

氏名 (生年月日) <sup>かわはら いいちろう</sup>  
**河原 亥一郎** (1971年9月28日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博薬 第224号

学位授与の日付 2022年3月19日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 薬物の消化管吸収における breast cancer resistance protein (BCRP) の寄与を  
予測する方法に関する研究

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌  
(副査) 教授 栄田 敏之  
(副査) 教授 西口 工司

## 論文内容の要旨

### 序章 (はじめに)

薬物の消化管吸収性は、多くの要因により支配されているが、その要因の一つとして排出トランスポーターの関与が挙げられる。消化管に発現する排出トランスポーターの中で最もよく研究されている P-glycoprotein (MDR1/P-gp) と共に、breast cancer resistance protein (BCRP) も薬物の吸収障壁として機能する可能性が考えられる。しかしながら、薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を系統的に評価した例は少ない。

そこで著者は、薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を見積もるために、第1章において、予備的な検討として、Caco-2 細胞及びマウスを用いて既知の P-gp 阻害薬の BCRP に対する選択性について検討を行った。また、第2章では、第1章の結果を踏まえて、P-gp 選択的阻害薬及び P-gp と BCRP の両者に対する阻害薬を用いて、BCRP の基質となる数種のモデル化合物の Caco-2 単層膜透過性について検討し、膜透過における BCRP の寄与の評価を行った。さらに、第3章では、Caco-2 細胞により得られた BCRP の寄与の見積もりが *in vivo* を反映したものであるかを Bcrp KO マウスを用いて評価を行い、*in vitro* で得られた結果の整合性について検証した。

### 第1章 薬物の消化管吸収における P-gp の影響を評価するための P-gp 阻害薬の有用性に関する検討

P-gp 及び BCRP 基質のモデル化合物として paclitaxel 及び mitoxantrone を選択し、Caco-2 細胞を用いて7種の P-gp 阻害薬の P-gp 阻害活性ならびに選択性について検討した。GF120918、XR9576、LY335979 は paclitaxel の排出方向の Caco-2 膜透過性を顕著に減少させ、P-gp に対し強い阻害作用を有することが示された。特に、LY335979 は mitoxantrone の Caco-2 膜透過性に対する影響が小さく、P-gp の影響を評価する上で最も有用性の高い化合物であると考えられた。次に、薬物の吸収速度や吸収率を解析する手法である門脈-循環血濃度差解析法 (P-S difference 法) を用いてマウスにおける paclitaxel の消化管吸収に及ぼす LY335979 の影響について検討した。野生型 (WT) マウスに

LY335979 を前投与した paclitaxel の吸収速度は、P-gp の遺伝子をノックアウトした Mdr1a/1b KO マウスとほぼ同程度まで上昇したことから、小腸における代謝への影響は小さいと考えられた。一方、WT マウスに LY335979 を前投与した場合、BCRP 基質である topotecan の吸収速度は、未処置の WT マウスや Mdr1a/1b KO マウスとほぼ同程度であったことから、LY335979 の BCRP への影響は小さいと考えられた。以上の結果より、LY335979 は P-gp のみの寄与を評価する阻害薬として最も有用性の高いことが明らかとなった。

## 第2章 薬物の Caco-2 単層膜透過性における BCRP の寄与の評価

次に、薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を評価することを目的として、Caco-2 細胞を用いて種々の物性を有する 9 種のモデル化合物の膜透過性及び膜透過における BCRP の寄与について定量的に評価した。本研究では、吸収方向の膜透過における排出トランスポーターの寄与を表すパラメータとして Absorptive Quotient ( $AQ$ ) を算出した。 $AQ_{BCRP}$  は BCRP の寄与率 (0~1) を表し、1 に近いほど吸収方向における BCRP の寄与が大きいことを示す。阻害薬には BCRP と P-gp 双方の阻害薬として WK-X-34、P-gp の阻害薬として LY335979 を用いた。その結果、topotecan、SN-38、sulfasalazine の吸収方向の膜透過係数  $P_{AB}$  は他の化合物よりも低く、 $AQ_{BCRP}$  値は 0.6 以上と高値を示したことから、これら化合物の吸収障壁として BCRP が大きく寄与している可能性が示された。一方、これら 3 化合物以外の BCRP 基質の  $AQ_{BCRP}$  値は 0.4 未満と低値を示し、膜透過において BCRP がほとんど寄与しないことが示された。以上の結果より、 $P_{AB}$  と  $AQ_{BCRP}$  の関係性をプロットしたところ、BCRP 基質となる化合物が様々な  $P_{AB}$  と  $AQ_{BCRP}$  を示しており、特に  $P_{AB}$  値が約  $1.0 \times 10^6$  cm/s より小さい値を示す場合に BCRP の寄与を大きく受けると考えられた。

