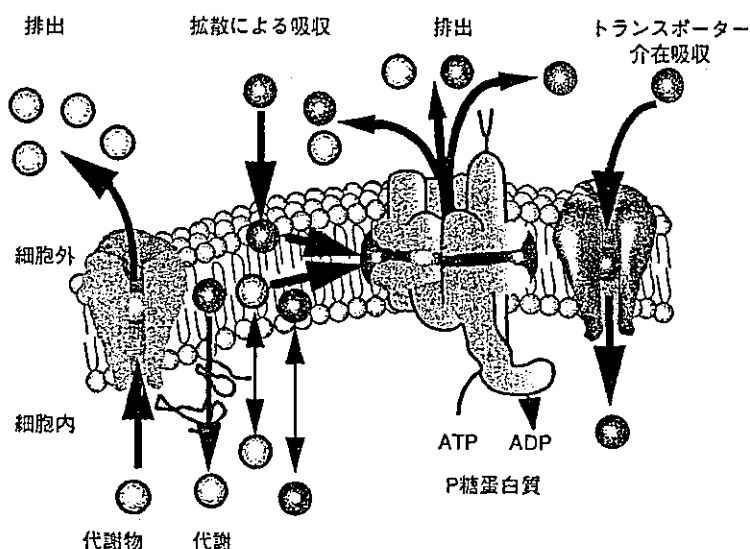


図8.2 脂質二重層を貫通するトランスポーター群が生体にとって「必要なもの」と「不要なもの」を選別輸送する様

P糖蛋白質は脂質二重層に移行してきた脂溶性の生体外異物やその代謝産物を、あたかも掃除機がゴミを吸入するように、ATPを消費して細胞外に排出するというバキュームクリーナー仮説を模式的に示した。また、これとは独立して細胞内に取り込む、あるいは細胞外に排出するトランスポーターの役割を示している。

アップアウトすることは、それまでの研究投資を無駄にすることであり、創薬において憂慮すべき重大な問題である。

薬剤が薬として効果を発揮するには、まず体内に入ってターゲット部位で十分な時間、薬効濃度で存在しなければならない。薬物トランスポーターや薬剤代謝酵素は薬物の体内動態プロファイル（吸収、分布、代謝、排泄、ターゲット部位での薬剤実効濃度）を規定し、ひいては薬剤の全体的な薬理効果をも左右する。図8.1で示されるように、もしターゲット部位での薬剤実行濃度が低すぎた場合（タイムコースa）、薬理効果は期待できない。一方、もしターゲット部位での薬剤実行濃度が高すぎた場合には副作用の起きることが予測される（タイムコースc）。したがって、良好な薬理効果を得るには、薬物トランスポーター（流入および排出）と薬物代謝酵素の共同作用によってターゲット部位での薬剤実効濃度は十分な時間うまく制御されなければならないのである（タイムコースb）。かくして、薬物トランスポーターは薬物の体内動態においてきわめて重要な役割を果たしているのである。

栄養物や内因性物質のトランスポーターに関する分子生物学的研究成果が報告されるに伴い、体内の各組織細胞膜に備わるトランスポーター群の薬物認識・輸送機能は、1994年前後よりそれら遺伝子発現細胞や遺伝子欠損マウスなどの利用によって実証されつつある。図8.2の概念図に示されるように、生体にとって「必要なもの」を積極的に取り込み、「不要なもの」を細胞外へ排出する機能を担うトランスポーターの分子機構の解明に多大の関心が寄せられていた。トランスポーターは、生体機能の維持に重要であると同時に、生体内に投与された薬物の① 投与部位から循環血中への吸収過程、② 組織への分布・移行過程、③ 薬効または毒性発現部位との相互作用、④ 肝代謝・胆汁排泄

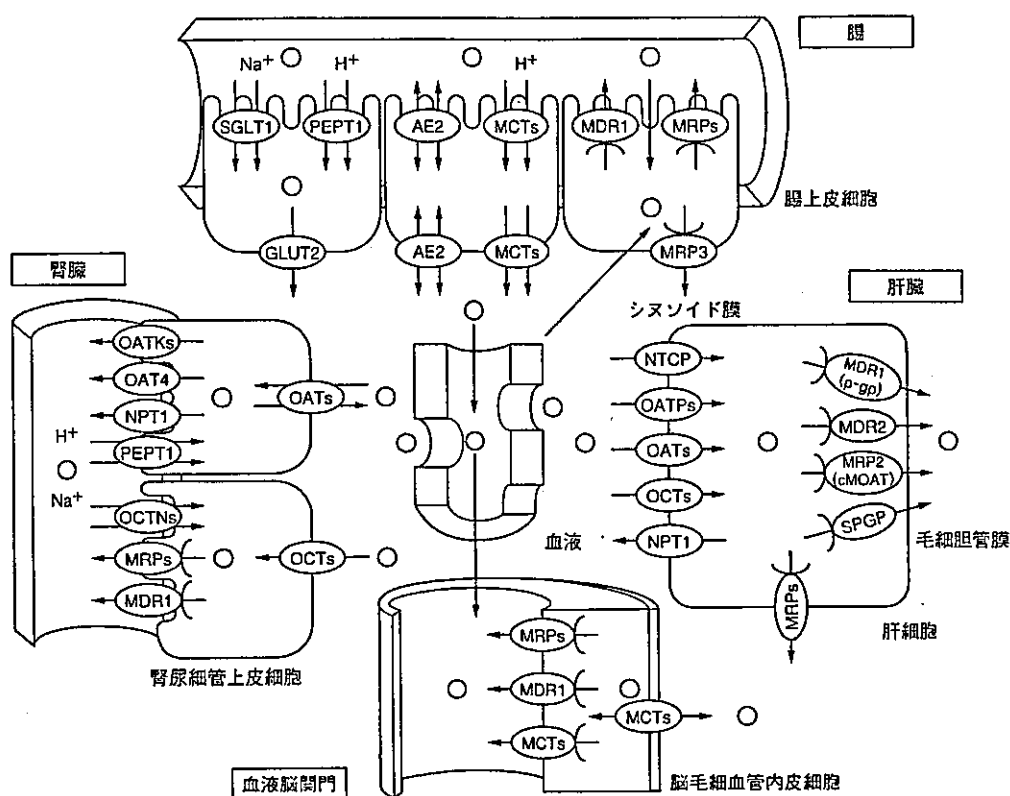


図 8.3 薬物を輸送するトランスポーター群の組織分布
2001年までにクローニングされ薬物輸送機能があることが実験的に確認され、おおむね細胞内局在性が示されているトランスポーターを示した。

