

博士学位論文

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

2021 年度

河原 亥一郎

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社の規約により許可されている。

- 1) Yusuke Kono, Ichiro Kawahara, Kohei Shinozaki, Ikuo Nomura, Honoka Marutani, Akira Yamamoto, Takuya Fujita. Characterization of P-glycoprotein inhibitors for evaluating the effect of P-glycoprotein on the intestinal absorption of drugs. *Pharmaceutics*. 2021, **13**, 388. [第 1 章]
- 2) Ichiro Kawahara, Satoyo Nishikawa, Akira Yamamoto, Yusuke Kono, Takuya Fujita. The impact of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) on drug transport across Caco-2 cell monolayers. *Drug. Metab. Dispos.* 2020, **48**, 491-498. [第 2 章]
- 3) Ichiro Kawahara, Satoyo Nishikawa, Akira Yamamoto, Yusuke Kono, Takuya Fujita. Assessment of contribution of BCRP to intestinal absorption of various drugs using portal-systemic blood concentration difference model in mice. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2020, **8**, e00544. [第 3 章]

目次

略語一覧

序論.....	1
本論.....	3
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.....	3
1-1 緒言	3
1-2 方法	6
1-2-1 実験材料.....	6
1-2-2 細胞培養.....	6
1-2-3 Real-time RT-PCR.....	6
1-2-4 動物.....	6
1-2-5 透過実験／阻害実験.....	7
1-2-6 投与液の調製.....	7
1-2-7 マウスにおける薬物動態試験	7
1-2-8 薬物の定量.....	7
1-2-9 データ解析.....	8
1-2-10 統計解析.....	10
1-3 結果.....	11
1-3-1 Caco-2 単層膜における paclitaxel の透過性に対する P-gp 阻害薬の阻害活性.....	11
1-3-2 Caco-2 単層膜における BCRP の関与する輸送に対する P-gp 阻害薬の阻害活性	14
1-3-3 LY335979 または WK-X-34 併用による P-gp 基質及び BCRP 基質の消化管吸収への影響	16
1-3-4 Paclitaxel の吸収速度に対する P-gp 阻害薬の影響.....	17
1-3-5 BCRP に対する P-gp 阻害薬の影響.....	19
1-4 考察.....	20
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.....	22
2-1 緒言.....	22
2-2 方法.....	23
2-2-1 実験材料.....	23
2-2-2 細胞培養.....	23
2-2-3 Real-time RT-PCR.....	23
2-2-4 透過実験.....	24

2-2-5	測定条件.....	24
2-2-6	データ解析.....	25
2-2-7	統計解析.....	26
2-3	結果.....	27
2-3-1	BCRP 基質化合物の Caco-2 単層膜透過性及び BCRP の寄与の評価.....	27
2-3-2	モデル化合物の Caco-2 単層膜透過性及び BCRP の寄与の評価.....	29
2-4	考察.....	32
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.....	36
3-1	緒言.....	36
3-2	方法.....	37
3-2-1	実験材料.....	37
3-2-2	動物.....	37
3-2-3	投与液の調製.....	37
3-2-4	マウスにおける薬物動態試験.....	37
3-2-5	全血-血漿間分配率の測定.....	37
3-2-6	薬物濃度測定.....	38
3-2-7	データ解析.....	38
3-3	結果.....	40
3-3-1	マウスにおける各モデル化合物の消化管吸収特性と Bcrp の寄与の評価.....	40
3-3-2	各モデル化合物の消化管吸収における Bcrp 及び P-gp の寄与.....	48
3-3-3	<i>In vitro</i> - <i>in vivo</i> 相関性に関する検討.....	50
3-4	考察.....	51
	総括.....	54
	謝辞.....	56
	引用文献.....	57

略語一覽

ABC : ATP-binding cassette

AP : apical

AQ : absorptive quotient

AUC : area under the plasma concentration-time curve

BA : bioavailability

BCRP : breast cancer resistance protein

BL : basal

CsA : cyclosporin A

CYP : cytochrome P450

DMEM : Dulbecco's modified Eagles medium

E3S : estrone-3-sulfate

ER : efflux ratio

FBS : fetal bovine serum

GF120918 (elacridar) : N-(4-(2-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)ethyl)phenyl)-5-methoxy-9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carboxamide

HBSS : Hank's balanced salt solution

LY : lucifer yellow

LY335979 (zosuquidar) : (R)-1-(4-((1aR,6s,10bS)-1,1-difluoro-1,1a,6,10b-tetrahydrodibenzo[a,e]cyclopropano[7,1]annulen-6-yl)piperazin-1-yl)-3-(quinolin-5-yloxy)propan-2-ol trihydrochloride

MDCK : Madin-Darby canine kidney

MDR1 : multidrug resistance protein 1

NCEs : new chemical entities

OATP : organic anion transporting polypeptide

OCC144-093 (ontogen) : (E)-4,4'-(2-(4-(3-ethoxyprop-1-en-1-yl)phenyl)-1H-imidazole-4,5-diyl)bis(N-isopropylaniline)

PAMPA : parallel artificial membrane permeation assay

P-gp : P-glycoprotein

TEER : transepithelial electrical resistance

VX-710 (bircodar) : (S)-N-[2-Oxo-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-acetyl]piperidine-2-carboxylic acid 1,7-bis(3-pyridyl)-4-heptyl ester

WK-X-34 : N-(2-{4-[2-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydro-1H-isochinolin-2-yl)-ethyl]phenyl}carbamoyl)phenyl)-3,4-

dimethoxybenzamide

XR9576 (tariquidar) : N-[2-[[[4-[2-(3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-2(1H)-isoquinolinyl)ethyl]phenyl]amino]carbonyl]-4,5-dimethoxyphenyl]quinoline-3-carboxamide

