

題を克服する試みとして、最近筆者らは肝臓の取り込みおよび排泄輸送体を同時に遺伝子導入した MDCK 細胞を作製し、胆汁排泄評価系としての有用性を示すことに成功している(図3)<sup>1)</sup>。この細胞では、basolateral(血管側)にヒト OATP2 を、apical(胆管側)にヒト MRP2 を発現し、極性輸送を再現することができる。ちなみに OATP2、MRP2 とも肝臓で高発現し、それぞれ肝細胞の血管側、胆管側に発現し、幅広く有機アニオン類を基質とすることから、アニオン性医薬品の胆汁排泄評価を行なう際の最も考慮されるべき輸送体ペアといえる。同様に、ラット Oatp4(ヒト OATP2 に対応)とラット Mrp2 の共発現系も報告されており<sup>2)</sup>、これらの系では、図3に示すように、各遺伝子単発現では検出できない血液から胆汁への基質の経細胞輸送が評価可能である。プラバスタチンなど胆汁排泄性薬物のスクリーニングなどに

用いるなどの展開が期待される。

#### IV. 培養細胞とトランスポーターの極性分布

薬物輸送体に限らず、極性細胞の *in vitro* モデルとして最もよく用いられている細胞は、イヌ遠位尿管上皮細胞由来 MDCK 細胞と、ブタ近位尿管上皮細胞由来 LLC-PK1 細胞である。ともに腎臓由来であるが、発現させる膜蛋白質によっては両細胞でまったく逆の結果が得られることもある。ラット Oat-K1 は、腎臓の近位尿管上皮細胞の管腔側に局在する有機アニオントランスポーターであるが、LLC-PK1 細胞に導入すると basolateral 側に局在する<sup>3)</sup>。一方、MDCK 細胞では apical 側に局在し *in vivo* ラット腎臓での局在と一致する<sup>4)</sup>。ウェスタンブロットの結果、LLC-PK1 細胞では cDNA 配列から予想される約 70 kD にバンドが見られる一方、MDCK 細胞では 50 kD、ラット腎臓の管腔側膜分画でもそれに近い 40 kD 付近の位置にバンドが確認される<sup>4)</sup>。これらの結果を説明する1つの仮説として、Oat-K1 の apical への局在には翻訳後修飾が必要であり、その修飾過程が LLC-PK1 細胞ではラット腎臓あるいは MDCK 細胞とは異なっていることなどが考えられるものの、証明には至っていない。同様の例は、一連の神経伝達物質に対する輸送体でも報告されている<sup>5)</sup>。

LLC-PK1 細胞と MDCK 細胞に関しては、basolateral 膜への移行に必要な因子の1つであるアダプター複合体の  $\mu$ 1B サブユニット発現の有無も注目し値する。 $\mu$ 1B は MDCK 細胞には発現が見られるが、LLC-PK1 細胞では発現していない。このため MDCK 細胞では、LDL 受容体やトランスフェリン受容体が、*in vivo* 同様 basolateral 局在性を示すが、LLC-PK1 細胞では apical にミスソートされる<sup>6)</sup>。一方、LLC-PK1 細胞に  $\mu$ 1B を遺伝子導入すると、これらの受容体は正しく basolateral に局在できるようになることから、少なくともこれらの受容体の正しい局在には  $\mu$ 1B が不可欠であることが示唆される。 $\mu$ 1B が上記輸送体のソーティングの相違に関与するか否かは未解明であるが、*in vitro* で局在を再現する場合は考慮すべきかもしれない。このように膜蛋白質の局在を *in vitro* で解析する際は、用いる宿主細胞の由来臓器、さらには同じ臓器由来であってもその選択には慎重な選択が必要である。しかしながらその選択は、ソーティングに関与する蛋白質因子群の全容が明ら

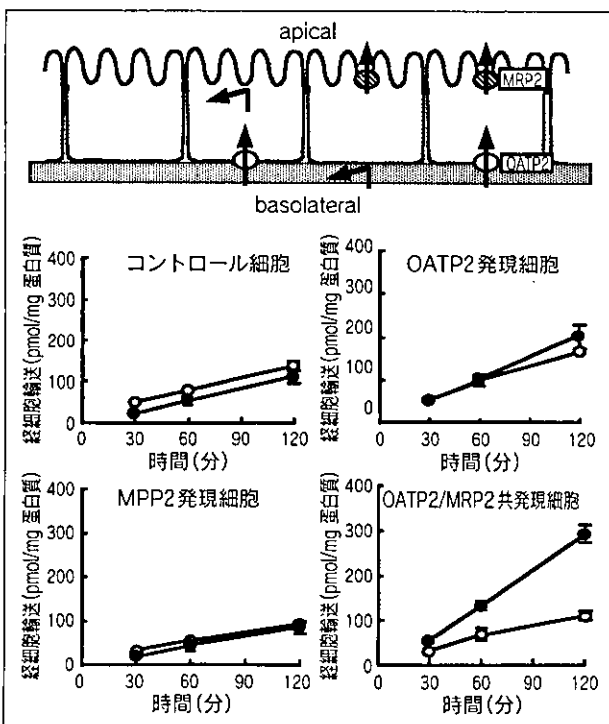


図3 ヒト OATP2 および MRP2 を共発現させた極性細胞を介した経細胞輸送

肝細胞への取り込みに関与する OATP2 および胆汁排泄に関与する MRP2 は、イヌ遠位尿管上皮細胞由来の MDCK 細胞に遺伝子導入することにより、それぞれ basolateral および apical 側に発現される(上図)。この細胞を介した経細胞輸送を測定することにより、*in vivo* における血液から胆汁への肝細胞を介した経細胞輸送を予測することが可能となるものと考えられる。下図には、この細胞系を介したプラバスタチンの経細胞輸送実験の結果を示す。●: basolateral→apical, ○: apical→basolateral (文献1より改変して引用)

かになっていない現在、経験的な要因によって決められている場合がほとんどである。では、以下に肝臓を例として、薬物トランスポーターの極性分布に関する知見を紹介したい。

## V. basolateral ソーティング

### 1. 胆汁酸取り込み輸送体のソーティング機構

NTCP は肝臓の basolateral 側に、ISBT は小腸の apical 側に局在する 7 回膜貫通型の膜蛋白質で、36% 程度のアミノ酸配列類似性を示す。ともに Na<sup>+</sup> 依存的に胆汁酸を細胞内に濃縮的に取り込み、先に述べたように、胆汁酸の腸肝循環に関与する。MDCK 細胞に導入すると、それぞれ *in vivo* 肝臓と小腸での局在を正しく反映し、NTCP は basolateral へ、ISBT は apical に局在し、この系を用いたソーティング機構解析が進められてきた。両輸送体キメラ蛋白質の局在パターンから、両蛋白質の C 末端 (NTCP の 56 個、ISBT の 40 個) 部分はその局在決定に重要であることが推察されている<sup>7)</sup>。ラット NTCP の C 末端には 2 カ所、チロシン残基からなる領域が存在し (Y307-E-K-I, Y321-K-A-A)、それらはヒト、マウスでも保存されている。これらチロシンをアラニンに置換することで apical に移行することから、この領域は basolateral 標的に重要であるということが明らかとされている<sup>8)</sup>。これら変異体が apical に移行する理由としては、変異に伴う apical シグナルの顕在化によるものと考えられる。NTCP には N 末端の細胞外ループに 1 カ所の糖鎖修飾部位が

存在する。NTCP の apical 移行型変異体を N 結合型糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシン処理することにより、apical/basolateral に等しく分布したことから、糖鎖修飾が内因性の apical 局在シグナルであるという仮説が考えられる。

一方、ISBT は小腸で apical に移行するが、その局在シグナルは、やはり C 末端に存在すると考えられている。すなわちラット ISBT の C 末端 40 アミノ酸を欠失させると細胞質に蓄積し、さらにこの 40 個を先のラット NTCP の 56 アミノ酸を欠失させた変異体の C 末端に付加すると apical 移行することが示されている。

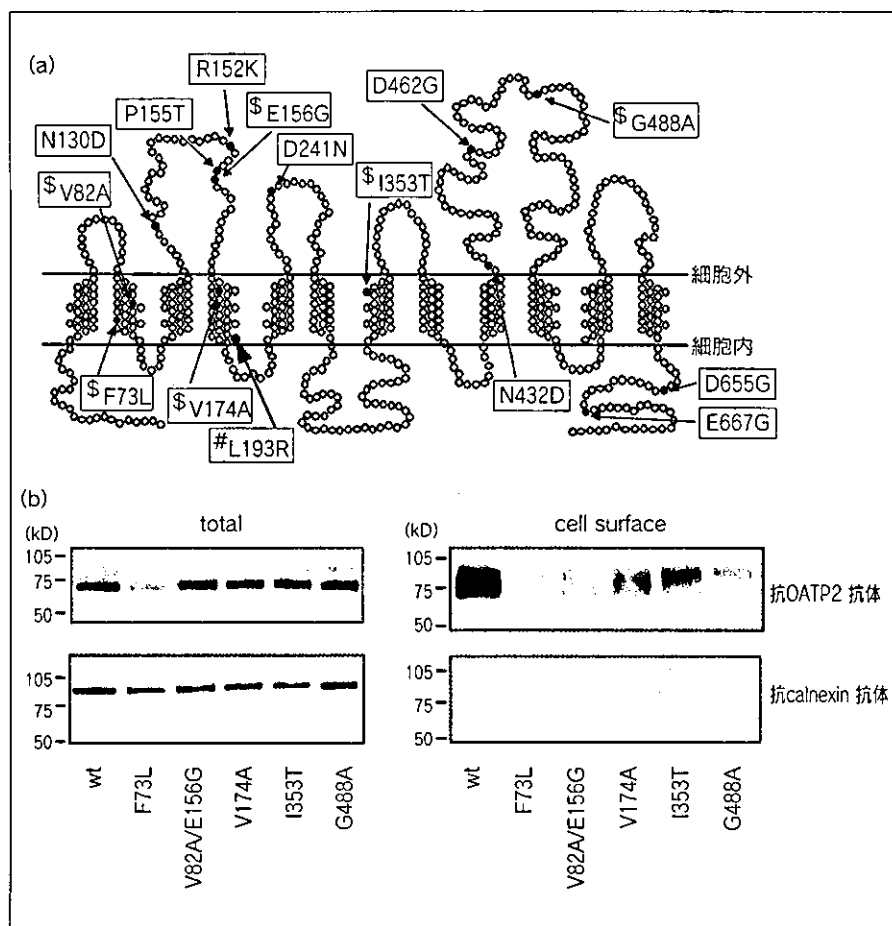


図 4 OATP2 の SNP と細胞膜発現効率への影響

(a) OATP2 の SNP によるアミノ酸置換<sup>9)</sup>。#L193R は Michalski らによって見いだされ、MDCK 細胞において basolateral 膜への移行性が著しく低下していたアミノ酸置換<sup>10)</sup>。\$ は HeLa 細胞膜表面への発現効率の低下していたアミノ酸置換。 (b) a に示したアミノ酸置換のうち、5 種の SNP によるアミノ酸置換体 (\$) では HeLa 細胞全体における OATP2 発現量 (total) は野生型 (wt) と変わらないものの、wt に比較して細胞表面への発現量 (cell surface) が低下している。ネガティブコントロールである calnexin は細胞表面に発現はみられない。細胞表面のビオチン化処理により検出。(文献 9 より一部改変して引用)