および腎尿管分泌，など薬物の吸収・分布・排泄の諸過程に関与している。現在までに分子レベルで構造が明らかにされたトランスポーターの中で，薬物またはその代謝物の輸送に関わる薬物トランスポーターは，1次性能動輸送系，2次性能動輸送系を含め，図8.3に示すようにきわめて多様である。これら取り込みと排出に関わるトランスポーター群に対する親和性と，これらによる輸送の大きさを調節することによって，体内動態上の特性を目的に適合させて制御できることになり，臓器特異的なトランスポーターの性質を考慮した創薬分子デザインも可能になると考えられる。

8.1 薬物トランスポーターの薬物動態への寄与

ヒト遺伝子の機能解析が急速に進む中であって，これまで単離された遺伝子の約15%はトランスポーターをコードする遺伝子であり，治療に用いられている医薬品の30~40%はチャネルトランスポーターがターゲットとなっている。医薬品として臨床開発の対象となる候補化合物が経口投与に適したものであるためには，小腸上皮細胞を透過すると同時に，小腸および肝臓での代謝による著しい初回通過効果を受けないものであることが望ましい。下記に列記するように市場にある経口投与薬の中にはトランスポーターを介して小腸から吸収され，優れたバイオアベイラビリティをもつものも

ある。

1. アゼセトロン

セロトニン (HT₂) 受容体アンタゴニストであるアゼセトロンはヒトに経口投与後のバイオアベイラビリティは87%と高く、58%は未変化体として尿中に排泄される。アゼセトロンは、薬物排出型トランスポーターのP糖蛋白質/MDR1 (ABCB1) の基質でもあるが、ヒトではもっぱら小腸の取り込み型トランスポーターによる薬物輸送が優先し、その結果として効果的な血中への移行と高バイオアベイラビリティが達成される。

2. テモカプリル

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬であるテモカプリルは、活性体テモカプリラートのエステル型プロドラッグであるが、小腸上皮細胞に発現するオリゴペプチドトランスポーター PEPT1 (SLC15A1) を介して吸収され (あとに述べる図8.4参照)、尿中よりも主として胆汁中に排泄される。その理由は、体内にあるエステラーゼによってテモカプリルがテモカプリラート (有機アニオン) に代謝され、肝臓の胆管膜に発現する有機アニオン排出 ABC トランスポーター MRP2/cMOAT (ABCC2) によって胆管に排泄されることによる。このため、腎機能の低下した高齢者に対して尿排泄の負担を軽減することができ、投与量の設定が容易な医薬品として有用である。

3. β-ラクタム抗生物質、バルアシクロビルなど

オリゴペプチドトランスポーター PEPT1 (SLC15A1) は小腸上皮細胞刷子縁側に存在して経口β-ラクタム抗生物質や ACE 阻害薬の効率的な吸収に関与している (あとに述べる図8.4参照)。興味あることに、最近ペプチド結合を有さないバルアシクロビルや4-アミノ-フェニル酢酸も PEPT1 (SLC15A1) によって認識され、輸送されることが報告された。他の輸送系に比べ、オリゴペプチドトランスポーターの幅広い基質認識性を利用すれば、低吸収性の親化合物のペプチド化修飾によって薬物吸収促進が期待できる。その考えは、α-メチルドーパやレボドーパをL-フェニルアラニンとのジペプチドプロドラッグに応用され、成功している。α-メチルドーパは、基質の構造・認識が比較的厳格なアミノ酸トランスポーターを介して吸収されるため、バイオアベイラビリティが20%前後ときわめて低いが、このジペプチドプロドラッグはオリゴペプチドトランスポーター介在吸収によって、ヒトでは80%のバイオアベイラビリティが達成されている。

4. プラバスタチン

高脂血症治療薬プラバスタチンは水溶性でありながらバイオアベイラビリティが高いのは、小腸上皮細胞のモノカルボン酸トランスポーターを介してH⁺勾配を駆動力として吸収されるからである。プラバスタチンの場合、標的部である肝臓には有機アニオン輸送系 OATP-C (LST-1, SLC21A6) を介して取り込まれ、コレステロール生合成の律速酵素である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素を阻害してコレステロール合成を制御したのち、ATP 依存型薬物排出ポンプである MRP2/cMOAT (ABCC2) により胆管膜を介して胆汁中に分泌される。そのため他の組織には移行し難い。特に HMG-CoA 還元酵素阻害薬で副作用としてしばしば問題となる睡眠

障害がプラバスタチンに起きないのは、血液脳関門に備わるモノカルボン酸トランスポーター [MCT1 (SLC16A1) と MCT2 (SLC16A2) の発現が確認されている] による中枢神経系への輸送がほとんど行われないうことにある。かくしてプラバスタチンは、組織に備わるトランスポーターの認識・輸送のバランスがとれ、副作用が少ない体内動態特性をもつ医薬品となっている。

5. 抗ヒスタミン薬

血液脳関門トランスポーターの構造認識輸送特性を利用して、中枢毒性を回避する創薬戦略が抗ヒスタミン薬に適用されている。第1世代抗ヒスタミン薬であるメピラミンはプロプラノロール、イミプラミン、リドカインと同様にアミン輸送系を介して血液脳関門を透過する。カルボキシル基を有する両性イオン型の抗ヒスタミン薬は第1世代のカチオン型抗ヒスタミン薬 (シプロヘプタジン、ケトチフェンなど) に比してメピラミンを輸送するトランスポーターに対する親和性が低く、中枢神経系への移行性が低下する。したがって、眠気に代表される中枢性副作用の引き金となる脳内移行性を制限するためには、薬物分子を両性イオン型に変換することが有効であると考えられる。この戦略に基づいて眠気の少ない抗ヒスタミン薬の開発が行われている。第2世代抗ヒスタミン薬のテルフェナジンとエバスチンは一種のプロドラッグであり、経口投与後活性体である両性型のカルボン酸代謝物 (前者はヘキサフェナジン、後者はカレバスタチン) となる。カレバスタチンはメピラミントランスポーターに対する親和性が低くばかりでなく、P糖蛋白質 (ABCB1) によって脳内血管内皮細胞より排出される (すなわち血液脳関門を透過し難い) ため、副作用としての鎮静作用が回避される。このように小腸と血液脳関門に備わるトランスポーターに対する親和性の相違を利用すれば、経口投与、小腸上皮細胞を効率良く透過させ、かつ脳移行性を制限することによって中枢神経系での副作用を軽減できる。