序論

経口投与製剤は最も望まれる投与形態であり、優れた薬効を示す化合物をいかに経口製剤化するかが医薬品開発にとって重要である。経口製剤の開発において、消化管膜透過性は薬物の bioavailability (BA) を決定する重要な因子の一つであり、多くの場合、薬物の脂溶性に従う単純拡散によって支配され、pH 分配仮説に従う。しかし、本仮説に従わない例も見受けられ、その理由の一つとしてトランスポーターを介した選択的な膜輸送の存在が挙げられる。一連のトランスポーターは、主に細胞膜上に発現しており、細胞外から細胞内への薬物の取り込み、もしくは細胞内から細胞外への薬物の排出を司ることで、生体内では外来異物である医薬品の効率良い解毒に、代謝酵素と共に寄与している (Fig. 1)¹。受動拡散によって小腸上皮細胞から吸収される薬物については、Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) を用いた *in vitro* 膜透過性スクリーニング^{2,3}や *in silico*^{4,6}によってヒト消化管吸収率の予測がある程度可能となってきたが、トランスポーターが関与する薬物においては困難であり、未だヒトにおける消化管吸収性予測方法の確立には至っていない。

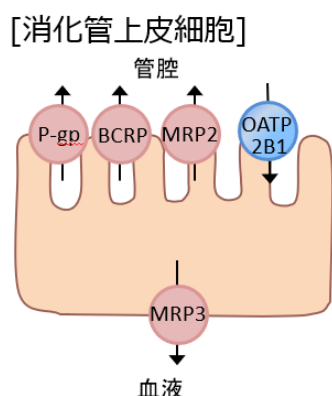


Fig. 1 消化管上皮細胞に発現する薬物トランスポーター

一方、1990年代からの創薬は最初に分子標的を決定し、それに適応する化合物を high throughput screening 技術によって瞬時に評価、選択するというより戦略的な手法になっている。このような手法により見出された医薬品候補化合物は分子量が大きく、脂溶性が高く⁷、また排出トランスポーターの基質となりやすい物性を有している。消化管に発現する代表的な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。

臨床上で薬物の消化管吸収における BCRP の影響が認められた事例として、BCRP 基質である topotecan の血漿中濃度が GF120918 の併用により上昇した報告⁸や、sulfasalazine の血漿中濃度が curcumin との併用により上昇した報告⁹がある。また、BCRP には遺伝子多型が報告されており、C421A 変異保有者において topotecan の BA が増大することが報告されている¹⁰。したがって、ヒトにおいて消化管に発現する BCRP が薬物の吸収障壁として機能する可能性が考えられる。

そこで本研究では、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。

以下、得られた結果を 3 章にわたり論述する。

本論

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

1-1 緒言

経口投与は低侵襲性や服用の自由度が高いなどの理由から、ほとんどの低分子新規化合物の投与経路として利用されている¹¹。しかしながら、膜透過性が低い多くの新規化合物は、排出トランスポーターに認識、輸送されるために吸収性が低いことが知られている¹²。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-gp と共に、BCRP もまた薬物の吸収障壁として機能する可能性が考えられる。

P-gp は ATP 結合領域を持つ膜タンパク質であり、エネルギー依存的に基質薬物を細胞内から細胞外へと排出する機能を有する一次性能動輸送担体として多剤耐性細胞から単離されてきたタンパク質である。P-gp は極めて広い基質認識性を有しており、抗がん剤やステロイド剤をはじめとした多くの医薬品が P-gp の基質となることが明らかにされ¹³、これらの薬物では消化管粘膜に対する透過性がその脂溶性から考えられるよりも有意に低くなることが報告されている¹⁴。しかし、医薬品の中には verapamil や quinidine のように P-gp の基質でありながらヒトでの経口投与後の消化管吸収性が良好である薬物も存在し¹⁵、P-gp の影響の有無を適正に評価することは十分な吸収性評価を行う上で重要な課題となる。

これまでに、P-gp の基質となる薬物の消化管吸収における P-gp の影響について、著者らのグループでは Caco-2 細胞と Mdr1a/1b knockout (KO) マウスを用いて *in vitro*、*in vivo* 両面で検討してきた。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞であり、数種の solute carrier transporters¹⁶⁻¹⁸、ATP-binding cassette (ABC) transporters^{19,20} や薬物代謝酵素^{21,22} の発現が認められており、*in vitro* 吸収性評価の有用なツールとして広く利用されている²³⁻²⁵。Caco-2 細胞は一定の条件下で培養すると microvilli や tight junction など小腸上皮細胞様の形態・機能を獲得するため、ヒトの小腸モデルとして汎用されている^{26,27}。分化した Caco-2 細胞には薬物代謝酵素のほか、各種アミノ酸²⁸⁻³⁰、水溶性ビタミン^{31,32}、ジ・トリペプチド^{33,34} などの多くの栄養物質に関する transporter が発現している。Caco-2 細胞には、P-gp や BCRP といった様々な ABC transporters も発現している^{35,36}。

一方、消化管吸収における *in vivo* での P-gp 機能評価には Mdr1a/1b KO マウスがよく利用される^{37,38}。しかし、Mdr1a/1b KO マウスの消化管生理は、wild-type (WT) マウスの P-gp 以外の消化管生理と必ずしも同一であるとの保障はされておらず、化合物の膜透過性や消化管代謝に影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。また、Mdr1a/1b KO マウスは高価であり、その使用も制限されることから、医薬品の開発段階において P-gp の関与が疑われる多種の化合物について、その消化管吸収における P-gp の影響をより簡便で利便性の高い *in vivo* 評価系を構築する必要がある。