## 2. 有機アニオン取り込み輸送体のソーティング機構

OATP2は、ヒト肝臓において、広範な有機アニオン系化合物を取り込む能力を有する。このトランスポーターに関しては、Tironaら<sup>9)</sup>、Michalski<sup>10)</sup>らによって遺伝的多型(SNP)が見いだされ、そのうちのいくつかはソーティング異常に関係している可能性が示唆されている。いくつかのSNP変異体では細胞全体での蛋白質発現量は野生型と変わらないものの、膜への移行性のみ低下していることが、細胞膜表面のビオチン化による比較から明らかとなっている(図4b)<sup>9)</sup>。一方、81人の白人ボランティアから無作為に肝臓でのOATP2蛋白質発現量をスクリーニングした結果、1人のサンプルで発現量の激減が観察され、このサンプルではOATP2遺伝子上に3カ所のアミノ酸置換が同定されている<sup>10)</sup>。うち2カ所(N130D, P155T)はTironaらのSNP<sup>9)</sup>に含まれ、ともに2番目の細胞外ループに存在する一方、残りの1カ所(L193R)は新規な変異であり、4番目の膜貫通部位の細胞質側近傍に位置していた(図4a)。これら3種類の変異を別個に導入し、MDCK II細胞に発現させると、L193R変異体は細胞膜にはまったく移行せず、細胞質に留まることが確認された<sup>10)</sup>。膜移行性の低下したOATP2では、基質輸送の $V_{max}$ も膜表面発現量に応じて低下していることから、薬物体内動態の個人差の解析には、全細胞あたりの蛋白質発現量のみならず、SNPによる薬物輸送蛋白質の膜移行率変化も考慮する必要があると思われる。

## VI. 胆管側への輸送体のソーティング

### 1. *in vivo* 実験条件下におけるソーティング研究

図2に示すように、肝臓は特殊な形態を示すが、膜蛋白質の輸送経路に関しても特殊であると考えられてきた。肝臓で生合成された蛋白質が、膜へ移行する過程の研究は、80年代から盛んに行なわれ、当初は肝細胞には、MDCK細胞でみられるようなゴルジ体から胆管側膜への直接的な移行経路(図2a)はなく、常にbasolateralを経由するもの(間接経路)と考えられてきた(図2b)。その根拠はラット肝臓を<sup>35</sup>Sで一定時間還流し、全蛋白質をラベルしたのち、放射能を含まない還流を行ない、以後経時的に肝臓を摘出し、細胞膜を分画してapical

蛋白質マーカーとしてDPPIV、アミノペプチダーゼN、5'-ヌクレオチダーゼ、cCAM105<sup>11,12)</sup>などの蛋白質抗体で免疫沈降を行なう、いわゆるパルスチェイス実験から得られている。しかし、近年その説に反して、いくつかの一次性能動輸送担体は、肝細胞で直接apicalに移行することが示されている。BSEPは、パルスラベル後basolateralに検出されることなく、時間依存的にapicalに検出される<sup>13)</sup>。また、BSEPの胆管側膜への移行をリアルタイムで追跡すると、ある一定の経路を辿って直接ゴルジからapical方向へ移動していることがビデオ撮影から視覚的に示されている<sup>14)</sup>。同じく胆管側に局在する膜蛋白質であるMDR1に関しても、時間的にはBSEPより遅れるものの、やはり直接apicalに移行することがパルスチェイス実験から明らかとなっている<sup>13)</sup>。

### 2. apical膜蛋白質のリサイクリング

上記の肝細胞のパルスラベル実験で、<sup>35</sup>S標識されたBSEPは直接apicalへ移行することを述べたが、途中ゴルジから消失し、apicalにも検出できない時間が30分ほど存在する。この時間ラグはMDR1ではみられず、BSEP特異的な細胞内コンパートメントの存在を示唆している<sup>13)</sup>。MRP2やBSEPは、定常状態下でapicalのすぐ内側の小胞構造の中(sub apical compartment; SAC)に、ある割合で検出されることが電子顕微鏡像で確認されている。これらSACの存在意義は明らかとされていないが、短時間の刺激に対するこれら輸送体の迅速な活性制御に関与していることが示唆されている。たとえばNa<sup>+</sup>濃度を下げた低浸透圧バッファーで肝還流を行なうと、胆汁酸の胆汁排泄は一過性の上昇に引き続く持続的な上昇がみられる。一過性の上昇はBSEPを含み、かつ胆汁酸を濃縮的に蓄積したSAC小胞の胆管側膜への融合促進による胆汁酸分泌の結果と考えられ、わずか1~2分でピークに達する。胆汁酸排泄はその後ゆるやかに上昇し続け、10分後に約30%上昇したところで定常状態となる。後半でみられるゆるやかな胆汁酸排泄速度の上昇は、BSEPのapical膜表面分布量の増加を反映したものと考えられる<sup>15)</sup>。低浸透圧還流は、同時にMRP2のapical膜への局在も上昇させることが知られており<sup>16)</sup>、BSEPとMRP2がともにSACに存在していることを示唆するものである。一方、高浸透圧にすると、BSEPとMRP2は内在化するが、このときは両蛋白質がむしろ別個の小胞に封入されていることを示唆するデ

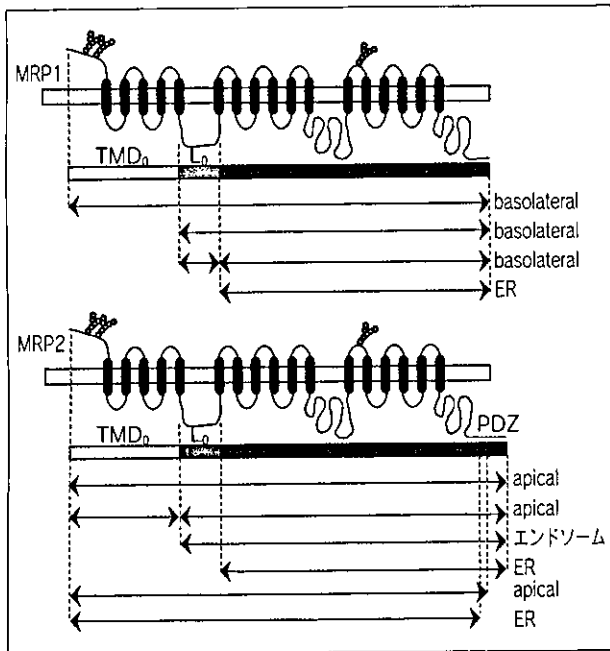


図5 MRP1とMRP2の局在化決定部位  
MRP1のbasolateral膜局在にはL<sub>0</sub>領域が、MRP2のapical膜局在にはTMD<sub>0</sub>領域およびC末端(PDZ蛋白質との相互作用かどうかは不明)が重要であることが示唆されている。ER：小胞体。

ータ(わずか15%が両者を含む小胞であった<sup>17)</sup>)も得られており、内在化に関する介在因子がヘテロである可能性も考えられる。低浸透圧による胆汁流量の上昇は、細胞容積の膨潤に伴う活性化が知られるMAP(mitogen activated protein)キナーゼの一種のErk(extracellular signal regulated kinase)-1とErk-2のPKC(protein kinase C)非依存的なリン酸化に伴う活性化と相関することが示されている<sup>15)</sup>。一般に、MAPキナーゼの基質には微小管と相互作用する蛋白質も含まれる。微小管の脱重合剤であるコルヒチン処理により、浸透圧変化に伴う胆汁酸の胆汁排泄変化は消失することも観察されており<sup>18)</sup>、BSEPの胆管側膜近傍での局在変化に微小管とBSEPの直接的な、あるいは介在因子を介した間接的な相互作用の重要性が示唆される。

### 3. MRP2の胆管側局在化機構

MRP1と2は、図5に示すように17回推定膜貫通構造からなり、互いに48%の相同性を有している。ATPの加水分解を利用して抗がん剤やグルクロン酸抱合体・グルタチオン抱合体を含む有機アニオン性化合物を積極的に細胞外に排出する。生体内、とくに極性細胞での役割として、MRP2は肝臓の胆管側(apical)に発現し、基

質の胆汁排泄に関与するのに対し、MRP1はほぼ全身に分布し、たとえば血液脳脊髄液関門の血管側(basolateral)で脳脊髄液への薬物移行性を制限している。MRP2の遺伝的機能発現低下は、黄疸を伴うDubin-Johnson症候群[→今月のKey Words (p.104)]を惹起するが、その機構の1つとして、後述するように胆管膜への発現ができず、MRP2が小胞体からプロテアソームに移行して分解される、いわゆる細胞内ソーティング障害が原因のものも報告されている<sup>19,20)</sup>。また、薬物処理、あるいは免疫性刺激によって胆管膜から細胞内へと内在化することが知られている。生理的な観点からも、その細胞内ソーティング機構が多くの研究者の興味を惹き、MRP2、およびそのホモログであるMRP1の局在性の違いに着目した研究がここ数年精力的になされてきた。まだソーティングに決定的なドメイン解明には至っていないものの、表1で示した薬物輸送体のなかでは最も情報が蓄積されている輸送体である。

MDCK II細胞において、MRP1はbasolateralへ、MRP2はapicalに局在し、これらは*in vivo*での発現部位と対応している。MRP1とMRP2の局在については以下の4点にまとめられ、図5に示すTMD<sub>0</sub>(transmembrane domain)およびL<sub>0</sub>(linker)の重要性が、MRP2、MRP1でそれぞれ指摘されている。これらの結果は、①TMD<sub>0</sub>はMRP1ではbasolateral移行性に不要、②TMD<sub>0</sub>はMRP2ではapical移行性に必要、③L<sub>0</sub>はMRP1ではbasolateral移行性に必要、④L<sub>0</sub>はMRP2ではapical移行性に不要というものである。MRP1に関するこれらの結論は、TMD<sub>0</sub>を欠損させたL<sub>0</sub>MRP1だけでも正常にbasolateralへ移行するが、TMD<sub>0</sub>L<sub>0</sub>を欠損させたΔMRP1が細胞質に留まること、さらにL<sub>0</sub>とΔMRP1をMDCK II細胞で共発現させるとbasolateralに移行性が回復することに基づいている<sup>21)</sup>。一方、MRP2に関する結論はTMD<sub>0</sub>L<sub>0</sub>を欠損するΔMRP2はゴルジ体へも到達できずに、小胞体からプロテアソームに移行して分解されるが、TMD<sub>0</sub>のみ欠損したL<sub>0</sub>MRP2ではゴルジ体で糖鎖修飾を受けてエンドソームまでは移行していること、さらにここにTMD<sub>0</sub>を共発現させるとapicalへの移行性が回復するという根拠に基づいている<sup>22)</sup>。

MRP2のC末端はPDZ蛋白質結合認識配列(-STKF)であることから、その部分の重要性も注目されてきた。PDZ蛋白質とは、PSD95、Dlg、ZO-1で保存されたPDZ領域を有する細胞質蛋白質で、通常分子内に複数のPDZ