## 第3章 P-S difference 法を用いた薬物の消化管吸収における BCRP の寄与の評価

*In vitro*  $AQ_{BCRP}$  が消化管吸収における BCRP の寄与を正確に評価しているか否かを検討した。第2章において用いたモデル化合物より ciprofloxacin、nitrofurantoin、topotecan、sulfasalazine を選択し、Bcrp KO マウスに P-S difference 法を適用することによりマウスにおける薬物の消化管吸収に対する Bcrp の寄与を評価した。その結果、 $AQ_{BCRP}$  値が 0.61、0.59 と高値を示した topotecan、sulfasalazine の Bcrp KO マウスにおける消化管吸収率は約 100% となり、WT マウスと比較して顕著に増大した。したがって、これら 2 化合物の *in vivo* 消化管吸収において BCRP が大きく影響していることが明らかとなった。また、マウスにおける薬物の消化管吸収における BCRP の寄与率を表すパラメータとして、contribution ratio ( $R_{Bcrp}$ ) を考案した。 $AQ_{BCRP}$  値が低値を示した ciprofloxacin 及び nitrofurantoin においては  $R_{Bcrp}$  も低値を示したのに対して、topotecan、sulfasalazine においては、 $R_{Bcrp}$  は 0.4 より大きな値を示した。最後に、 $AQ_{BCRP}$  と  $R_{Bcrp}$  との相関性を検討したところ、両パラメータ間には比較的良好な相関性が認められた。従って、Caco-2 単層膜透過実験より算出した  $AQ_{BCRP}$  を用いることによって *in vivo* における薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を精度よく予測可能であることが示された。

本研究では、薬物の消化管吸収における BCRP の影響を評価するための阻害薬として LY335979 及び WK-X-34 を選択し、これら阻害薬を用いて Caco-2 単層膜透過実験より算出した  $AQ_{BCRP}$  の結果から、化合物の膜透過性が低い場合に BCRP の寄与を大きく受けることを明らかにした。さらに、Bcrp KO マウスを用いた薬物の消化管吸収性との検証結果から、 $AQ_{BCRP}$  を用いることによって BCRP の寄与を精度よく予測可能であることを示した。本研究で得られた知見は、創薬の消化管吸収

スクリーニングにおいて利用可能な評価ツールのひとつとして有益な情報を提供でき、ヒトにおける薬物の消化管吸収性を精度よく予測するためのデータベース構築に貢献できるものと考えられる。

## 審査の結果の要旨

### 緒言

薬物の消化管吸収性は、多くの要因により支配されているが、現在までに、薬物の消化管吸収における **breast cancer resistance protein (BCRP)** の寄与を系統的に評価した例は少ない。

そこで著者は、薬物の消化管吸収における **BCRP** の寄与を見積もるために、**BCRP** の基質となる数種のモデル化合物の **Caco-2** 単層膜透過性について検討し、膜透過における **BCRP** の寄与の評価を行った。また、**Caco-2** 細胞により得られた **BCRP** の寄与の見積もりが *in vivo* を反映したものであるかを **Bcrp KO** マウスを用いて評価を行い、*in vitro* で得られた結果との整合性について検証した。

### 審査結果の要旨

第1章 薬物の消化管吸収における **P-gp** の影響を評価するための **P-gp** 阻害薬の有用性に関する検討

**P-gp** 及び **BCRP** 基質のモデル化合物として **paclitaxel** 及び **mitoxantrone** を選択し、**Caco-2** 細胞を用いて 7 種の **P-gp** 阻害薬の **P-gp** 阻害活性ならびに選択性について検討した。その結果、**LY335979** は **paclitaxel** の排出方向の **Caco-2** 膜透過性を顕著に減少させたことから、**P-gp** 機能を強く阻害する化合物であると考えられた。また、**WT** マウスに **LY335979** を前投与した場合、**BCRP** 基質である **topotecan** の吸収速度は、未処置の **WT** マウスや **Mdr1a/1b KO** マウスとほぼ同程度であったことから、**LY335979** の **BCRP** への影響は小さいと考えられた。以上の結果より、**LY335979** は **P-gp** のみの寄与を評価する阻害薬として最も有用性の高いことが明らかとなった。

第2章 薬物の **Caco-2** 単層膜透過性における **BCRP** の寄与の評価

次に、**Caco-2** 細胞を用いて種々の物性を有する 9 種のモデル化合物の膜透過性及び膜透過における **BCRP** の寄与について定量的に評価した。本研究では、吸収方向の膜透過における排出トランスポーターの寄与を表すパラメータとして **Absorptive Quotient (AQ)** を算出した。その結果、**topotecan**、**SN-38**、**sulfasalazine** の吸収方向の膜透過係数  $P_{AB}$  は他の化合物よりも低く、 $AQ_{BCRP}$  値は 0.6 以上と高値を示したことから、これら化合物の吸収障壁として **BCRP** が大きく寄与している可能性が示された。さらに、 $P_{AB}$  と  $AQ_{BCRP}$  の関係性をプロットしたところ、 $P_{AB}$  値が約  $1.0 \times 10^{-6}$  cm/s より小さい値を示す場合に **BCRP** の寄与を大きく受けると考えられた。

第3章 **P-S difference** 法を用いた薬物の消化管吸収における **BCRP** の寄与の評価

本章では、*In vitro*  $AQ_{BCRP}$  が消化管吸収における **BCRP** の寄与を正確に評価しているか否かを検討した。その結果、**Bcrp KO** マウスにおける **topotecan**、**sulfasalazine** の消化管吸収率は約 100% となり、これら 2 化合物の *in vivo* 消化管吸収において **BCRP** が大きく影響していることが明らかとなった。また、マウスにおける薬物の消化管吸収における **BCRP** の寄与率を表すパラメータとして、**contribution ratio ( $R_{Bcrp}$ )** を考案し、 $AQ_{BCRP}$  と  $R_{Bcrp}$  との相関性を検討したところ、両パラメータ間には比較的良好な

相関性が認められた。

#### 結論

以上のことから、Caco-2 単層膜透過実験より算出した  $AQ_{BCRP}$  を用いることによって *in vivo* における薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を精度よく予測可能であることが示された。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。