薬物の消化管吸収に及ぼす P-gp の影響については、WT マウスにおける cyclosporine A (CsA) や verapamil などの P-gp 阻害薬を用いた実験がなされている^{39,40}。しかし、P-gp と BCRP⁴¹、あるいは代謝酵素である CYP3A の基質認識性が重複する傾向にあることは周知の事実であり⁴²、化合物の代謝と排出が協同的に行われている報告もあることから⁴³、こうした P-gp 阻害薬を用いる場合、消化管における P-gp を分離評価できない問題点を有する。したがって、P-gp 阻害薬の条件として、P-gp に対する親和性及び選択性が高いことが要求される。

これまでに、抗癌剤の多剤耐性を克服する目的で、様々な P-gp 阻害薬が開発されてきた⁴⁴⁻⁴⁷。第二世代 P-gp 阻害薬の VX-710 (biricodar) 及び第三世代の GF120918 (elacridar)、LY335979 (zosuquidar)、XR9576 (tariquidar)、WK-X-34、OC144-093 (ontogen) においては、第一世代の阻害薬である CsA や verapamil よりも低い濃度で P-gp の機能を阻害することが示されている⁴⁸⁻⁵⁰。さらに、これらの阻害薬の併用によって、P-gp 基質の BA や AUC を改善されることが報告されている⁵¹⁻⁵³。しかしながら、薬物の消化管吸収における P-gp の影響を評価するにあたって、どの阻害薬を用いるか? という疑問に関して統一した見解はなされていない。

そこで本章では、消化管での薬物吸収における BCRP の寄与を見積もるための予備的検討として、既知の 7 種の P-gp 阻害薬 cyclosporin A、GF120918、XR9576、LY335979、WK-X-34、VX-710 及び OC144-093 (Fig. 2) について、P-gp 及び BCRP に対する阻害活性ならびに選択性を *in vitro*、*in vivo* 両面で検討した。P-gp 基質には BCRP に対して親和性の低い paclitaxel を用いた⁵⁴。また、BCRP 基質には、P-gp に対して親和性の低い mitoxantrone 及び topotecan を用いた^{55,56}。

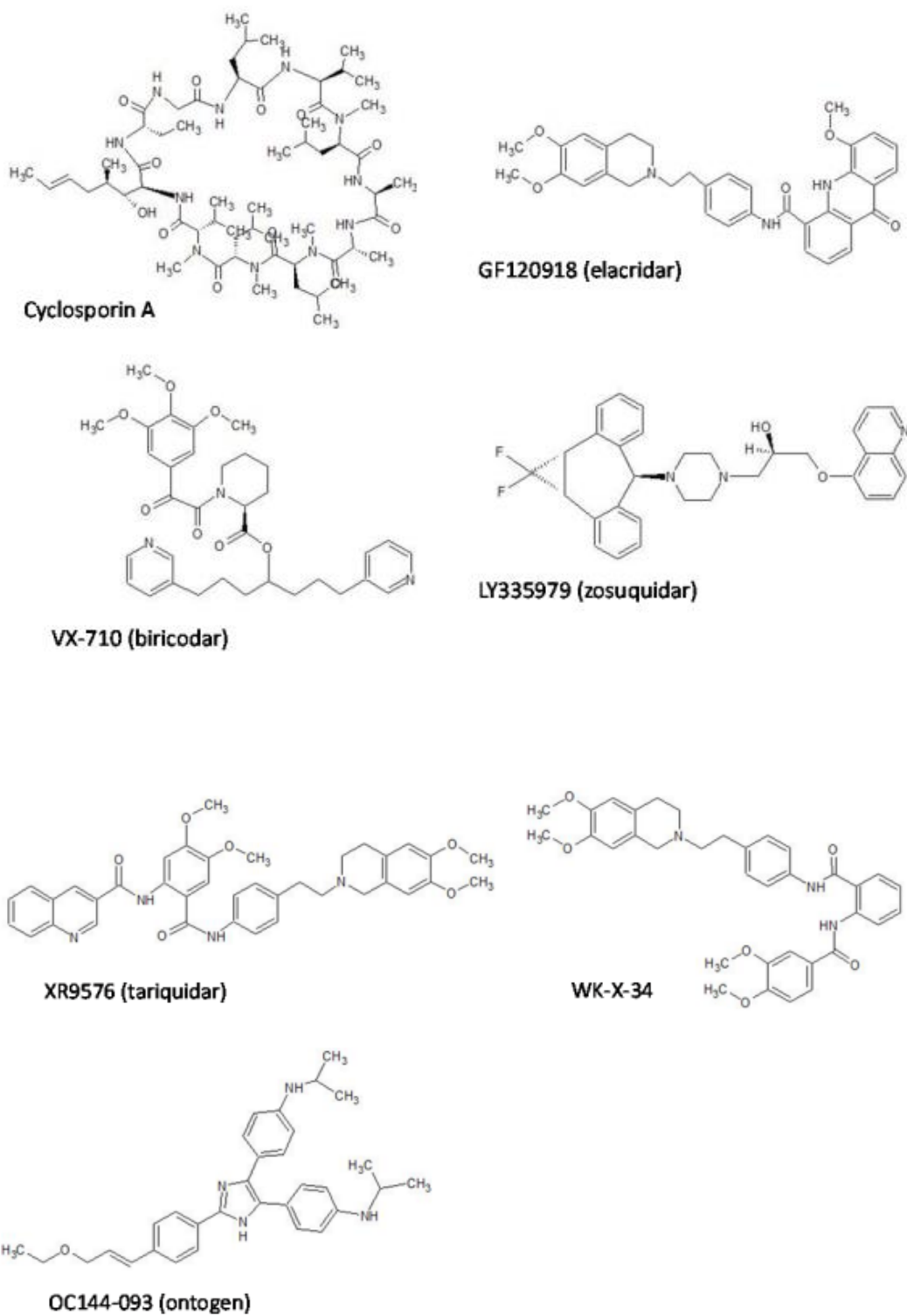


Fig. 2 Chemical structures of CsA and P-gp inhibitors in this study
(Pharmaceutics, 13, 388 (2021): Fig. 1)