領域を有する。一般に標的蛋白質のC末端細胞質部分に存在するT/S-X-Φに結合する(Xは任意のアミノ酸、Φは脂溶性アミノ酸)。1つのPDZ蛋白質を介してホモ・ヘテロ蛋白質群が連なりうることから、PDZ蛋白質は蛋白質間の効率的なシグナル伝達を行なう足場としての重要性、あるいは膜蛋白質をそこに安定につなぎ止めるアンカー蛋白質としての重要性が多数報告されている。たとえば、GABA輸送体であるBGT1は、C末端のPDZ結合モチーフを介してPDZ蛋白質LIN-7と結合することにより、basolateral膜に安定に保持される<sup>23)</sup>。PDZ結合モチーフを欠いた場合でもbasolateralに移行はするものの、速やかに内在化してしまうことが示されている<sup>23)</sup>。MRP2のapical膜への発現・保持にも、そのC末端と相互作用することが*in vitro*で示されているPDZ結合蛋白質、PDZ-K1の関与が推測された<sup>24)</sup>。しかしながらC末端部分を欠落させたMRP2では、apicalへの移行性が消失したとする報告が1報<sup>25)</sup>、正常にapicalに移行したとする報告が2報<sup>22, 26)</sup>報告され、まだ統一した見解に至っていない。NiesらはMRP2のN末端にGFPタグを付加し、C末端アミノ酸を順次欠失したMRP2変異体を用いて解析を行ない、C末端から11~15個の部分がapical側膜移行性に重要と報告している(図5)<sup>26)</sup>。

先述したように、MRP2とPDZ蛋白質との相互作用がapicalへのソーティングに必須かという点に対してはまだ結論は得られていないが、PDZ結合蛋白質が膜蛋白質の内在化を含めたapical膜周辺でのターンオーバー、あるいはMRP2の輸送機能そのものに関与している可能性は否定できない。生合成された膜蛋白質がapicalとbasolateralにどのようにして振り分けられるかという問題同様、いかにそこに保持されるかという点も、膜蛋白質の局在化を考えるうえでは重要な課題と考えられる。

最近、ERM蛋白質の1つであるRadixinのノックアウトマウスで、MRP2の特異的な発現低下とそれに伴う黄疸症状が確認され、MRP2の胆管側への安定発現に影響する蛋白質として注目されている<sup>27)</sup>。ここで、ERM<sup>28)</sup>はEzrin, Radixin, Moesinの互いに70%前後のアミノ酸相同性を有する細胞質蛋白質の総称で、分化した極性細胞膜の裏打ち構造としてapical膜近傍に局在する。多くの膜蛋白質と結合する一方で、微絨毛先端に向けて伸びるFアクチンと結合し、膜蛋白質と細胞骨格をつ

なく役目を有していると考えられる。さらにFアクチンは微絨毛の根元でミオシンと結合し、胆管収縮に関与している。実際、アクチンの脱重合阻害薬ファロイジンにより、MRP2が内在化し、胆汁うっ滞を発症することが示されている<sup>29)</sup>。正常マウス肝臓およびMDCK細胞にMRP2を発現させ、MRP2抗体で免疫沈降を行なうとRadixinが共沈してくること、C末端細胞質領域を欠損させたMRP2では共沈はみられないことから<sup>27)</sup>、MRP2のC末端細胞内領域がERMと相互作用し、MRP2のapicalへのソーティングあるいはそこでの安定保持に働いていることが推察される。ERMはPDZ蛋白質には属さず、MRP2のC末端PDZ結合モチーフを介している可能性は低いですが、それ以外のC末端細胞質部分のいずれか、あるいはPDZ蛋白質を仲介としたERMとの結合を介して、MRP2がERMによって裏打ちされているものと推察される。ERMおよびPDZ蛋白質が、MRP2のソーティングと膜での安定化のどちらに寄与しているのかなど、今後これらヘテロ蛋白質網の解析が待たれる。

#### 4. BSEP, MRP2のソーティング障害と遺伝性疾患

胆管側膜に局在するトランスポーターのソーティングの異常が遺伝性疾患の原因となることもある。MRP2に関しては、その遺伝的機能低下がDubin-Johnson症候群として表在化することから、1996年の遺伝子単離後は患者でのMRP2変異部位の同定と機能との関連が進められてきた。その結果、いくつかの変異型MRP2では、膜への移行が妨げられていることが示されている<sup>19, 20)</sup>。すなわちN末端側のATP結合部位中のアルギニンがトリプトファンに置換したMRP2<sup>20)</sup>、あるいはC末端側のATP結合部位中のアルギニンとメチオニンの2アミノ酸を欠損したMRP2<sup>19)</sup>は小胞体からプロテアソームに移行して分解されることで膜への移行が低下していることが示されている。

BSEPの遺伝的機能低下は、進行性家族性肝内胆汁うっ滞II型(PFICタイプII)の原因となる。PFICIIは小児で発症する重得な遺伝病で、肝移植が必要とされる。PFICII患者のBSEP遺伝子にみられるアミノ酸置換をラットBSEPに導入することにより、その機能欠損タイプの分類がなされた。MDCK細胞へのcDNA導入実験の結果、検討された7種類のアミノ酸置換のうち、5種類でapical移行性が消失した<sup>30)</sup>。これら5種の変異部

位は蛋白質配列中の特定の領域に偏っておらず、また非極性細胞である昆虫細胞 Sf9 にこれら BSEP を高発現させ調製した細胞膜小胞(細胞膜, 小胞体膜も含むと考えられる)では, BSEP 発現量は胆汁酸輸送のみられる野生型と同程度であるにもかかわらず, これら変異体では輸送がまったく認められなかった。以上のことより, これらの変異により特定の細胞膜局在化シグナルの消失よりも,むしろ蛋白質全体のミスフォールディングによる蛋白質の安定性低下が生じ, 結果として BSEP 機能が消失したものと考えられる。事実, 最も膜への発現が低下している変異体 G238V では, プロテアソーム阻害剤添加により, MDCK II 細胞で顕著な細胞質への蓄積が観察されている<sup>30)</sup>。

一方, 嚢胞性線維症の多くは, CFTR の 508 番目のアミノ酸欠損により説明されるが, この変異は蛋白質のミスフォールディングにつながり, 小胞体でユビキチン化後プロテアソームへ移行し分解されることが示されている。これまで見いだされている BSEP や MRP2 変異体に関しては, ユビキチン化を含めた詳細な分解経路の解析はなされていないが, 同様の経路でこれら変異蛋白質が分解されているものと推察され, 広い意味での膜移行障害が原因の遺伝病と考えられる。

■ おわりに

薬物輸送体の多くは, 進化上遺伝子の変異をある程度容認することにより, 多様な基質特異性を獲得してきたと考えてもよいだろう。一方で, 局在は生体機能維持のためには厳密にコントロールされるべきであり, 実際種をこえて, あるいはファミリー間で意義のある局在分布が保持されている。可能性として, 薬物輸送体の局在化には幾重にもちりばめられた局在化暗号が関与しており, 変異などにより 1カ所暗号が無効になったとしても, 局在パターンの変化として表在化しにくいような仕組みがあるのかもしれない。事実, 薬物輸送体の局在に明確に単独のモチーフが決定的に関与しているという例は, いまのところない。薬物輸送体に限らず, ソーティングの暗号あるいは安定保持の暗号を 1つ1つ解読し, さらにそこに相互作用する補助因子の同定を行なうには, まだ時間がかかると思われる。しかも, その先にはこれら複数の暗号の組合せによって決定される複雑なソーティング機構が存在するはずである。そこにどれだけ普遍性のあるルールを見いだせるかが今後の課題である。

- 1) Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T., Sugiyama, Y. : *J. Biol. Chem.*, **277**, 6497-6503 (2002)
- 2) Cui, Y., Konig, J., Keppler, D. : *Mol. Pharmacol.*, **60**, 934-943 (2001)
- 3) Masuda, S., Saito, H., Inui, K. I. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1039-1042 (1997)
- 4) Masuda, S., Ibaramoto, K., Takeuchi, A., Saito, H., Hashimoto, Y., Inui, K. I. : *Mol. Pharmacol.*, **55**, 743-752 (1999)
- 5) Gu, H. H., Ahn, J., Caplan, M. J., Blakely, R. D., Levey, A. I., Rudnick, G. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 18100-18106 (1996)
- 6) Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., Mellman, I. : *Cell*, **99**, 189-198 (1999)
- 7) Sun, A. Q., Ananthanarayanan, M., Soroka, C. J., Thevananther, S., Shneider, B. L., Suchy, F. J. : *Am. J. Physiol.*, **275**, G1045-1055 (1998)
- 8) Sun, A. Q., Arrese, M. A., Zeng, L., Swaby, I., Zhou, M. M., Suchy, F. J. : *J. Biol. Chem.*, **276**, 6825-6833 (2001)
- 9) Tirona, R. G., Leake, B. F., Merino, G., Kim, R. B. : *J. Biol. Chem.*, **276**, 35669-35675 (2001)
- 10) Michalski, C., Cui, Y., Nies, A. T., Nuessler, A. K., Neuhaus, P., Zanger, U. M., Klein, K., Eichelbaum, M., Keppler, D., Konig, J. : *J. Biol. Chem.*, **277**, 43058-43063 (2002)
- 11) Bartles, J. R., Feracci, H. M., Stieger, B., Hubbard, A. L. : *J. Cell Biol.*, **105**, 1241-1251 (1987)
- 12) Schell, M. J., Maurice, M., Stieger, B., Hubbard, A. L. : *J. Cell Biol.*, **119**, 1173-1182 (1992)
- 13) Kipp, H., Arias, I. M. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 15917-15925 (2000)
- 14) Sai, Y., Nies, A. T., Arias, I. M. : *J. Cell Sci.*, **112**, 4535-4545 (1999)
- 15) Noe, B., Schliess, F., Wettstein, M., Heinrich, S., Haussinger, D. : *Gastroenterology*, **110**, 858-865 (1996)
- 16) Kubitz, R., D'Urso, D., Keppler, D., Haussinger, D. : *Gastroenterology*, **113**, 1438-1442 (1997)
- 17) Schmitt, M., Kubitz, R., Lizun, S., Wettstein, M., Haussinger, D. : *Hepatology*, **33**, 509-518 (2001)
- 18) Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F., Gerok, W. : *Biochem. J.*, **291**, 355-360 (1993)
- 19) Keitel, V., Kartenbeck, J., Nies, A. T., Spring, H., Brom, M., Keppler, D. : *Hepatology*, **32**, 1317-1328 (2000)
- 20) Hashimoto, K., Uchiumi, T., Konno, T., Ebihara, T., Nakamura, T., Wada, M., Sakisaka, S., Maniwa, F., Amachi, T., Ueda, K., Kuwano, M. : *Hepatology*, **36**, 1236-1245 (2002)
- 21) Bakos, E., Evers, R., Szakacs, G., Tusnady, G. E., Welker, E., Szabo, K., de Haas, M., van Deemter, L., Borst, P., Varadi, A., Sarkadi, B. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 32167-32175 (1998)
- 22) Fernandez, S. B., Hollo, Z., Kern, A., Bakos, E., Fischer, P. A., Borst, P., Evers, R. : *J. Biol. Chem.*, **277**, 31048-31055 (2002)
- 23) Perego, C., Vanoni, C., Villa, A., Longhi, R., Kaech, S. M., Frohli, E., Hajnal, A., Kim, S. K., Pietrini, G. : *EMBO J.*, **18**,