6. ニューキノロン系抗菌薬

ニューキノロン系抗菌薬についても誘導体間で排泄経路に選択性がある。その多くは未変化体として尿中に排泄されるが、グレパフロキサシンや HSR-903 などの誘導体は肝実質細胞の側基底膜に備わるトランスポーターによって細胞内に取り込まれグルクロン酸抱合され、未変化体とともに肝細胞の胆管膜に発現する MRP2/cMOAT (ABCC2) を介して胆汁中に排泄される。この2剤は経口投与後、トランスポーターを介して特異的に肺に移行するが、血液脳関門を透過し難い。これは、肺細胞に存在するトランスポーターを介して細胞内に輸送される一方、血液脳関門にある P糖蛋白質 (ABCB1) によって中枢神経系からの排出輸送を受けることによる。そのため両剤は、中枢神経系毒性が回避された上気道感染症治療薬としての特徴を備えている。

これまでβ-ラクタム抗生物質、プラバスタチン、エバスチン、グレパフロキサシンのように、これらの医薬品の市販後の体内動態に関する研究の成果として、薬物トランスポーター機能と役割が明らかになったものが多い。しかし今後、新薬探索段階からトランスポーターの機能を利用する創薬戦略を立てて分子設計することは重要である。薬物トランスポーターの分子種が解明されて、その知見が蓄積している今日、上述のアプローチはより現実的になっている。トランスポーター機能を利用する創薬戦略には、まずヒトの体内に発現する薬物トランスポーターの分子機能と組織分布をよく理解することである。

8.2 薬物輸送担体の分類

薬物トランスポーターは、そのメカニズムに基づいて大きく2つに分類される。すなわち1次性能動輸送系と2次性能動輸送系である(表8.1)。1次性能動輸送系はATPの加水分解によって生じるエネルギーを直接的に利用して物質を輸送する。一方、2次性能動輸送系は、膜電位やイオン勾配を駆動力として物質を輸送するもので、ATPの加水分解によって生じるエネルギーを間接的に利用する。表8.2に主な2次性能動輸送系の駆動力と基質特異性を示す。例外はあるものの、大局的に見ると、細胞の内側から外側へ薬剤を輸送する「排出型」トランスポーターは1次性能動輸送系が多く[たとえばP糖蛋白質(ABCB1)]、一方、細胞の中へ薬剤を輸送する「取り込み型」トランスポーターには2次性能動輸送系が多い(たとえば、オリゴペプチドトランスポーターやアミノ酸輸送系)。

「排出型」トランスポーターであるP糖蛋白質は薬剤の吸収・分布・排泄の段階で重要な役割を示す。P糖蛋白質[Pは透過性(permeability)を意味する]は腫瘍細胞の多剤耐性化因子として発見された薬物排出ポンプで、ビンカルカロイド、アントラサイクリン系抗がん薬などの抗がん薬を腫瘍細胞内から汲み出すことにより、がん細胞では耐性化をひき起こす。P糖蛋白質は抗がん薬のみなら

表8.1 薬物輸送の1次性能動輸送系と2次性能動輸送系

器官/組織	1次性能動輸送系		2次性能動輸送系		
	ABCトランスポーター	アニオン輸送体	カチオン輸送体		
小腸	P糖蛋白質(ABCB1)	MCT1(SLC16A1)	OCT1(SLC22A1)		
	MRP2/cMOAT(ABCC2)	~MCT6(SLC16A6)	OCT3(SLC22A3)		
	MRP3(ABCC3)	OATP-B(SLC21A9)	OCTN1(SLC22A4)		
		OATP-D(SLC21A11)	OCTN2(SLC22A5)		
		OATP-E(SLC21A12)			
		PEPT1(SLC15A1)			
		PGT(SLC21A2)			
		ASBT(SLC10A2)			
	血液脳関門	P糖蛋白質(ABCB1)	MCT1(SLC16A1)	OCTN2(SLC22A5)	
		MRP1(ABCC1)	MCT2(SLC16A2)		
		OAT1(SLC22A6)			
		OAT3(SLC22A8)			
肝臓	P糖蛋白質(ABCB1)	OAT1(SLC22A6)	OCT1(SLC22A1)		
	MDR2(ABCB4)	OATP-B(SLC21A9)	OCTN1(SLC22A4)		
	SPGP(ABCB11)	OATP-C/LST-1(SLC21A6)	OCTN2(SLC22A5)		
	MRP2(ABCC2)	OATP-8(SLC21A8)			
	MRP3(ABCC3)	NTCP(SLC10A1)			
		NPT1(SLC17A1)			
腎臓	P糖蛋白質(ABCB1)	OAT1(SLC22A6)	OCT2(SLC22A2)		
	MRP1(ABCC1)	OAT3(SLC22A8)	OCT3(SLC22A3)		
		OAT4(SLC22A9)	OCTN1(SLC22A4)		
		OAT-K1(SLC21A4)	OCTN2(SLC22A5)		
		OAT-K2(SLC21A5)			
		NPT1(SLC17A1)			
		PEPT1(SLC15A1)			
		PEPT2(SLC15A2)			

表 8.2 2次性能動輸送系の駆動力と基質特異性

トランスポーター (シンボル)	基 質	駆動力
PEPT1, 2 (SLC15A1, 2)	ジおよびトリペプチド, β -ラクタム抗生物質	ペプチド/ H^+ 共輸送
OCTN1 (SLC22A4)	TEA, カルニチン, キニジン, ベラパミル, ピリラミン	カチオン/ H^+ 交換
OCTN2 (SLC22A5)	カルニチン, アセチルカルニチン, TEA	Na^+ 依存
NPT1 (SLC17A1)	PAH, ベンジルベニシリン	アニオン/ Cl^- 交換 (?)
OCT (SLC22A)	TEA, MPP	膜電位依存
OAT (SLC22A)	PAH, β -ラクタム抗生物質, グルタル酸, cAMP, cGMP, 尿酸, メトトレキサート, プロスタグランジン E_2	アニオン/ジカルボン酸交換
OATP (SLC21A)	胆汁酸 (タウロコール酸, コール酸)	Na^+ 非依存
NTCP (SLC10A1)	タウロコール酸	胆汁酸/ Na^+ 共輸送
MCT1 (SLC16A1)	モノカルボン酸, ベンジルベニシリン	モノカルボン酸/ H^+ 共輸送
AE2 (SLC4A2)	モノカルボン酸	アニオン/ H^+ 交換