1-2 方法

1-2-1 実験材料

GF120918、XR9576、paclitaxel、mitoxantrone、HBSS (Hank's balanced salt solution) は Sigma 社より、LY335979 はフナコシより、WK-X-34 はコスモバイオより、VX-710 はナミキ商事より、OC144-093 は MedKoo Biosciences より、DMEM、antibiotic-antimycotic mixed stock solution ($\times 100$)、0.25% trypsin / 1 mM EDTA solution はナカライテスクより、CsA は東京化成工業よりそれぞれ購入した。[^3H] taxol (specific radioactivity: 12.9 Ci/mmol) は Moravек Biochemicals より、Transwell[®] は Corning より、topotecan HCl は Alexis Corporation よりそれぞれ購入した。WellSolve は Celeste Corp. から入手した。その他の試薬については市販の特級品を用いた。

1-2-2 細胞培養

Caco-2 細胞は DS Pharma Biomedical (Osaka) より購入した。細胞は 10% FBS、1% non-essential amino acid solution、penicillin G (100 U/mL) ならびに streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含有する DMEM で培養し、継代は約 80% コンフルエントの時に行った。培養フラスコ上で培養した細胞を 0.02% EDTA / 0.05% trypsin を用いて剥離後、 1×10^5 個の細胞を 12 well Transwell[®] (0.4 μm pore size, 12 mm id) に播種した。培地交換は 3 日毎に行い、播種後 3 週間培養したものを実験に供した。膜抵抗値 (TEER) は Millicell-ERS (Millipore) を用いて測定した。

1-2-3 Real-time RT-PCR

Transwell[®] 上で 3 週間培養した Caco-2 細胞から Sepasol-RNA I Super[®] を用いて常法に従い total RNA を抽出した。TaqMan[®] Gene Expression Assays プロトコールに従い、ABI 7500 Fast Real Time PCR System を用いて PCR を行った。各 primer、probe の sequence は Table 7 に示した。データ解析は 7500 Fast SDS Software を用いて定量し、各 target mRNA product 量を GAPDH mRNA product 量で補正することにより、target mRNA / GAPDH mRNA の相対比を求めた。

1-2-4 動物

雄マウス野生型 (WT)、Mdr1a/1b 遺伝子欠損 (Mdr1a/1b KO) マウス及び Bcrp 遺伝子欠損 (Bcrp KO) マウス (10-18 週齢、23-35 g) は Taconic Farms (Germantown, NY) から購入し、清水実験材料に飼育・繁殖を委託した。マウスは、温度及び湿度が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。食餌と水は自由摂取とした。すべての動物実験は、京都薬科大学の動物倫理委員会によって承認された上で実施した。

1-2-5 透過実験/阻害実験

各 P-gp 阻害薬を 0.002、0.006、0.02、0.06、0.2、0.6、2 mM の濃度で DMSO に溶解し、pH 6.5 または pH 7.4 に調製した HBSS に添加した (DMSO の割合 0.5%)。Caco-2 単層膜を HBSS で 1 回洗浄後、apical (AP) 側に 0.5 mL (pH 6.5)、basal (BL) 側に 1.5 mL (pH 7.4) の 0.5% DMSO を含む HBSS を加え、37 °C 恒温槽上で 10 分間プレインキュベーション後、AP 側または BL 側を薬液で置換し実験を開始した。Paracellular marker として用いる lucifer yellow (LY) も AP 側または BL 側に加えた。経時的に receptor 側より一定量採取した後、等量の 0.5% DMSO 含有 HBSS を receptor 側に加えた。阻害実験ではプレインキュベーションの段階から実験終了時まで両側に阻害薬を終濃度 0.01、0.1、0.3、1、3、10 μ M となるように調製した HBSS あるいは薬液を添加した。以上の方法により、阻害薬共存及び非共存条件下における AP 側から BL 側への吸収方向の透過性 (P_{AB})、BL 側から AP 側への排出方向への透過性 (P_{BA}) を求めた。

1-2-6 投与液の調製

静脈内投与実験において、paclitaxel の投与液は 1 mg/mL となるように 1% DMSO、20% WellSolve を含む水を用いて調製した。経口投与実験において、paclitaxel の投与液は 2 mg/mL となるように 1% DMSO、20% WellSolve を含む水、topotecan の投与液は 2.5 mg/mL となるように 1% DMSO、10% Solutol HS15 を含む水を用いて調製した。これら投与液を 0.22 μ m フィルター (EMD Millipore Co.) で濾過した。

1-2-7 マウスにおける薬物動態試験

WT、Mdr1a/1b KO 及び Bcrp KO マウスを一晩絶食させ、実験に供した。静脈内投与に関して、paclitaxel を 5 mg/kg の投与量で各マウスに麻酔下で尾静脈内投与した。投与後、0.083、0.17、0.5、1、2、4、8 時間に腹部大静脈より採血を行った。経口投与に関して、阻害薬の WK-X-34 及び LY335979 について、それぞれ 40 mg/kg、60 mg/kg の投与量で各マウスに経口投与した。それから、paclitaxel または topotecan をそれぞれ 10 mg/kg または 2 mg/kg の投与量で経口投与した。投与後、0.083、0.17、0.5、1、2、4、8 時間に門脈及び腹部大静脈より同時採血を行った。得られた血液試料は 4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離後、血漿試料を採取した。血漿試料は分析時まで -30 °C で保存した。