- 2384-2393(1999)
- 24) Kocher, O., Comella, N., Gilchrist, A., Pal, R., Tognazzi, K., Brown, L. F., Knoll, J. H. : *Lab. Invest.*, 79, 1161-1170(1999)
- 25) Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M., Board, P. G. : *J. Biol. Chem.*, 276, 20876-20881(2001)
- 26) Nies, A. T., Konig, J., Cui, Y., Brom, M., Spring, H., Keppler, D. : *Eur. J. Biochem.*, 269, 1866-1876(2002)
- 27) Kikuchi, S., Hata, M., Fukumoto, K., Yamane, Y., Matsui, T., Tamura, A., Yonemura, S., Yamagishi, H., Keppler, D., Tsukita, S. : *Nature Genet.*, 31, 320-325(2002)
- 28) Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R., Reczek, D. : *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, 113-143(2000)

- 29) Rost, D., Kartenbeck, J., Keppler, D. : *Hepatology*, 29, 814-821(1999)
- 30) Wang, L., Soroka, C. J., Boyer, J. L. : *J. Clin. Invest.*, 110, 965-972(2002)

**伊藤晃成**

略歴：2000年東京大学大学院薬学研究所博士後期課程修了。同年より千葉大学薬学部助手。研究テーマ：胆管側膜有機アニオン排泄輸送体の機能調節と胆汁流調節。関心事・抱負：輸送体機能異常に起因する遺伝病の同定/疾患時の輸送体機能変動と生理的意義づけ。

●symposium

**大阪バイオサイエンス研究所 創立 15 周年記念シンポジウム**

日時 平成 15 年 2 月 6 日(木) 9:30~17:45  
 場所 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)12 階 特別会議場(大阪市北区中之島 5-3-51)  
 プログラム 「分子細胞生物学」座長：谷口維紹(東大)  
 演者：赤城 剛(OBI)/佐邊壽孝(OBI)/ジェームス E. ダーネル Jr. (ロックフェラー大学)  
 「研究所 OB 特別講演」座長：高井義美(阪大)  
 演者：長田重一(阪大)  
 「脳神経機能」座長：久野 宗(京大)  
 演者：裏出良博(OBI)/内匠 透(OBI)/古川貴久(OBI)/シドニー プレンナー(ソーク生物研)  
 「未来の基礎研究を担う人々に伝えたいこと」座長：早石 修(OBI)  
 岸本忠三(阪大)/藤野政彦(武田薬品)/井村裕夫(総合科学技術会議)  
 参加人数 200 名(参加費無料)  
 申込方法 住所、氏名、年齢、電話番号、所属を明記し、葉書または FAX, E-mail にて下記までご連絡下さい。  
 申込締切 定員になり次第締切  
 申込先 〒565-0874 吹田市古江台 6-2-4 大阪バイオサイエンス研究所「シンポジウム」係  
 Tel.06-6872-4812 FAX 06-6872-4818 E-mail: registration@obi.or.jp

<http://www.obi.or.jp/sympo1.html>

●symposium

**第 6 回アルツハイマー病ミニシンポジウム  
 アルツハイマー病の神経病変の意義について**

日時 2003 年 2 月 1 日(土) 10:00~  
 場所 鉄門講堂(東京大学医学系研究科教育研究棟 14 階)  
 プログラム ◆アミロイド仮説からシナプス仮説への新潮流について：アミロイド仮説に固執する根拠 森 啓(大阪市大)/脳の老化とアルツハイマー病 高島明彦(理研)/GPI アンカー型プリオン(通常のプリオン)と分泌型プリオン 村本 環(東北大)  
 ◆アミロイド蛋白の正常と異常： $\gamma$ セクレターゼ複合体の形成と機能 岩坪 威・富田泰輔(東大)/アミロイド $\beta$ の神経毒性と凝集能 清水孝彦(都老人研)/ $\gamma$ セクレターゼとシグナル伝達 大河内正康・武田雅俊(阪大)  
 ◆細胞体内封入体の病理学的意義——神経変性疾患の病理学所見の分子解剖：AR-JP および関連疾患における封入体の意義 高橋 均(新潟大)/ユビキチン・プロテアソームシステムによる蛋白質の品質管理 田中啓二(都臨床研)  
 ◆分子治療法と経験治療法：A $\beta$ 代謝研究の最近の進展 岩田修永(理研)/NSAIDsの抗アルツハイマー病効果 森原剛史・Greg Cole・武田雅俊(UCLA, 阪大)/治療法としてのメラトニンの分子背景 松原悦郎(岡山大)  
 ◆ワクチン療法の展望：アルツハイマー病の脳内免疫反応 秋山治彦(都精神研)/vaccination and A $\beta$  transport DeMattos, R.B.(ワシントン大)/A $\beta$  vaccination and inflammation Dickson, D.(メイヨークリニック)  
 参加方法 事前登録をお願いします。代表者をご連絡される場合も、各参加者のご氏名をお知らせ下さい。  
 会費 2,000 円(懇親会費含)  
 連絡先 大阪市立大学医学研究科脳神経科学 森 啓(世話人) E-mail: neurosci@med.osaka-cu.ac.jp FAX 06-6645-3922

<http://www.prit.go.jp/chihou/>

# トランスポーター研究に基づく医薬品開発

Drug transporter studies for drug discovery and development

吉末 訓弘



楠原 洋之



杉山 雄一



1994年ごろから薬物トランスポーターのクローニングがはじまったことをきっかけに、トランスポーター研究は近年急速な進歩をとげている。トランスポーターの輸送メカニズム、分子認識に基づいた創薬を行うことにより、理想的な動態特性を持つ薬の開発も可能になると期待され、医薬品開発においてもトランスポーター研究への関心が高まっている。

キーワード：トランスポーター、医薬品開発、動態特性、P-glycoprotein

## はじめに

2001年ヒトゲノム配列が明らかになり、医薬品の開発プロセスは大きく変化している。ゲノム情報をもとにターゲットタンパクを同定し、そのタンパクに結合するリード化合物をコンビナトリアルケミストリーと呼ばれる方法を用いて大量に合成し、それら候補化合物の中から薬理活性を持つ化合物をハイスループットスクリーニングにより選別し、効率よく前臨床、臨床試験へと導くことができるようになった。しかしその反面、薬理活性を指標にして薬を選別していくと、脂溶性が高い薬物が選択されてくる傾向がある。その結果、臨床試験段階でバイオアベイラビリティ(生物学的利用率)が低い等の体内動態特性が悪いため、期待される薬効が発揮されず開発中止になる例が数多く出てきた。そういうことへの反省点から、現在では、開発の早い段階で動態特性の最適化が多くの製薬企業において実施されている。

薬剤をヒトに投与した場合、その薬剤の動態特性は、吸収、体内分布、代謝および排泄によって規定される。

従来、生体に必要な物質の取込み、あるいは異物排出の機能を担っているトランスポーターは、広範な基質選択性を示し、薬物の体内動態に重要な役割を果たしている。現在までにトランスポーター研究の成果に基づいて開発された医薬品は存在しない。しかし、近年の急速なトランスポーター研究の進歩の成果によって輸送メカニズム、分子認識が明らかとなり、それに基づいた創薬を行うことにより、理想的な動態特性の医薬品開発が可能になると期待され<sup>1)</sup>、トランスポーター研究の必要性を世界中の企業が認識している。本稿では、臨床におけるトランスポーターが関与する事例を挙げ、それらの事例から医薬品開発につながるトランスポーター研究を考察した。

## 1. トランスポーターを利用した体内分布の制御

近年のトランスポーター研究の結果、数多くのトランスポーターが同定され、その中には消化管、肝臓あるいは腎臓等の臓器特異的に発現しているものもあることが明らかになった(図1)<sup>2)</sup>。これら発現特性を利用することで、最適な薬剤分布が可能になると考えら

筆者紹介：よしすえ・くにひろ(YOSHISUE, Kunihiro) 東京大学薬学研究科(Grad. Sch. of Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo) 分子薬物動態学教室 研究生 1992年九州大学大学院薬学系研究科修士課程修了 薬学博士 専門：生物薬剤学 連絡先：〒113-0033 文京区本郷7-3-1 E-mail yoshisue@mol.f.u-tokyo.ac.jp(勤務先)  
 くすはら・ひろゆき(KUSUHARA, Hiroyuki) 同上 助手 1997年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了 薬学博士 専門：生物薬剤学 連絡先：同上(勤務先)  
 すぎやま・ゆういち(SUGIYAMA, Yuichi) 同上 教授 1974年東京大学大学院薬学系研究科博士課程中途退学 薬学博士 専門：生物薬剤学 連絡先：同上(勤務先)



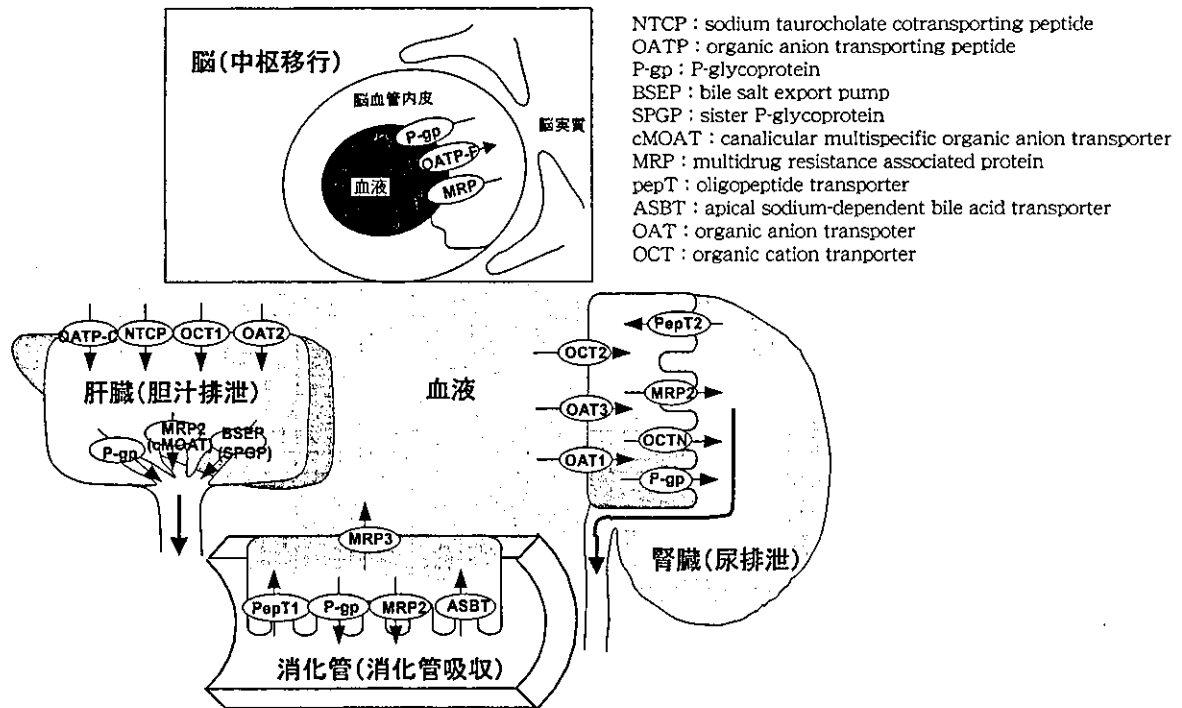


図1 ヒトにおける主な薬物輸送トランスポーターと薬物動態(文献<sup>2)</sup>より改変)