ず, ステロイドホルモン, 免疫抑制薬シクロスポリン A やタクロリムス, さらにベラパミルなどのカルシウム拮抗薬も輸送するなど, 構造に類似性のない多様な脂溶性物質を細胞外に排出輸送する。P糖蛋白質 (ABCB1) は, ATP-binding cassette (ABC) トランスポータースーパーファミリーに属する (ABC トランスポーターの詳細については 8.8 節で説明する)。薬物トランスポーターの各主要臓器における分布とその役割を以下に述べる。

8.3 小腸における薬物吸収とトランスポーターの役割

小腸は食べ物を含めて外界由来の異物を処理する器官であると同時に, 生体にとって必要な物を体内に取り込む重要な器官である。また, 経口薬剤は小腸で吸収されない限り, 血液中には移行できず薬理効果を発揮することができない。小腸上皮細胞の管腔側刷子縁膜には食物から得られるアミノ酸, オリゴペプチド, 糖, 水溶性ビタミンなどの栄養物を効率的に輸送する多くのトランスポーター群が存在するが, それらは薬剤の吸収にも関与する。

アミノ酸と構造が類似する薬物は小腸上皮細胞アミノ酸輸送系を介して吸収される。抗てんかん薬ガバペンチンやバクロフェンは中性アミノ酸輸送系を介して吸収される。そのためガバペンチンのヒト経口バイオアベイラビリティは 100mg 投与で 74%, 1600mg 投与で 36% という飽和性の吸収動態を示す。その他, 高血圧治療薬 α -メチルドーパ, パーキンソン病治療薬 L-ドーパは Na^+ /中性アミノ酸共輸送系を介して小腸から吸収される。

食物として摂取された蛋白質は小腸管腔内で各種酵素により主としてジペプチドやトリペプチドにまで加水分解され, これらがオリゴペプチドトランスポーター PEPT1 (SLC15A1) を介して吸収される。オリゴペプチドトランスポーターは小腸上皮細胞刷子縁膜近傍の酸性環境から生ずる細胞内に向けられたプロトン勾配を駆動力とする 2次性能動輸送体であるため, ナトリウム依存性のアミノ酸トランスポーターと駆動力を競合しにくく, 合目的な生理機能を有している。このトランスポーターは, 構成アミノ酸に関わらず幅広くジペプチド, トリペプチドを認識・輸送する。小腸よりクローニ

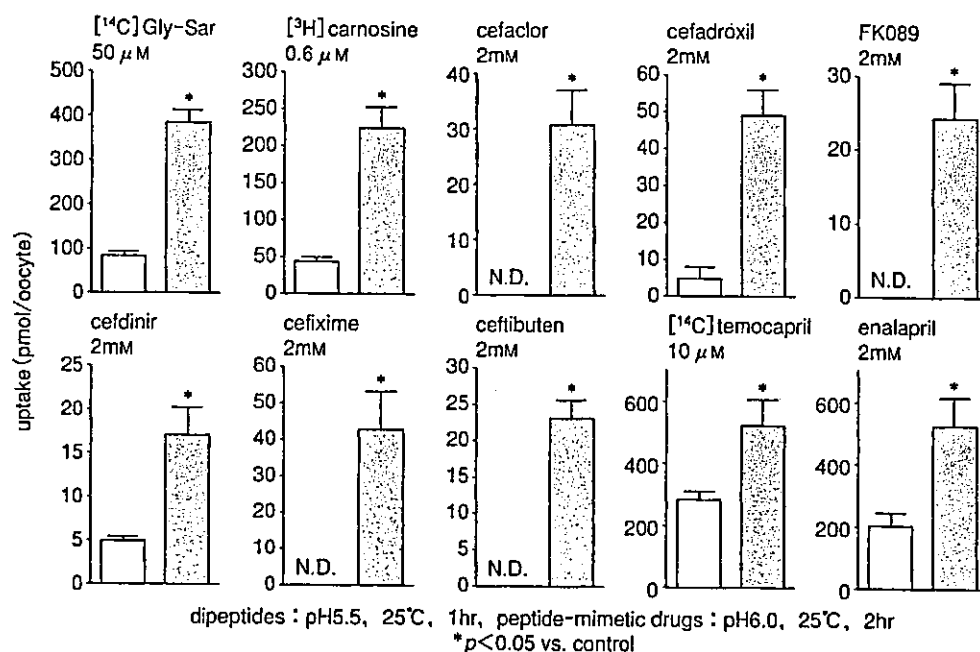


図8.4 ヒト PEPT1 (アミのカラム) および水 (白のカラム) を注入したアフリカツメガエル卵母細胞へのジペプチド、 β -ラクタム抗生物質および ACE 阻害薬の 2 時間後の取り込み

ングされた H^+ /オリゴペプチドトランスポーター遺伝子 PEPT1 (SLC15A1) は経口 β -ラクタム抗生物質や ACE 阻害薬の小腸吸収に関与することが明らかになった (図 8.4)。

小腸上皮細胞刷子縁膜にはナトリウム依存的な 2 次性能動輸送体ナトリウム/糖共輸送体 SGLT1 (SLC5A1) が存在する。p-ニトロフェノールや β -ナフトールの β -D-グルコピラノシド修飾体がグルコース輸送系に認識・輸送されることがラット消化管切片を用いた研究により示された。また、小腸に存在するリン酸輸送系は、分子内にリン酸基を有する水溶性小分子化合物の吸収に関与する。抗ウイルス薬フォスカルネットは、ウサギで経口バイオアベイラビリティが 95% と薬物の水溶性から推測されるよりも高い吸収性を示す一方、ヒトやラット、マウスにおいては 20~30% 前後という動物種差の大きい吸収特性を有する。フォスカルネットの取り込みはナトリウムイオン勾配に依存し、リン酸輸送系阻害薬で阻害される。その結果から、フォスカルネットがリン酸輸送系を介して吸収されることがわかる。同様に分子内にリン酸基を有する抗生物質ホスホマイシンもやはり、一部リン酸トランスポーターが関与する吸収機構が報告されている。