1-2-8 薬物の定量

透過実験における [3 H] paclitaxel、[3 H] mitoxantrone、[14 C] mannitol の定量は、採取した receptor 溶液にシンチレーションカクテル (Clearsol I、ナカライテスク) を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN LS-6500、Beckman) にて測定した。LY の蛍光強度は、Infinite F200 microplate reader (Tecan) にて測定した。

マウス薬物動態試験における paclitaxel の定量は、血漿試料に酢酸エチルを加え抽出した。有機層を 60 °C で蒸発乾固後、移動相で再溶解し測定試料とした。Topotecan に関しては、血漿試料にアセトニトリルを加えて 4 °C、750 g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を回収し、60 °C で蒸発乾固後、移動相と 0.85 % リン酸を加えて再溶解し測定試料とした。HPLC の測定条件は以下に示した。

LC | Shimadzu LC-10A series HPLC

カラム | COSMOSIL 5C18-AR-II (3.5 μm, 4.6 × 150 mm、ナカライテスク)

流速 | 1.0 mL/min

カラム温度 | 40 °C

移動相、検出 (UV または蛍光) |

Paclitaxel : 20 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0) with acetonitrile

0-15.0 min (45% acetonitrile)、15.0-25.0 min (45-70% acetonitrile)、25.0-30.0 min (70% acetonitrile)、30.0-40.0 min (70-45% acetonitrile)、40.0-50.0 min (45% acetonitrile)

UV detector (227 nm)

Topotecan : 10 mM phosphate buffer (pH 3.7) with methanol (76:24, v/v)

Fluorescence detector (Ex 361nm, Em 527nm)

1-2-9 データ解析

薬物の透過性の評価は、薬物の透過量 - 時間曲線からみかけの透過係数 (P_{app}) を算出することにより行った。

$$P_{app} = \Delta Q / \Delta t \times 1 / (A \times C_0)$$

ここで、 $\Delta Q / \Delta t$ は receptor 側への薬物の透過速度を表し、薬物の累積透過量 - 時間曲線の傾きとして求められる。また、A はみかけの透過面積 (1.13 cm²)、 C_0 は donor 側の薬物の初濃度を表す。

次に Caco-2 単層膜透過性における P-gp の寄与を評価するにあたり、以下のパラメータを用いた。

Efflux Ratio (ER) はトランスポーターの活性評価に汎用されているパラメータであり、算出法を以下に示す。

$$ER = P_{app,BA} / P_{app,AB}$$

各 P-gp 阻害薬の阻害活性の評価は、P-gp の阻害効果が 50 % 認められる濃度 IC_{50} を算出することにより行った。

$$P_{app} = Range / [1 + (C / IC_{50})^\gamma] + Background$$

ここで、C は阻害薬濃度、 γ は Hill 係数、Range は完全阻害時と非阻害時の差、background は非阻害時の P_{app} を表す。

In vivo マウス薬物動態試験におけるみかけの消化管吸収率 ($F_a \cdot F_g$) 及び吸収速度 (V) は、門脈全

身血同時採血法 (P-S difference 法) (Fig. 3) に則り、以下の式により算出した。ここで、 Q_{pv} は門脈血流量、 R_b は全血-血漿間分配率、 AUC_{pv} 及び AUC_{sys} はそれぞれ門脈血及び全身血の血漿中濃度-時間曲線下面積を表す。本研究において門脈血流量 Q_{pv} は文献値から 72.5 mL/min/kg を採用した⁵⁷。

$$F_a \cdot F_g = Q_{pv} \times R_b \times (AUC_{pv} - AUC_{sys}) / Dose$$

$$V = Q_{pv} \times R_b \times (C_{pv} - C_{sys})$$

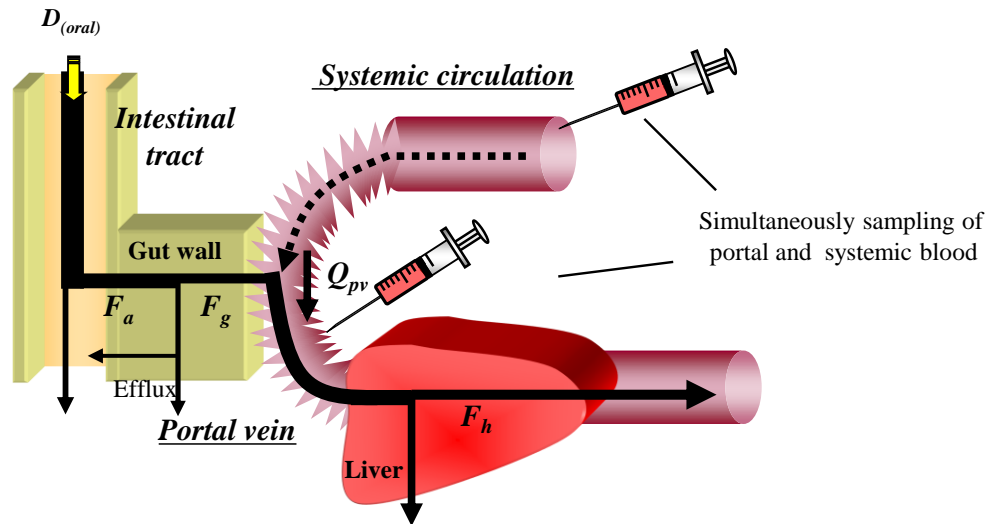


Fig. 3 Schematic representation of P-S difference method model.