れる。

その例として、高脂血症治療薬であるプラバスタチン(HMG-CoA還元酵素阻害剤)が挙げられる。プラバスタチンはカルボン酸を持つ水溶性の高い薬剤で、経口投与後トランスポーターが関与した消化管吸収、肝臓への取込み、胆汁中への排泄過程を経て<sup>3)</sup>、効率のよい腸肝循環を受けている。この薬剤の標的組織が、HMG-CoA還元酵素が豊富に存在する肝臓であること、またヒトにおいても初回通過で約9割以上が肝臓に取り込まれていると推定されることから、薬剤を標的組織に長く滞留させ、循環血中薬物濃度を低くすることにより、他の組織における副作用の軽減に役立っていると考えられる。このようにトランスポーターを考慮したドラッグデザインを行うことにより、吸収・分布・排泄過程において理想的な動態特性を付与することも可能と考えられる。

## 2. トランスポーターを利用した排泄過程の制御

肝臓および腎臓は、体内に吸収された薬剤の消失組織であり、薬剤の体内動態を特徴づける重要な組織である。肝臓から胆汁、あるいは腎臓から尿中、いずれか一方の経路によってのみ消失する薬剤を考えた場合、

疾患あるいは加齢等の原因により消失組織の機能が低下すると、その薬剤の消失は遅延し、血中濃度が上昇することが予測される。また消失組織の機能低下の程度に個体間変動がある場合、それは血中濃度の個人差が大きい薬剤になる。肝臓および腎臓には多様なトランスポーターが血管側、管腔側双方の細胞膜にそれぞれ局在しており、これらのトランスポーターで肝臓、腎臓いずれかに多く発現しているトランスポーターに認識される分子をデザインすることで、肝腎消失の振分けの制御が可能と考えられる。

テモカプリルを例に挙げると、降圧薬の一種であるアンジオテンシン変換酵素阻害剤(ACE阻害剤)のほとんどはプロドラッグ(薬物前駆体)であり(図2)、体内でカルボキシエステラーゼによって活性体に変換されたあと、主に尿中に排泄される。しかしテモカプリルは、他のACE阻害剤と異なり、糞中にも排泄される<sup>4)</sup>。この動態特性の要因には、胆管側に存在し種々の有機アニオンを肝臓から胆汁中へ排泄するトランスポーターであるMRP2の基質認識により説明される<sup>5)</sup>。他のACE阻害剤の活性代謝物がMRP2の基質にならないのに対し、テモカプリルの活性体テモカプリラートはMRP2の基質になるため、胆汁中にも排泄

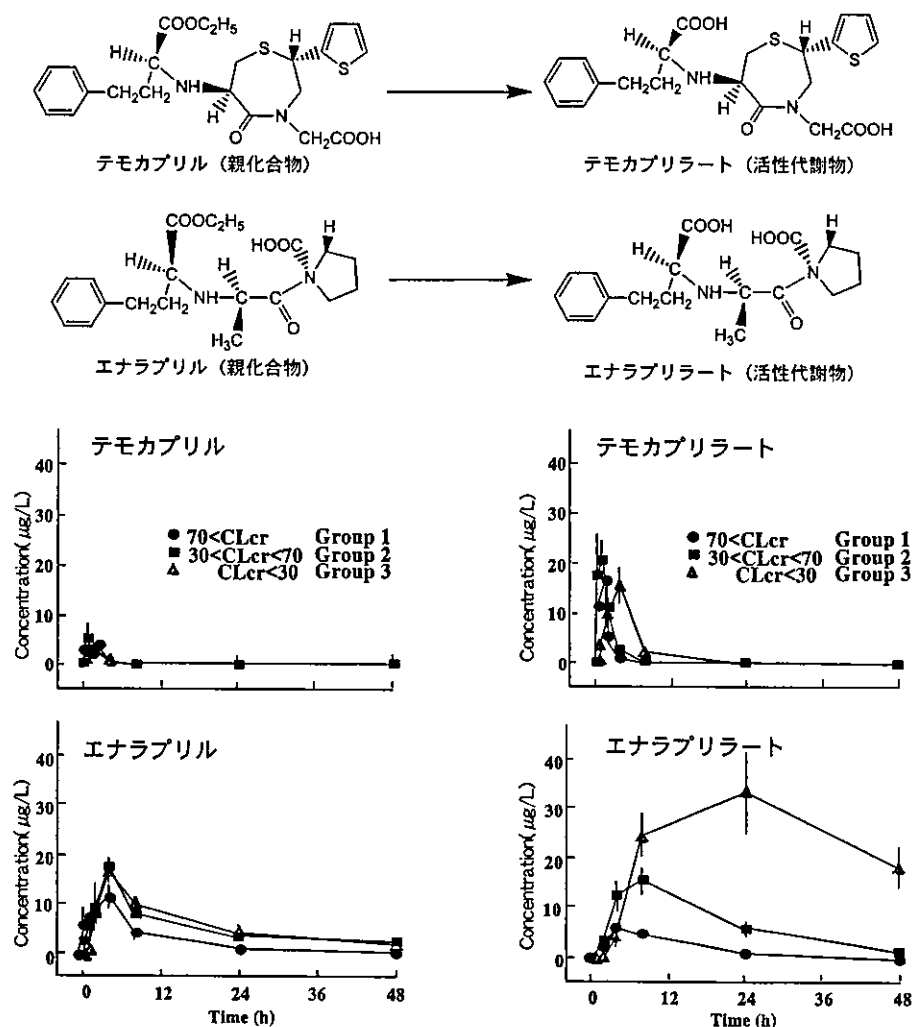


図2 腎機能低下患者におけるテモカプリルとエナラプリルの体内動態(文献<sup>9)</sup>より改変)

される。そのため、腎機能が低下した患者に投与された場合、他の ACE 阻害剤(図2ではエナラプリル)では親化合物の体内動態変化は少ないものの、活性代謝物は腎機能低下に伴って血中濃度が上昇する。しかし、テモカプリルは活性代謝物の体内動態の変動が少ない薬剤である(図2)<sup>9)</sup>。ACE 阻害剤が主に腎機能が低下している高齢者に投与されることを考えると、好ましい動態特性を持った薬剤となっている。

### 3. トランスポーターを介した薬物間相互作用

トランスポーターを介した薬物間相互作用は、代謝酵素における相互作用ほど臨床問題となっている例は今のところ乏しい。その中で強心配糖体ジゴキシンは P-glycoprotein(P-gp)の基質であり、治療域が狭

いために血中濃度の変動が問題になりやすく、相互作用の例が比較的多く報告されている。ジゴキシンと抗不整脈薬であるキニジン、ベラパミル等を併用すると、ジゴキシンの血中濃度が上昇することが知られている。これは、キニジン、ベラパミルが P-gp 阻害活性を有することから、ジゴキシンの P-gp を介した尿中排泄・胆汁中排泄を阻害したため相互作用が生じたと推察されている(図3)。小腸の吸収過程における相互作用も報告されている。βブロッカーであるタリノロールは、生体内でほとんど代謝を受けないが、P-gpの基質となる。そのため、経口投与後吸収されたタリノロールの一部は、消化管の P-gp によって細胞内から消化管内へくみ出されていると考えられており、そこに P-gp を阻害するマクロライド系抗生物質エリスロ

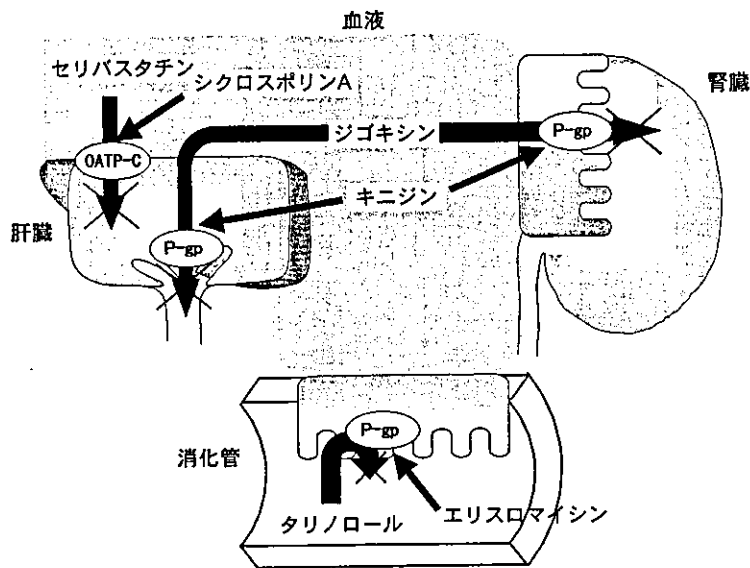


図3 トランスポーターを介した相互作用

マイシン等を併用すると、タリノロールの吸収過程における消化管腔内への排出が阻害され、吸収が増加し血中濃度が上昇する(図3)<sup>9)</sup>。また、P-gpは脳の血液脳関門にも発現し、排出輸送機構として脳内への薬物移行を制御している。薬剤により脳のP-gpが阻害されれば、予想外に脳内薬物濃度が上昇し、中枢における副作用が顕著になる可能性がある。また、脳は消失臓器ではないため、血中濃度に変化がなくても中枢移行性が増加している可能性も考えられ、特に注意が必要である。P-gp以外のトランスポーターを介した相互作用も報告されている。HMG-CoA還元酵素阻害剤であるシンバスタチン等のスタチン系化合物とシクロスポリンAを併用すると、スタチン系化合物の血中濃度が上昇することが知られている。その場合のほとんどがスタチン系化合物とシクロスポリンAのチトクロームP450 3A4を介した相互作用であるが、セリバスタチンとシクロスポリンAの相互作用は肝臓の取込みトランスポーターであるOATP-Cが関与することが推察されている(図3)<sup>7)</sup>。

その他の相互作用メカニズムとしては、トランスポーターの発現誘導も報告されており、リファンピシン等の薬剤だけでなく、天然ハーブであるSt John's wortが消化管P-gpを誘導し薬物間相互作用を引き起こすことが知られている<sup>9)</sup>。今後トランスポーターをターゲットとした創薬の増加に伴い、トランスポーターを介した相互作用の例も増大するものと思われる。

#### 4. トランスポーターを標的とした創薬

胆汁酸は肝臓で合成されたあと、肝臓から胆汁中へ排泄され、消化管で吸収されたあと、血液から肝細胞内に取り込まれる、いわゆる腸肝循環を繰り返していることが知られている。それぞれの過程にトランスポーターが関与していることが知られており、近年、これらトランスポーターの胆汁酸認識性を利用した薬剤の臓器向性について興味深い知見が報告された。強力な抗がん剤であるシスプラチンは、副作用である神経毒性・骨髄毒性あるいは腎毒性のため、しばしば使用が制限される。シスプラチンの側鎖にウルソデオ