モノカルボン酸系化合物に代表される弱酸性化合物の吸収にも、pH 分配理論に従う単純拡散以外にトランスポーターが関与している。ラット小腸よりクローニングされたモノカルボン酸トランスポーター MCT1 (SLC16A1) を発現させた細胞において、乳酸、ピルビン酸や酢酸に代表される短鎖脂肪酸、ニコチン酸などのほか、アニオン性 β -ラクタム抗生物質の 1 つベンジルペニシリンや安息香酸も輸送する。図 8.5 に示されるようにベクターのみを発現させた MDA-MB231 細胞での [¹⁴C] 安息香酸の取り込み活性に比べて、ラット MCT1 (SLC16A1) を発現させた MDA-MB231 細胞では時間依存的に、酸性 pH でより高い取り込み活性を観測した。したがって、安息香酸の pH 依存的な輸送には pH 分配仮説に従う単純拡散のほか MCT1 (SLC16A1) 介在輸送が重要な役割を演じているこ

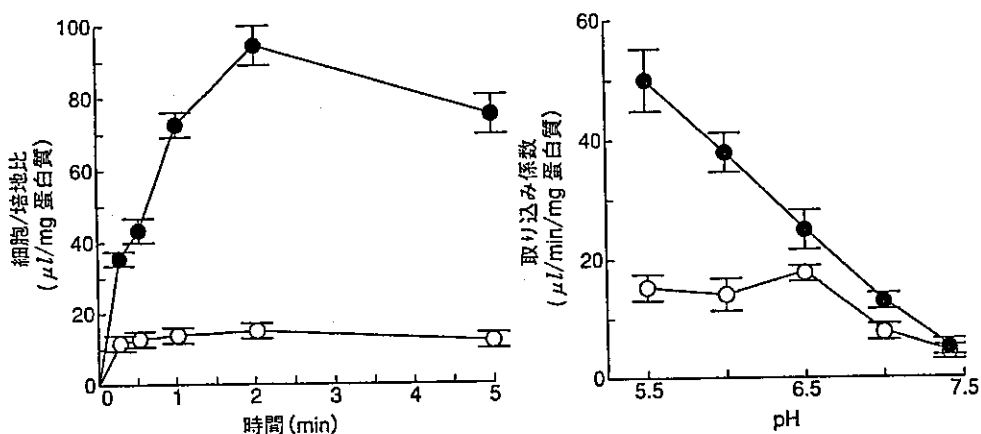


図 8.5 ラット MCT1 を発現させた MDA-MB231 細胞への $[^{14}\text{C}]$ 安息香酸の取り込みの時間依存性 (左図) と pH 依存性 (右図)
ベクターのみを導入した MDA-MB 231 細胞 (コントロール, ○) およびラット MCT1-cDNA を導入した MDA-MB231 細胞 (●) をディッシュ上に培養して $[^{14}\text{C}]$ 安息香酸の取り込み活性を測定した。

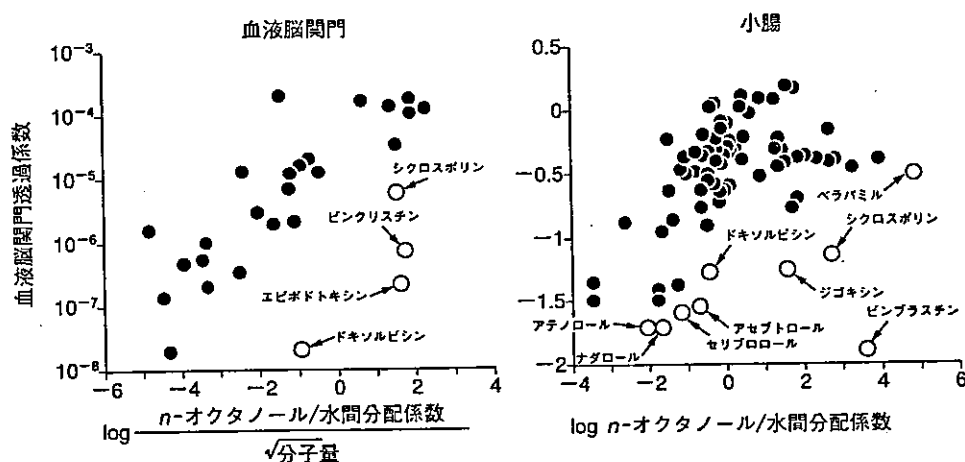


図 8.6 薬物のラットにおける血液脳関門透過係数 (左図) および小腸吸収クリアランス (右図) と n -オクタノール/水間分配係数との関係
○で示した薬物はすべて P 糖蛋白質の基質。

とが示唆される。この MCT1 は、小腸刷子縁膜と側底膜に発現が認められ、プロトン勾配を駆動力として、モノカルボン酸系薬物の輸送 (吸収) に関与していると考えられている。

一方、小腸上皮に発現する輸送担体により、薬剤の消化管での吸収性がかえって低下するという現象が報告されている。図 8.6 (右) は多くの化合物の吸収速度と各化合物の脂溶性との関係をプロットした結果である。黒丸で示される化合物群においては、脂溶性の増大とともに吸収性も増大し、しだいに最大吸収速度に達していると解釈できる。これに対して白丸で示したいくつかの化合物は、黒丸について得られる相関曲線と比較すると著しく吸収性が低い。その中には、 β 遮断薬、シクロスポリン、ピンプラスチン、ジゴキシシンなど P 糖蛋白質 (ABC1) によって輸送される化合物が多く含

まれている。これら薬物は、たとえ小腸上皮細胞内に輸送されても、P糖蛋白質(ABCB1)によって腸管腔内へ排出されるために血管に到達できず、低い吸収性となっている。小腸上皮細胞に発現するP糖蛋白質(ABCB1)およびチトクロムP450のCYP3A4が、小腸での薬剤の吸収性に大きく影響する(低下させる)という事実が蓄積しつつある。したがって小腸で吸収性の高い薬剤を作るには、まずP糖蛋白質(ABCB1)およびCYP3A4の基質にならない分子デザインが必要である。