平均滞留時間 (MRT) は、 $AUMC$ を AUC で除することにより計算し、経口投与後の平均吸収時間 (MAT) は、経口及び静脈内投与で得られた MRT の差から求めた。吸収速度定数 (ka) は、次式により算出した。

$$ka = 1 / MAT$$

消失速度定数 (ke) は時間に対して片対数表示した血漿中濃度の消失相を直線回帰したときの勾配より求めた。消失半減期 ($t_{1/2}$) は次式により求めた。

$$t_{1/2} = \ln 2 / ke$$

AUC 及び $AUMC$ は最終測定時間までの値を用い、対数台形公式により算出した。 AUC_{∞} 及び $AUMC_{\infty}$ は AUC_t 及び $AUMC_t$ に最終採血時間から無限時間までの AUC の外挿値 (最終測定時間の血漿中濃度 / ke) 及び $AUMC$ の外挿値 (最終測定時間の血漿中濃度 / $(ke)^2$ + 最終測定時間の血漿中濃度 \times 最終測定時間 / (ke)) を加えて算出した。 MRT 、 CL_{tot} 、 Vd_{ss} は次式を用いて計算した。

$$MRT = AUMC_{iv} / AUC_{iv}$$

$$CL_{tot} = Dose / AUC$$

$$Vd_{ss} = MRT \times CL_{tot}$$

経口投与後の吸収速度定数 ka は 経口投与時の MRT と静脈内投与時の MRT との差より求まる平均吸収時間 MAT より、次式を用いて算出した。

$$MAT = 1 / ka$$

また、経口投与後の BA は次式により算出した。

$$BA = AUC_{oral} / AUC_{iv} \times Dose_{iv} / Dose_{oral} \times 100$$

肝代謝回避率 Fh はみかけの消化管吸収率 $Fa \cdot Fg$ より算出した。

$$Fh = F / (Fa \cdot Fg)$$

1-2-10 統計解析

膜透過性試験の結果は平均値±標準誤差 (n=3) で表した。*In vivo* 動物実験の結果は平均値±標準偏差 (n=3 以上) で表した。

1-3 結果

1-3-1 Caco-2 単層膜における paclitaxel の透過性に対する P-gp 阻害薬の阻害活性

Caco-2 単層膜を用いて透過性を評価するにあたり、P-gp 及び BCRP などの排出トランスポーターと小腸に発現している主代謝酵素である CYP3A4 の mRNA 発現量を real-time PCR 法により解析し、ヒト小腸及び結腸でのそれら mRNA 発現量との比較を行った (Fig. 4)。Caco-2 単層膜における P-gp 及び BCRP の発現量はヒト小腸や結腸に比べ低かったものの、Caco-2 単層膜を用いることで排出トランスポーターの機能を検討可能であることが示された。また、tight junction 形成を確認するため、paracellular marker として用いられる LY の膜透過性及び膜抵抗値の測定を行った。LY の P_{app} は $0.10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ と十分低く、膜抵抗値は実験前後において $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上を示したことから、今回用いた Caco-2 単層膜において tight junction の形成は十分であることが確認された。細胞の integrity が確認された Caco-2 単層膜を用いて、P-gp 基質である paclitaxel の排出方向への輸送に対する P-gp 阻害薬の阻害作用について検討を行った。

各種 P-gp 阻害薬共存下において (OC144-093 を除く)、paclitaxel の AB 方向の Caco-2 単層膜透過性は濃度依存的に増大し、BA 方向の透過性は顕著に減少した (Fig. 5)。Paclitaxel の AB 方向及び BA 方向の膜透過性に対する各阻害薬の IC_{50} を Table 1 に示す。GF120918、XR9576、LY335979 及び WK-X-34 の IC_{50} は、基準化合物として選択した CsA よりも低かった。GF120918、XR9576、LY335979 は P-gp に対し強い阻害作用を有することが示された。一方、VX-710 の IC_{50} は CsA よりも大きかった。OC144-093 共存下において、paclitaxel の Caco-2 膜透過性に変化は認められなかったことから、OC144-093 は P-gp 阻害薬として適切でないと考えられた。