キシコール酸を結合させたBamet-UD2(図4)は、肝臓の血管側に存在するいくつかのトランスポーターによって効率的に肝臓中に取り込まれ、ラット肝臓中濃度はシスプラチンと比べ約2倍高い。その抗腫瘍効果はシスプラチンと同等に強力であるが、肝臓以外の腎臓、脳、骨髄に分布するBamet-UD2はシスプラチンと比べ低く、神経毒性・骨髄毒性あるいは腎毒性も改善されている。このようにBamet-UD2は、シスプラチンの薬効に影響を与えることなく、薬剤の臓器向性を変えることで副作用を軽減しており、その組織分布より今後の肝がんの治療に有用と考えられている<sup>9)</sup>。同様に、難吸収性の薬剤の側鎖にペプチドを結合させ、消化管に存在するペプチドを認識し、取り込むトランスポーターの基質とすることで、吸収率を改善する試みも精力的に行われている<sup>10)</sup>。

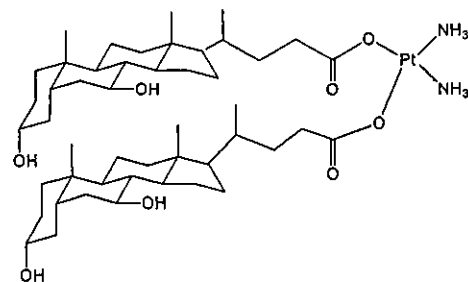


図4 Bamet-UD2の化学構造式

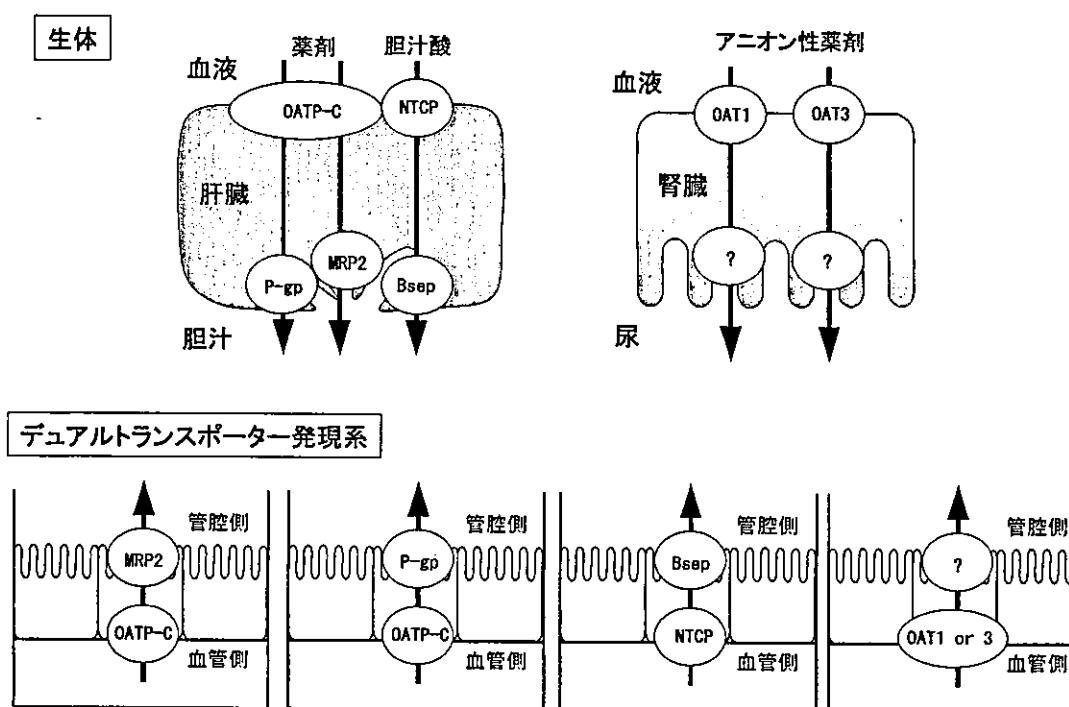


図5 肝臓および腎臓におけるトランスポーターとデュアル発現系トランスポーターの模式図  
(文献<sup>2)</sup>より改変)

## おわりに

本稿では、医薬品開発あるいは市販後の既存薬との差別化に関して、これまでのトランスポーター研究の成果について記述してきた。ここで、トランスポーター研究を応用した医薬品開発の将来の展望を考察してみたい。

一つは、創薬における応用である。前にも述べたように、開発初期段階において薬理活性を指標とするだけでなく、薬物の体内動態特性の最適化を行うというスタンスが一般的になってきている。現在では、強制発現細胞あるいは遺伝子欠損動物を用い、薬剤の分布特性あるいは消失組織等を推察する目的で、P-gp、MRP2等いくつか体内動態特性の決定に重要なトランスポーターの基質となりうるかが創薬段階で検討されている。今後、トランスポーターの輸送機構を利用した創薬もますます活発に研究されると思われる。このためには開発初期段階において、質量分析装置(LC/MS/MS)等を用いた感度の高い、分離度の高い分析法の利用とともに、数多くの化合物を評価できるトランスポーター評価系が必要になる。このようなスクリーニング系のひとつとして、デュアル発現系が期

待されている<sup>11)</sup>。これは、MDCK細胞やLLC-PK1細胞のような極性を有する細胞を用いて、血管側に取込みに関するトランスポーター、管腔側に排泄に関与するトランスポーターをそれぞれ局在的に共発現させた、輸送の方向性を再現できる発現系である(図5)。その経細胞輸送を評価することにより、血中から胆汁中排泄、尿中排泄に相当する能力を評価することが可能となる。また、肝培養細胞のトランスポーター研究への応用技術の開発も待望される。さらにトランスポーター輸送の構造活性相関研究の進展により、構造の最適化、分子デザインも将来可能になると予想される。

もう一つ、トランスポーター研究の目的としては、医薬品開発の比較的後期の段階において化合物のプロファイリングに生かすことが挙げられる。輸送メカニズムを解明することにより、ヒトの体内動態を予測し、臨床現場における医薬品の適正使用を図ることは大切である。それには、個体レベルでの輸送における個々のトランスポーターの寄与率を明らかにすることが必要である。また *in vitro* データから、ヒトにおいてトランスポーターとの相互作用による体内動態変動や副作用の発現を定量的に予測する方法論の確立も必要である。

トランスポーター研究は、分子生物学・遺伝子工学

の利用により、ここ数年で急激に進歩を遂げている。現在のところ、まだ同定されていないトランスポーターも存在するが、数年のうちには生体内におけるほとんどの薬物トランスポーターが同定されることも不可能ではない。これまでの研究結果から、トランスポーターは薬物代謝酵素と同様の特性を持っていることが判明している。その特性とは多様性、多型、臓器特異性、発現誘導、低い基質認識性であり、これら薬物代謝酵素とトランスポーターの機構がうまく合わさって異物解毒を行っている。また、このような薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの特性のため、医薬品開発が非常に困難になっている。今後、トランスポーターも含め、薬物の体内動態に関わる情報量は増大し複雑化するが、医薬品開発においては、臨床でその医薬品の体内動態特性を特徴づける要因が何であるかを判断することが重要であり、創薬においては、テクノロジー・評価系を取り入れ、開発早期の段階で体内動態特性の最適化を行うことが、効率よい医薬品開発や臨床において使いやすい薬の開発につながると思われる。

#### ○参考文献

- 1) Mizuno, N. and Sugiyama, Y.: Impact of drug transporter studies on drug discovery and development, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 17, 93~108 (2002)
- 2) 水野尚美, 杉山雄一: トランスポーター研究の進歩: 医薬品特性の最適化にむけて, 毒性質問箱, 4, S28~39 (2001)
- 3) Yamazaki, M. *et al.*: Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics (Review Article), *Pharm. Res.*, 13, 497~513 (1996)
- 4) Oguchi, H. *et al.*: Pharmacokinetics of temocapril and enalapril in patients with various degree of renal insufficiency, *Clin. Pharmacokinet.*, 24, 421~427 (1993)
- 5) Ishizuka, H. *et al.*: Temocaprilat, a novel angiotensin converting enzyme inhibitor, is excreted into bile via an ATP-dependent active transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyper-biliruminemic mutant rats (EHBR), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280, 1304~1311 (1997)
- 6) Schwarz, U. I. *et al.*: P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans, *Int. J. Clin. Pharmacol. & Ther.*, 38, 161~167 (2000)
- 7) Shitara, Y. *et al.*: Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304, 610~616 (2003)
- 8) Durr, D. *et al.*: St John's wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 68, 598~604 (2000)
- 9) Briz, O. *et al.*: Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum (II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum (II) toward liver cells, *Mol. Pharmacol.*, 61, 853~860 (2002)
- 10) Han, H. *et al.*: Cellular uptake mechanism of amino acid ester prodrugs in Caco-2/hPEPT1 cells overexpressing a human peptide transporter, *Pharm. Res.*, 15, 1382~1386 (1998)
- 11) Sasaki, M. *et al.*: Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and Multidrug resistance-associated protein2 (MRP2/ABCC2), *J. Biol. Chem.*, 277, 6497~6503 (2002)

# Pharmacogenomics

楠原 洋之, 杉山 雄一\*

東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学 (\*教授)

## はじめに

ヒトゲノムプロジェクトもほぼ終了したこともあり、ヒトゲノム上にコードされる蛋白分子の検索もデータベースを利用することで容易となった。マイクロアレイやジーンチップなど、ゲノム上にコードされる機能未知の遺伝子も含めた mRNA の発現を網羅的に解析することで、疾病関連遺伝子の同定を進め、その成果に基づいて医薬品の分子設計を行うゲノム創薬が脚光を浴びている<sup>1-3)</sup>。一方で、患者のゲノム情報を整理することで、患者の医薬品に対する薬剤反応性を予測し(レスポナー・ノンレスポナーに分類し)、患者一人一人について最適な薬剤・投与量を選択することが可能になると考えられており、テーラーメイド医療(personalized medicine)として注目されている<sup>1-3)</sup>。また、医薬品開発においては、外国での臨床データから日本人への有効性・安全性を検討する、いわゆるブリッジング試験の導入も行われており、薬剤反応性の人種差に対する関心も高まっている<sup>1-3)</sup>。

本稿では、我々の研究領域である薬物の体内動態、とくにその支配要因の一つであるトラン

スポーター(輸送担体)について紹介したい。

## 薬剤反応性の遺伝的要因について

薬剤反応性(薬効・副作用)の個人差には遺伝的要因が存在することが、古くから知られている。図1に示すように、薬剤反応の個人差は薬力学的(pharmacodynamics)要因と、薬物動態学的(pharmacokinetics)要因に分けて理解することができる<sup>4)</sup>。前者には、同じ濃度で暴露しても薬剤応答性が異なるケースであり、つまり薬効・副作用に関わる受容体の数や親和性、その下流に連なる情報伝達カスケードに関与する蛋白の機能における個人差である。一方、後者は標的組織内での薬物濃度、ならびにその持続性を決定する要因である ADME(absorption・distribution・metabolism・excretion)といわれている吸収・分布・代謝・排泄の諸過程の個人差であり、血中蛋白(アルブミンなど)、CYP(チトクローム P-450)に代表される代謝酵素、細胞膜透過過程を促進させるトランスポーターなどの機能に関する個人差である。