8.4 血液脳関門における薬剤トランスポーターの役割

体内に入った薬剤は標的とする器官に移行分布しなければならない。血液脳関門は、薬剤の中樞神経系への移行の可否を決定づける重要な部位である。脳内受容体の存在が明らかにされ中枢作用性薬物の開発が活発に行われているが、薬理活性を発現させるためには標的部位となる脳内への薬物の移行が重要な課題となる。一方、中枢性副作用が重篤となる薬物も多く、その場合には薬物の脳内移行性を制限する必要がある。

薬物の脳移行は、血液脳関門を形成して多岐にわたる物質輸送機能を有する脳毛細血管内皮細胞によって厳密に制御されている。脳-血液間の物質交換のメカニズムを理解したうえでの適切な薬物デザインが理想的である。脳-血液間物質交換は、血液脳関門および血液脳脊髄液関門によって制御されている。血液脳関門の解剖学的実体である脳毛細血管内皮細胞の表面積は1g組織あたり100cm²であり、総面積で血液脳脊髄液関門の5000倍となる。したがって、物質の血液-脳間物質交換には血液脳関門が重要な役割を演じている。脳毛細血管内皮細胞は細胞間密着結合(tight junction)によって内皮細胞間が強固に付着しており、細胞間を介する物質透過はない。また、末梢組織毛細血管と異なりfenestraが存在しない。したがって、物質は脂溶性に従う単純拡散機構、あるいはトランスポーター介在輸送やエンドサイトーシスなどの生理的機構によって血液脳関門を経細胞的に透過する。

一般には透過する分子の脂溶性と分子サイズによって決まる単純拡散が薬物の脳移行性の重要な決定因子であると考えられている。事実、多くの化合物の見かけの脳移行性は、*n*-オクタノール-水間分配係数や拡散係数などの物理科学的特性とよい相関がある。しかし、水溶性薬物であってもトランスポーターを介して血液脳関門を効率的に透過することが明らかにされている。一方、脂溶性が高い場合でも血液脳関門透過性の低い化合物が存在する(図8.6(左)参照)。1980年以来、血液と脳間の内皮細胞を経由する分子量500以上の物質の移行は制限されるという血液脳関門の存在が広く受け入れられてきた。しかし1992年に至り、*in vitro*培養脳毛細血管内皮細胞を用いた研究から、「脂溶性および細胞毒性のある物質の脳移行が制限されるのは、脳毛細血管内皮細胞に発現しているP糖蛋白質(ABCB1)が細胞内からそれらの物質を血液中に排出する機構による」という新しい仮説が提唱された。この仮説は、1994年にP糖蛋白質(ABCB1)をコードする遺伝子*mdr1a*欠損マウスの利用によってP糖蛋白質の*in vivo*での血液脳関門機能が遺伝子レベルで実証された。ジゴキシン、ドキシソルピシン、シクロスポリンなどの脳移行動態が*mdr1a*ノックアウトマウスで著しく増大したのである。すなわち、血液脳関門においてP糖蛋白質(ABCB1)は脂溶性あるいは細胞毒性を示す多くの薬物の脳移行を制限する役割を担っていると考えられる。

一方、水溶性のグルコース、アミノ酸、モノカルボン酸、アミンなどの栄養物質やT₃などのホルモンを循環血液中から選択的に取り込むために、血液脳関門にはそれぞれ独立したトランスポーター

が備わっている。これらの栄養物トランスポーターは、親水性の基質を比較的高い透過速度で運ぶことができるので、基質の構造認識特性が高いという制約はあるが、脳へのドラッグデリバリーに利用できる。

したがって今日では血液脳関門の実体は、細胞間移行を制限する密着結合の存在に加えて、脳毛細血管内皮細胞に備わるトランスポーター群が栄養物など「必要なもの」を脳内に積極的に移行させ、脂溶性薬物など「不要なもの」を能動的に排出する「ダイナミックインターフェース」と解釈されている。血液脳関門の実体が明らかになるにつれ、薬物の脳移行制御に関する創薬研究は、分子の脂溶性の改変によって受動拡散速度を調節するという「古典的手法」から、脳毛細血管内皮細胞の「トランスポーター群の分子認識・輸送特性を利用した脳移行制御」をめざすという合理的戦略へ転換する時代が到来したようだ。しかし同時に次の事柄も考慮する必要がある。

1. 酸性薬物輸送

乳酸、短鎖脂肪酸などの弱酸性化合物は、モノカルボン酸輸送系を介して血液脳関門を透過する。モノカルボン酸トランスポーターMCTファミリーのうちMCT1 (SLC16A1) およびMCT2 (SLC16A2) が、脳毛細血管内皮細胞中にも存在し、弱酸性化合物輸送機能の一部を担っている。モノカルボン酸輸送系については脳からの排出方向の活性が高いという示唆もある。一部のHMG-CoA還元酵素阻害薬、サリチル酸やバルプロ酸などもモノカルボン酸系化合物特異的なトランスポーターを介して脳内に取り込まれる。一方、これらモノカルボン酸系化合物の中にはアニオン性化合物排出機構によって血液中に汲み出されている可能性も示されており、取り込み、排出に働くトランスポーターの多様性についても今後の解明が待たれる。

2. 塩基性薬物輸送

塩基性薬物は、細胞が有する負の膜電位あるいは細胞表面の負電荷と薬物分子の正電荷との複雑な相互作用による単純拡散と、トランスポーターが関与する血液脳関門透過があるが、その区別はしばしば困難である。高脂溶性のプロプラノロールやリドカインの血液脳関門透過には単純拡散と塩基性薬物特異的な促進拡散の関与が示唆されている。コリンやH₁-アンタゴニストのメピラミンなどもトランスポーターを介して脳内に移行する。