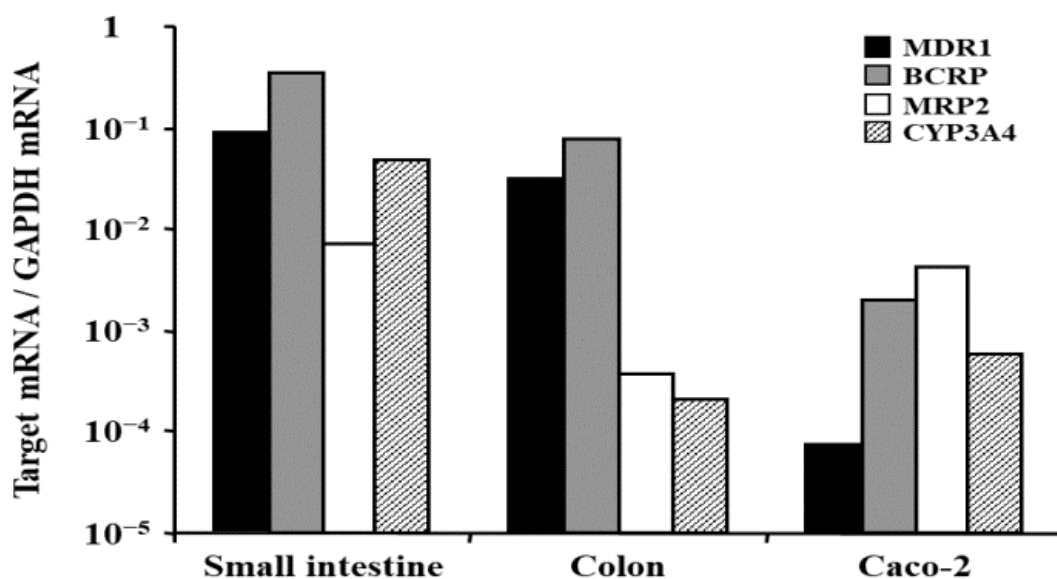


Fig. 4 Relative mRNA expression levels of MDR1, BCRP, MRP2, and CYP3A4 in human small intestine, colon and Caco-2 cells. Relative mRNA expression levels were determined by real-time RT-PCR. GAPDH was selected as an endogenous RNA control to normalize for difference in amount of total RNA. (*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Fig. S1)

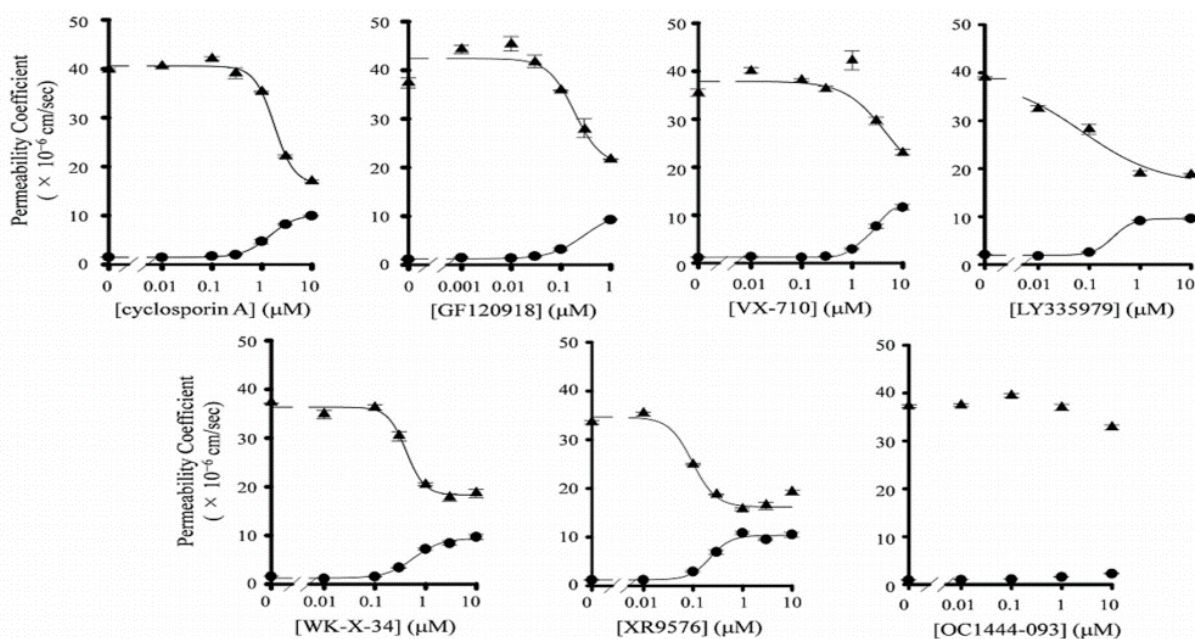


Fig. 5 Inhibitory effect of P-gp inhibitors on P-gp-mediated efflux of paclitaxel in Caco-2 cells. The $P_{app,AB}$ (●), and $P_{app,BA}$ (▲) values were determined by the AP-to-BL and BL-to-AP transport of paclitaxel in Caco-2 cells in the presence or absence of various concentrations of P-gp inhibitors. (*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Fig. 2)

Table 1 Fifty percent inhibitory concentration (IC_{50}) values and Hill coefficient of selected inhibitors on apparent AP-to-BL and BL-to-AP permeability, and efflux ratio (ER) of paclitaxel in Caco-2 cell monolayers

Inhibitor	IC_{50} (nM)			Hill Coefficient		
	$P_{app,AB}$	$P_{app,BA}$	ER	$P_{app,AB}$	$P_{app,BA}$	ER
Cyclosporin A	1973 ± 21	1820 ± 126	502 ± 126	-1.63 ± 0.09	2.18 ± 0.39	1.63 ± 0.20
GF120918	319 ± 30	239 ± 97 ^a	60 ± 21	-1.28 ± 0.09	1.63 ± 1.28	1.66 ± 0.51
XR9576	234 ± 61	64 ± 40	46 ± 19	-2.10 ± 0.64	18.4 ± 4.76	3.41 ± 0.28
LY335979	427 ± 52	107 ± 59 ^a	115 ± 22	-2.23 ± 0.31	0.57 ± 0.35	1.71 ± 0.41
WK-X-34	935 ± 33	501 ± 132 ^a	214 ± 113	-10.7 ± 6.00	1.29 ± 0.42	2.07 ± 1.22
VX-710	2680 ± 53	4496 ± 84	871 ± 277	-1.84 ± 0.07	1.08 ± 0.60	1.68 ± 0.38
OC144-093	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

a: Kawahara et al., [*Drug. Metab. Dispos.*, 2020, 48, 491], n.c.: not calculated. IC_{50} on $P_{app,AB}$: the inhibitor concentration to achieve 50% increase of $P_{app,AB}$ of paclitaxel. IC_{50} on $P_{app,BA}$: the inhibitor concentration to achieve 50% decrease of $P_{app,BA}$ of paclitaxel. IC_{50} on ER : the inhibitor concentration to achieve 50% decrease of ER of paclitaxel. Data are represented as mean ± S.D. for three experiments using different wells from a single passage of Caco-2 cells.