これら蛋白における遺伝的要因としては、mRNA の発現を司る転写領域、蛋白機能を支配する翻訳領域における塩基配列の個人差(変

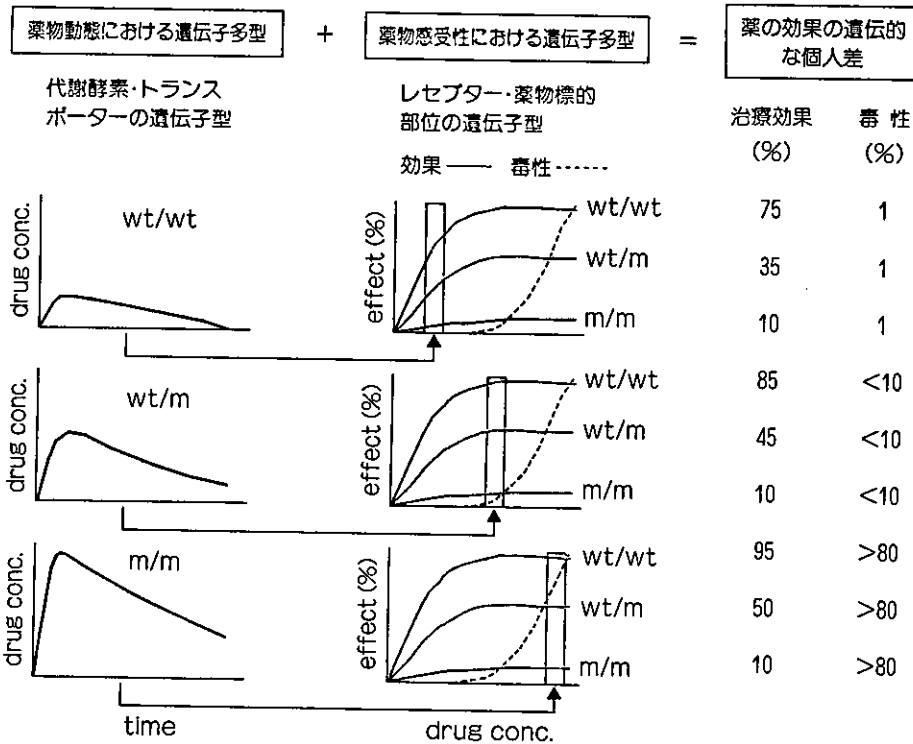


図 1. 薬剤感受性の個人差の要因

wt は野生型アレル, m は変異型アレルを意味している

(文献 4 より引用)

異)にはかならない。ゲノム上の変異のうち、人口中 1% 以上の頻度で存在しているものが多型 (polymorphism) と呼ばれている。多型には、塩基配列の挿入・欠失のほか、1 塩基置換が生じているもの (single nucleotide polymorphism; SNP) が含まれる。SNP はその発現頻度 (遺伝子全体の 0.1%、約 300 万塩基対と推測されている) から、薬剤応答性の個人差を説明する要因として注目されている。

#### 遺伝子多型に伴う機能変異の検出

ある遺伝子にアミノ酸変異を伴う遺伝子多型を見いだした場合、体内動態への影響を考慮するためには、とくに、①遺伝子多型が評価の対

象である薬物の代謝あるいは輸送能に影響を与えるか、②仮に与えたとして、その代謝酵素あるいはトランスポーターが全体の代謝あるいは輸送過程に占める全反応中での寄与率は大いのか、③個体レベルでとして血中濃度推移に影響を与えるのか (phenotype として検出できるのか)、の三つの点を考慮することが必要である。①については、遺伝子発現系を用いた解析により、比較的容易に評価が可能である。②、③については、*in vivo* を反映した *in vitro* モデル、ならびに反応に特異的なプローブドラッグが必要となる。すでに古くから代謝活性の遺伝的要因について研究されてきた CYP の領域では、阻害剤・機能中和抗体の評価も進み、代

表 1. *in vivo* で CYP (P-450) の phenotyping に用いられる薬物 (プローブドラッグ)

CYP (P-450) の分子種	プローブドラッグ	検出する反応
CYP1A2	カフェイン	カフェイン 3-脱メチル化/パラキサチン-7-脱メチル化
	テオフィリン	テオフィリン-1-脱メチル化
CYP2C9	トルブタミド	トルブタミド水酸化
	フェニトイン	フェニトイン 4'-水酸化
	ワルファリン	(S)ワルファリン 6-and 7-水酸化
	ロサルタン	ロサルタン酸化
CYP2C19	メフェニトイン	(S)メフェニトイン 4'-水酸化
	オメプラゾール	オメプラゾール 5' 水酸化
	プログアニル	プログアニル酸化
CYP2D6	デキストロメトルファン	デキストロメトルファン脱メチル化
	デブリソキン	デブリソキン 4-水酸化
	スパルテイン	スパルテイン N1-水酸化
	メトプロロール	(R)メトプロロール O-脱メチル化; メトプロロール; $\alpha$ -水酸化
CYP2E1	クロルゾキサゾン	クロルゾキサゾン 6-水酸化
CYP3A	コルチゾール	コルチゾール 6 $\beta$ -水酸化
	[ <sup>14</sup> C]エリスロマイシン	エリスロマイシン N-脱メチル化
	ミダゾラム	ミダゾラム 1'-and 4-水酸化
	ジアフェニルスルホン	ジアフェニルスルホン N-水酸化
	リドカイン	リドカイン N-脱メチル化
	アルフェンタニル	ピペリジン N-脱アルキル化
	ニフェジピン	ニフェジピン脱水酸化

(文献 6 より引用)

謝反応における各分子種の寄与率を議論することが可能になってきている。また表 1 に示したようなプローブドラッグを用いて、CYP の genotyping とその phenotyping の評価も行われている<sup>2-5)</sup>。一方、トランスポーターについては、遺伝子多型についての研究がその端緒にすぎたばかりであり、生体膜透過過程に占める寄与率を評価する手法については実験動物において検討されている段階である<sup>23)</sup>。しかし、ヒト凍結肝細胞などヒト試料を用いた輸送実験も報告されており<sup>7)</sup>、近い将来にヒト組織の膜透過過程に占める個々のトランスポーターの寄与

率を評価する方法論が確立されるものと期待される。

#### トランスポーターの遺伝子多型

薬物の細胞膜透過過程には、薬物分子の拡散により細胞膜を透過する単純拡散のほか、薬物の細胞膜透過を促進するトランスポーターと呼ばれる細胞膜蛋白が関与する場合がある。とくに、近年薬物トランスポーターの同定も大きく進み、ヒトにおいて薬物の排泄臓器である肝臓、腎臓、ならびに吸収部位の小腸、脳を保護する関門である血液脳関門については図 2 のような



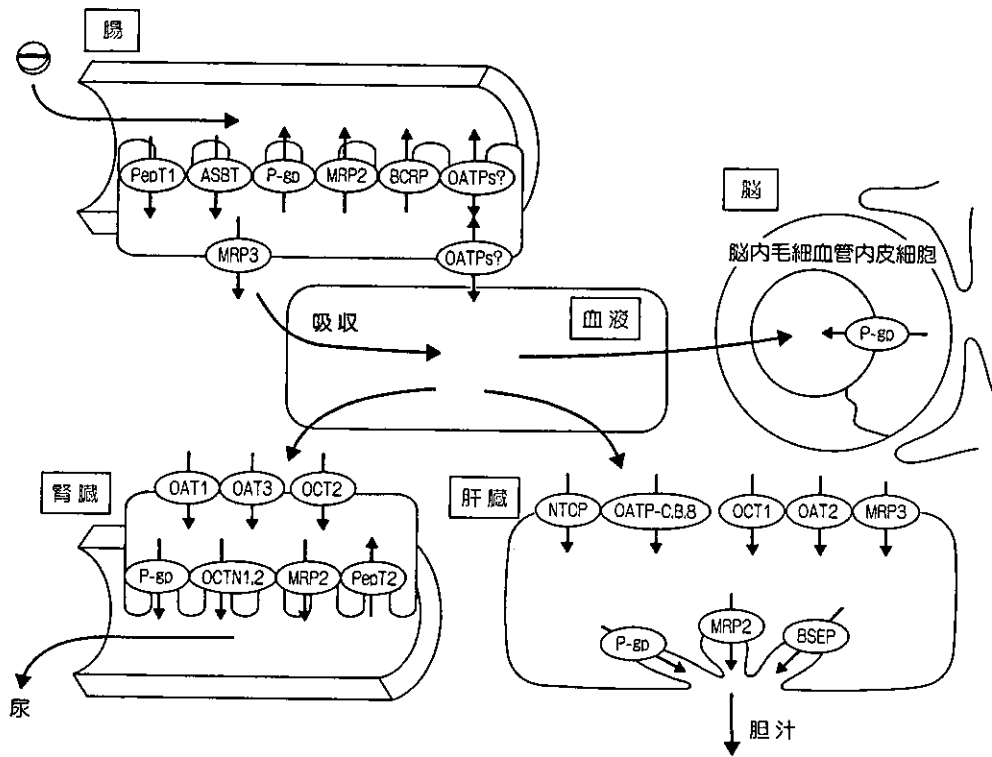


図 2. 薬物の体内動態に重要な薬物トランスポーター

(文献 11 より引用)

トランスポーター群が同定されている。薬物の体内動態に重要な働きをするトランスポーター群には、OATPファミリー(*SLC21A*)、OATファミリー(*SLC22A*)、OCTファミリー(*SLC22A*)、OCTNファミリー(*SLC22A*)、MRPファミリー(*ABCC*)、P-糖蛋白(*ABCB1*)を挙げることができる<sup>8-12)</sup>。図2に示した薬物トランスポーターはいずれも広汎な基質選択性を示し、組織への取り込みならびに胆汁中・尿中への排泄に重要な働きをしていることが明らかにされつつある。すなわち、トランスポーターの機能に個人差がある場合、基質となる薬物の血液中濃度の時間推移の個人差に繋がること予想される。これらトランスポーター遺伝子に果たして多型が存在するのか、また存在したとし

て輸送活性の個人差を説明しうるのか、という課題について、現在ゲノム上での変異の検索が進められている<sup>2,12-19)</sup>。すでいくつかのトランスポーターについては、遺伝子多型に関する研究が報告されているので、以下に紹介する。

### 1. P糖蛋白(P-glycoprotein; P-gp)

P-gpは分子内にATP結合部位を二つ有するいわゆるABCトランスポーターであり、ピンクリスチンなどの抗がん剤をはじめとして脂溶性の高い中性・カチオン性薬物の細胞内からの排泄を行っている<sup>15,20)</sup>。元々抗がん剤に対して多剤耐性を付与する因子の一つとして同定されたが、小腸、肝臓、腎臓、脳毛細血管内皮細胞(血液脳関門)など正常組織にも発現しており、その基質薬物の体外への排泄を行って