3. アミノ酸・ペプチド輸送

血液脳関門には他の組織と同様に荷電状態や構造的特徴によって分類されるような種々のアミノ酸トランスポーターが存在し、類似薬物の脳内移行にも働いている。たとえば中性アミノ酸トランスポーターは、パーキンソン病治療薬のL-DOPAの取り込みに関与している。また、本トランスポーターは脳内への取り込みだけでなく、脳側細胞膜に存在し脳からの排出に働くことも報告されている。ただし、現時点では輸送の方向性は明らかではなく今後の課題である。ペプチド輸送については、エンケファリンなどに対し複数のペプチドトランスポーター (PTS) が関与すると考えられている。オリゴペプチド特異的なペプチドトランスポーター PEPT1 (SLC15A1) および PEPT2 (SLC15A2) は脳組織には発現が見られないことから、最近その存在が示されたグルタチオンなどのトランスポーターを含め、血液脳関門ペプチドトランスポーターはアミノ酸の場合と異なり、かなり脳特異的のように

思われる。

8.5 肝臓における薬物トランスポーター

薬物の胆汁中排泄過程には、① 血液から肝実質細胞内への取り込み、② 細胞内の薬物それ自身およびその代謝物の胆管膜あるいは側底膜への移行、③ 胆管膜から胆汁中への能動的分泌などの輸送が含まれる。近年に至り、これらの輸送に関わる薬物トランスポーター群の遺伝子クローニングが進められ、分子レベルでその輸送系の実態が明らかとなった。肝実質細胞の血液側には Na^+ 依存性の有機アニオントランスポーターとして胆汁酸に特異性が高い NTCP とリン酸を輸送する NPT1 が局在する。 Na^+ 非依存性の有機アニオントランスポーターとして OATP ファミリー、ラットでは *oatp1* (*slc21a1*), *oatp2* (*slc21a5*), *oatp4* (*slc21a10*), ヒトでは OATP-C/LST1/OATP2 (SLC21A6) と OAT ファミリー、OAT1 (SLC22A6), OAT2 (SLC22A7) が発現している。有機カチオントランスポーターとして OCT1 (SLC22A1) と OCTN1 (SLC22A4) の発現がある (図 8.3)。これらのトランスポーターは血液中の有機アニオン性や有機カチオン性物質の血液から肝実質細胞内への取り込みに機能する。

肝臓は体内における薬物代謝の重要な器官である。肝細胞に入った疎水性薬物は、第 I 相解毒系 (phase I) においてチトクロム P450 やフラビンモノオキシゲナーゼによる酸化的代謝を経て、第 II 相解毒系 (phase II) でグルタチオン、グルクロン酸、硫酸との抱合を受け、より親水性の高い化合物に変換される。こうしてできた抱合体は、細胞膜を通過して細胞外へ速やかに排泄される。抱合代謝物の細胞外への能動輸送は、phase II 系の高い効率を維持するうえで非常に重要である。この能動膜輸送に対して薬物代謝における第 III 相解毒系「phase III」という新しい概念とその生理的意義が 1992 年に提唱され、その輸送体は機能と基質特異性に基づいて「GS-X ポンプ」と命名された。その後、MRP1 (ABCC1) や MRP2/cMOAT (ABCC2) などが GS-X ポンプの正体であることが明らかになった。肝臓においては MRP2/cMOAT (ABCC2) が主として発現していて、MRP1 (ABCC1) の発現はほとんどない。MRP2/cMOAT (ABCC2) はグルタチオン抱合体やグルクロン酸抱合体など phase II 代謝物を胆汁中に能動分泌する排出トランスポーター (phase III) として機能する。さらに、

表 8.3 MRP2/cMOAT (ABCC2) の基質特異性

基 質	濃度 (μM)	輸送速度 ($\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$)
ロイコトリエン C ₄	0.05	55
ロイコトリエン D ₄	0.05	15
ロイコトリエン E ₄	0.05	8
N-アセチルロイコトリエン E ₄	0.05	3
ジニトロフェニルグルタチオン	0.20	25
酸化型グルタチオン	0.20	<0.5
酸化型グルタチオン	100	230
17 β -グルクロン酸エストラジオール	0.20	3
ビリルビン-モノグルクロン酸抱合体	0.5	5
ビリルビン-ビスグルクロン酸抱合体	0.5	3
尿酸	5	1.4
メトトレキサート	5	1.5

肝機能検査薬ジスルフォフタレイン、抗がん薬 CPT-11 およびその代謝物 SN-38、プラバスタチンのほか、キノロン系抗菌薬、 β -ラクタム抗生物質の胆汁中排泄クリアランスにも関与することがわかった。MRP2/cMOAT (ABCC2) が輸送する基質を表 8.3 に示す。MRP2/cMOAT (ABCC2) は胆管側膜に局在して、多様な有機アニオンを肝細胞から胆管へ輸送する典型的な有機アニオン排出型トランスポーターである。肝臓以外では、MRP2/cMOAT (ABCC2) は腎臓と消化管にも発現している。

胆管膜には MRP2/cMOAT (ABCC2) のほか、P 糖蛋白質 (ABCB1)、MDR2 (ABCB4)、SPGP/BSEP (ABCB11) などの ABC トランスポーター群が存在する (図 8.3 参照)。P 糖蛋白質 (ABCB1) は比較的脂溶性の高い薬物の胆汁中排泄に関与し、MDR2 (ABCB4) と SPGP/BSEP (ABCB11) はそれぞれ胆汁酸とリン脂質 (ホスファチジルコリン) を胆汁中に排泄する。肝臓から胆管へのリン脂質の分泌において、生理的な界面活性剤である胆汁酸は細胞膜からリン脂質小胞を生成するのに必須である。したがって MDR2 (ABCB4) と SPGP/BSEP (ABCB11) の両トランスポーターが肝臓の胆管側細胞膜において協調的に機能する必要があり、どちらかが機能しなくなると胆汁分泌停止をひき起こす。遺伝的に MDR2 (ABCB4) または SPGP/BSEP (ABCB11) が機能欠損した家系があり、それぞれ遺伝的胆汁うっ滞病 (progressive familial intrahepatic cholestasis) 3 型または 2 型と呼ばれる。

一方、肝細胞の血管側膜には MRP3 (ABCC3) が発現していて、ビリルビン-グルクロン酸抱合体などを血中に排泄する。通常では、ビリルビン-グルクロン酸抱合体は胆管側膜に局在する MRP2/cMOAT (ABCC2) によって胆汁中に排泄されるが、Dubin-Johnson 症候群のように MRP2/cMOAT (ABCC2) の機能が障害したり、胆汁分泌停止が起きた場合には、MRP3 (ABCC3) がビリルビン-グルクロン酸抱合体など代謝物を血中に排泄して、血中ビリルビン濃度が上昇する。ヒト MRP3 (ABCC3) の発現は肝臓のほか副腎、脾臓、腎臓、腸にも見られる。

8.6 腎臓における薬物トランスポーター

腎臓は肝臓とならんで薬剤クリアランスと排泄に大きく関与する器官である。腎臓はまた血漿より糸球体濾過された栄養物質やイオンなど生体必須物質の再吸収とともに、尿細管からの薬物およびその代謝物などの能動的分泌を介して体液恒常性の維持と調整を司っており、高度な選択的物質輸送を主生理機能とする臓器であるため各種トランスポーターの宝庫である。尿細管からの分泌過程は、図 8.3 に示すように、尿細管上皮細胞の血液側膜側底膜および管腔側刷毛縁膜上に局在している有機アニオン輸送系および有機カチオン輸送系の輸送ネットワークによって行われる。

p-アミノ馬尿酸 (PAH) に代表される有機アニオン性化合物を血液から尿細管上皮細胞に取り込む能動的輸送系の存在は古くから知られていたが、1997 年に PAH の輸送活性を指標として発現クローニング法によって有機アニオントランスポーター OAT1 (SLC22A6) が単離された。尿細管上皮細胞側底膜に局在する OAT1 (SLC22A6) は、細胞内で TCA サイクルの中間代謝物として生じるジカルボン酸との交換輸送により、血液中の有機アニオンを細胞内に取り込む。OAT1 (SLC22A6) は PAH のほか、構造上類似性のない多くのアニオン性の薬物・毒物を幅広く認識・輸送する。現在まで OAT ファミリーとして OAT1 (SLC22A6)、OAT2 (SLC22A7)、OAT3 (SLC22A8)、OAT4 (SLC22A11) が確認されているが、OAT1 と 42% のアミノ酸相同性を示す OAT2 も尿細管上皮細胞側底膜に発現し OAT1 (SLC22A6) と同様に多様な有機アニオン性化合物を認識し、血液から細胞内に輸送する。ラ

ット尿細管上皮細胞刷子縁膜には、 Na^+ 非依存性有機アニオントランスポーター (OATP) と、これと70%のアミノ酸相同性を示すOAT-K1が局在している。oatpファミリーには現在oatp1 (slc21a1), oatp2 (slc21a5), oatp4 (slc21a6) が同定され、肝臓、腎臓のほか多くの組織に発現しているのに対し、OAT-K1 (slc21a4) は腎にのみ特異的に発現する。最近、OAT-K1 (slc21a4) と91%のアミノ酸相同性を示すOAT-K2 (slc21a5) がラット腎臓により単離された。oatpは強心配糖体ジゴキシンを輸送するなど広範な基質認識特性を有しているのに対し、OAT-K1 (slc21a4) の基質は限定されており、薬酸や薬酸代謝拮抗薬メトトレキサートを輸送する。最近、尿細管上皮細胞刷子縁膜に局在する Na^+ 依存的リン酸トランスポーターNPT1 (SLC17A1) がPAHのほか β -ラクタム抗生物質など多くの有機アニオンを輸送することが確認された。

尿細管上皮細胞には有機アニオン輸送系とは機能的に独立した有機カチオン輸送系が存在する。1994年側底膜型と推定される有機カチオントランスポーターOCT1 (SLC22A1) が遺伝子クローニングされ、続いてOCT1 (SLC22A1) と67%のアミノ酸相同性を示すOCT2 (SLC22A2) が単離された。OCT1 (SLC22A1) が肝臓と腎臓に発現しているのに対し、OCT2 (SLC22A2) は腎臓に特異的に発現する。いずれも尿細管上皮細胞側底膜上に局在し、テトラエチルアンモニウム (TEA) に代表される多くの有機カチオンを認識し、血液側から細胞内に輸送する。OCT1 (SLC22A1) およびOCT2 (SLC22A2) と約30%のアミノ酸相同性を示す有機カチオントランスポーターOCTN1 (SLC22A4) が単離され、有機カチオンと H^+ 交換輸送することが確認されている。これが従来からその存在が示されてきた有機カチオンアンチポーターであるかどうかは明らかではない。OCTN1 (SLC22A4) と90%のアミノ酸相同性を示すOCTN2 (SLC22A5) は刷子縁膜上に局在して尿中のカルニチンを Na^+ 勾配を駆動力として細胞内に再吸収するトランスポーターであるが、細胞内の有機カチオンを Na^+ 非依存的に尿中に排出する役割をも演ずる。OCTNファミリーは組織に幅広く発現しているのが特徴である。一方、糸球体濾過されたジおよびトリペプチドや β -ラクタム抗生物質の一部は、尿細管上皮細胞刷子縁膜に発現する H^+ /オリゴペプチドトランスポーターPEPT1 (SLC15A1) およびPEPT2 (SLC15A2) を介して細胞内に再吸収される。

腎臓においてP糖蛋白質 (ABCB1) とMRP2/cMOAT (ABCC2) は尿細管上皮細胞刷子縁膜上に局在し、MRP2/cMOAT (ABCC2) は側底膜に局在している。それらの局在様式からP糖蛋白質 (ABCB1) とMRP2/cMOAT (ABCC2) は上皮細胞内から管腔中への異物排出と糸球体濾過された管腔中薬物の尿細管上皮細胞への再吸収を制御し、MRP2/cMOAT (ABCC2) は尿細管管腔から再吸収された薬物の血液中への排出を司っていると推定される。しかしながら、腎臓におけるこれらABCトランスポーター群の生理的および薬物動態学的役割については不明な点も多く、今後の研究課題となっている。

8.7 ABCトランスポーターの多様性

P糖蛋白質 (ABCB1) やMRP2/cMOAT (ABCC2) はABC (ATP-binding cassette) トランスポータースーパーファミリーに属する。ABCトランスポーターは比較的1次構造がよく保存されたモチーフ (Walker AとWalker B) およびATP結合領域 (ABC) や特徴的な膜貫通領域 (TM) をもつ。また、ABC蛋白質の多くがATPに依存した内因的物質 (イオンも含む) や異物とその代謝物の輸送に