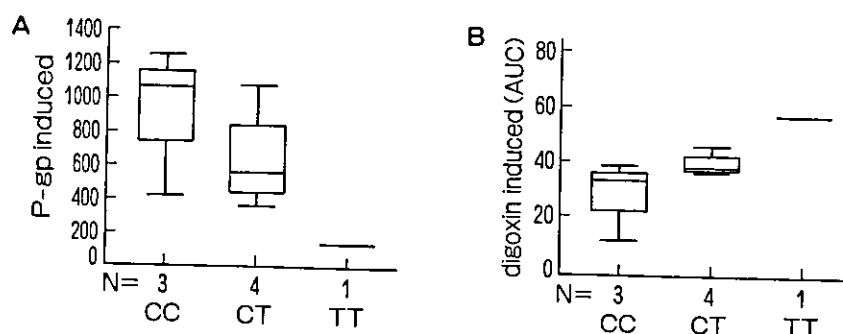


図 3. P-gp の遺伝子多型(C3435T)と発現量, ジゴキシンの AUC

健常者にリファンピシン投与後の P-gp の発現量(十二指腸)と経口投与後のジゴキシンの血漿中濃度下面積(AUC)  
(文献 4 より引用)

る<sup>15,20)</sup>。2000年に、HoffmeyerらがP-gpの遺伝子多型とジゴキシンの血中濃度との関連に関する興味深い報告をした<sup>14)</sup>。彼らはP-gpの変異の内、3,435番目のシトシン(C)とチミン(T)の変異が消化管でのP-gpの発現量に影響を与えることを見いだした。この変異はアミノ酸置換を伴わない変異であるが、TTを持つヒトのP-gp発現量とCCを持つヒトのP-gp発現量の間には約2倍の差が見いだされた。さらに、リファンピシン投与によりP-gpの発現を誘導したところ、誘導後のP-gpの発現量と3,435番目の変異との間には類似の傾向が観察された(図3)。P-gp基質であるジゴキシン単回投与後の血中濃度のAUC(時間曲線下面積)は、TTの変異を有するヒトで高く、CCの変異を有するヒトで低かった(図3)。ジゴキシンの結果は、P-gpの発現量の傾向と一致していた。3,435番目の変異がP-gp発現量に影響を与えるメカニズムについては、転写領域を含む別の領域の遺伝子多型とリンクしていると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。

Hoffmeyerらは消化管のP-gpに焦点を当てているが、P-gpは脳毛細血管内皮細胞においても発現しており、P-gp遺伝子(*Mdr-1a*ま

たは*Mdr-1a/-1b*)のノックアウト動物では、基質薬物の脳内濃度が著しく増加していることが明らかにされている<sup>20)</sup>。消化管と同じく血液脳関門においても、3,435番目のCとTの遺伝子多型に伴うP-gpの発現量の個人差がみられた場合、仮に血液中濃度が同じであったとしても、基質となる薬物の脳内濃度に個人差が生じることが十分あり得る。本遺伝子多型が、中枢での薬理・副作用の個人差を説明しうる可能性を有しており、Hoffmeyerらが見いだした変異と、<sup>11</sup>C]ベラパミルなどを用いたpositron emission tomography(PET)あるいは<sup>99m</sup>Tc]セスタミビを用いたsingle photon emission computed tomography(SPECT)など非侵襲的な方法論で脳内濃度を測定し、遺伝子多型と脳内濃度との関連を検討することが必要である。

Hoffmeyerの報告以後、3,435番目の変異と基質薬物の体内動態の関連が検討されているが、報告によって必ずしも統一された傾向はみられておらず、3,435番目の変異と基質薬物の体内動態の個人差については最終的な結論には至っていない<sup>15)</sup>。

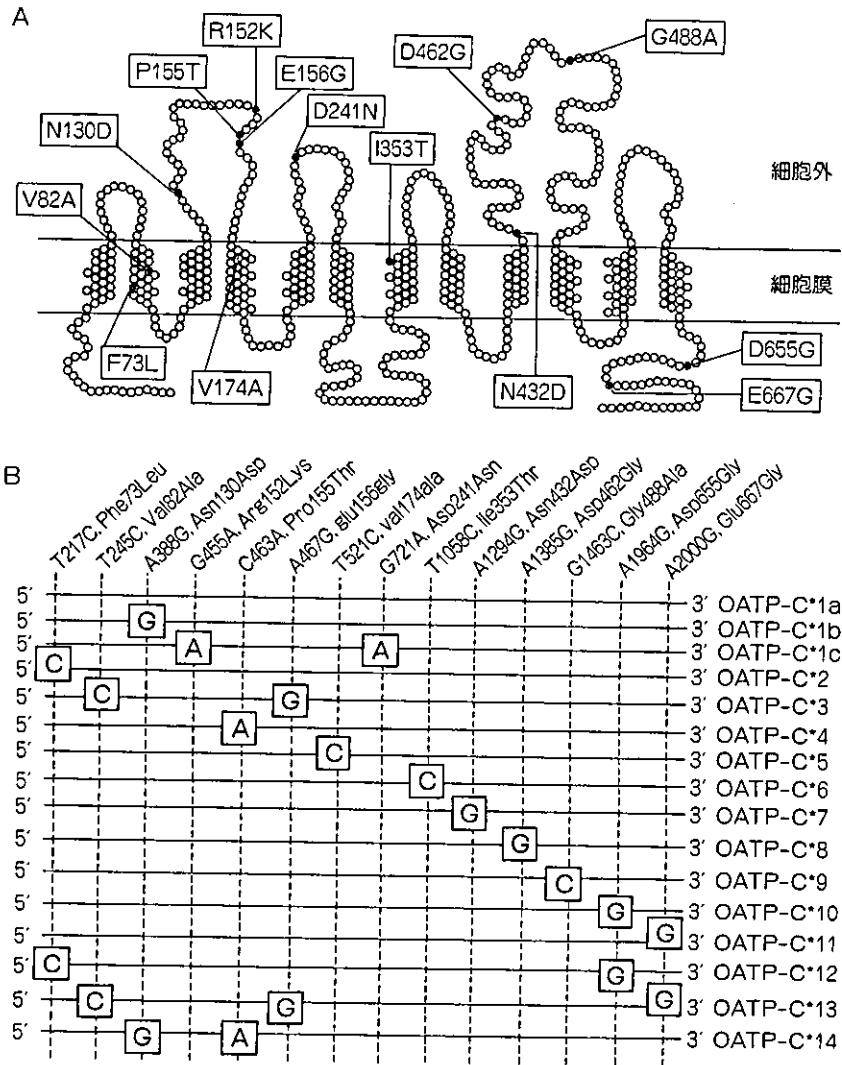


図 4. OATP-C の SNPs のトポロジー上での位置とアレルの整理  
(文献 16 より引用)

2. organic anion transporting polypeptide (OATP)-C

OATP-C (LST-1/OATP2) は肝臓特異的に発現する有機アニオントランスポーターであり、負電荷を有する広汎な化合物をその輸送基質とする<sup>9,10)</sup>、肝臓への有機アニオンの取り込み過程において主要な役割を担っていると考えら

れている。その基質の中には、後述するステロイドの抱合代謝物(エストラジオール 17β-グルクロン酸、エストロン硫酸など)や医薬品としては、高脂血症治療薬であるプラバスタチンなどが含まれる<sup>9,10)</sup>。

Tirona らは、OATP-C について図 4 のような 15 種のアレルを見いだした<sup>16)</sup>。OATP-C の

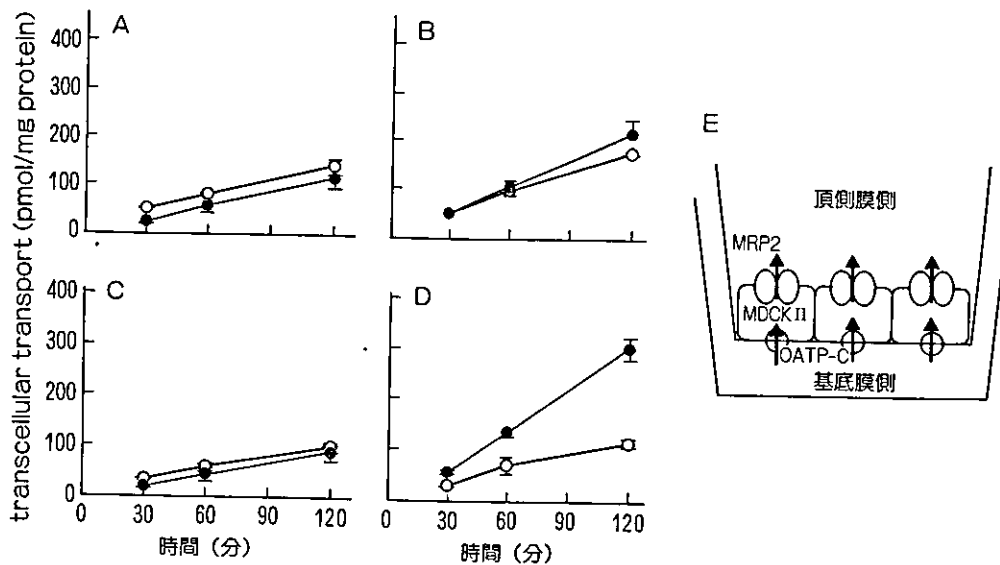


図 5. OATP-C と MRP2 の共発現系を介したプラバスタチンの経細胞輸送の経時変化

host(A), OATP-C(B), MRP2(C), OATP-C/MRP2(D)を介したプラバスタチンの経細胞輸送の経時変化。●-基底膜側から頂側膜側への輸送, ○-は逆の輸送。E: 共発現系の模式図 (文献4より引用)

典型的な基質となるエストラジオール 17β-グルクロン酸ならびにエストロン硫酸を用いて測定したところ、輸送に関するパラメーターである Michaelis-Menten 定数 ( $K_m$  値) ならびに最大輸送定数 ( $V_{max}$  値) にアシルによる違いを見いだしている<sup>12)</sup>。OATP-C\*2, OATP-C\*3, OATP-C\*6, OATP-C\*10, OATP-C\*12, OATP-C\*13 については、 $K_m$  値が比較対象とした OATP-C\*1a に比較して、大きくなっており (低親和性)、さらに OATP-C\*2, OATP-C\*3, OATP-C\*6, OATP-C\*9, OATP-C\*10, OATP-C\*12, OATP-C\*13 において輸送活性 ( $V_{max}/K_m$ ) の低下を報告している。しかし彼らは、変異体のいくつかは細胞膜上での発現が低下していることから、見かけ上  $V_{max}$  値の低下を招いていることにも言及しており、細胞膜上での OATP-C 発現量による補正が必要である。Nozawa らの検討では、この点を踏まえ、機

能評価に用いた発現細胞での OATP-C 発現量で輸送活性を補正したところ、少なくとも日本人に存在するアシルのうち OATP-C\*1b (アシル頻度 53.7%) ならびに OATP-C\*5 (0.7%) には、エストロン硫酸の  $K_m$  値、 $V_{max}$  値に明確な差がみられなかったことを報告している<sup>17)</sup>。彼らは、OATP-C\*1c と OATP-C\*5 の変異を同時に持つ新たなアシル OATP-C\*15 (10.3%) を日本人健常者の中に見いだしている。このアシルが基準となる OATP-C\*1a と比較して、どの程度の輸送活性を有しているのかは報告されておらず、今後の検討を待ちたい。

MRP2 は P-gp と同じく分子内に ATP の結合部位を持つトランスポーターであり、肝胆管側膜へと局在し、基質薬物の胆汁中への排泄を担っている<sup>11)</sup>。MRP2 の機能の欠失は、黄疸を症状とする Dubin-Johnson 症候群を呈する。MRP2 はビリルビングルクロン酸を内因性の