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 1)

1-3-2 Caco-2 単層膜における BCRP の関与する輸送に対する P-gp 阻害薬の阻害活性

P-gp 阻害薬の選択性を評価するため、典型的な BCRP 基質である mitoxantrone の Caco-2 膜透過における各 P-gp 阻害薬の阻害作用について検討を行った。P-gp 阻害薬の濃度を上げて、AB 方向の mitoxantrone の透過性の増大は認められなかった。それに対して、LY335979 を除く 6 種の P-gp 阻害薬は、mitoxantrone の BA 方向の膜透過を顕著に減少させた (Fig. 6)。これら阻害薬の IC_{50} を Table 2 に示す。GF120918、WK-X-34 及び VX-710 の mitoxantrone の膜透過に対する IC_{50} は、paclitaxel の膜透過より求めた IC_{50} とほぼ同程度であったことから、これら 3 化合物は P-gp と BCRP 双方を阻害する dualtype の P-gp 阻害薬であると考えられた。一方、mitoxantrone の BA 方向の膜透過における XR9576 及び LY335979 の阻害作用は、paclitaxel に対する阻害よりも弱かった (Table 2)。このことから、XR9576 及び LY335979 は P-gp に対して高い阻害活性を有しており、特に LY335979 は P-gp に選択性の高い阻害薬であると考えられた。

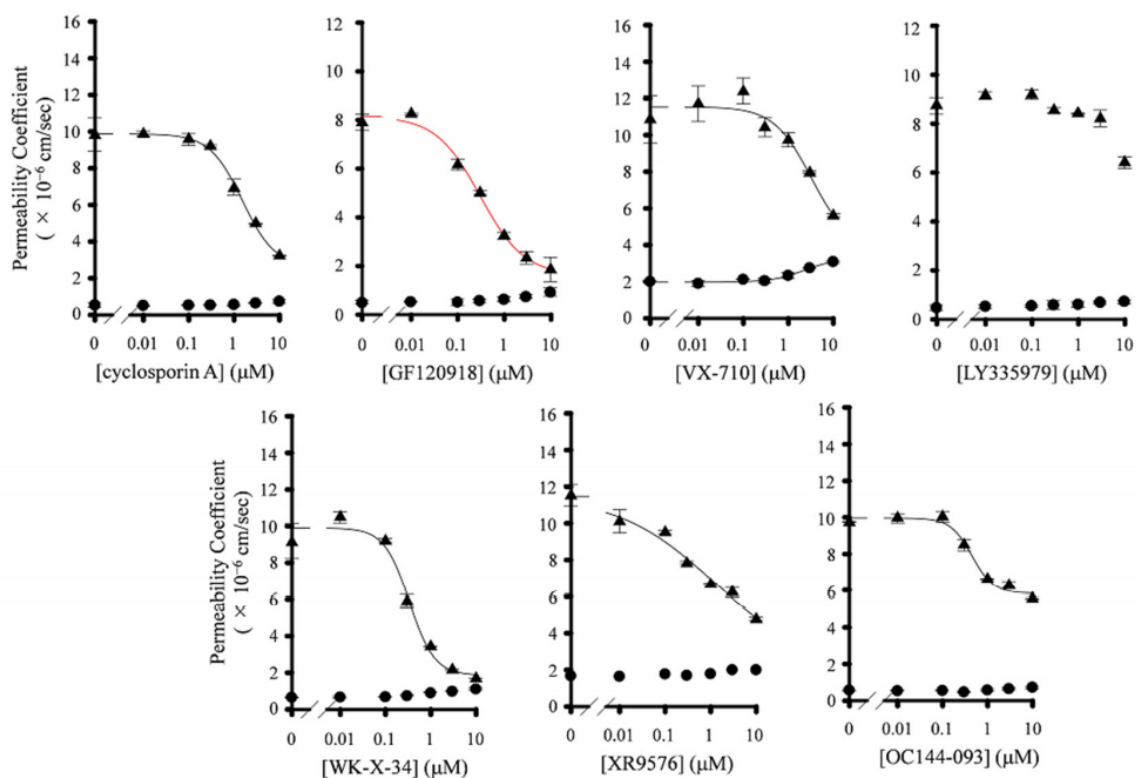


Fig. 6 Inhibitory effects of P-gp inhibitors on BCRP-mediated efflux of mitoxantrone in Caco-2 cells.

The $P_{app,AB}$ (●), and $P_{app,BA}$ (▲) values were determined by the AP-to-BL and BL-to-AP transport of mitoxantrone in Caco-2 cells in the presence or absence of various concentrations of P-gp inhibitors. The $P_{app,BA}$ values of mitoxantrone in the presence of GF120918, LY335979, and WK-X-34 were cited from Kawahara et al., [*Drug. Metab. Dispos.* 2020, 48, 491]. Data are represented as mean \pm S.D. for three experiments using different wells from a single passage of Caco-2 cells.

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Fig. 3)

Table 2 IC_{50} values and Hill coefficient of selected inhibitors on apparent AP-to-BL and BL-to-AP permeability, and ER of mitoxantrone in Caco-2 cell monolayers.

Inhibitor	IC_{50} (nM)			Hill Coefficient		
	$P_{app,AB}$	$P_{app,BA}$	ER	$P_{app,AB}$	$P_{app,BA}$	ER
Cyclosporin A	n.c.	2038 ± 13	1708 ± 248	n.c.	1.25 ± 0.17	1.33 ± 0.25
GF120918	n.c.	298 ± 13 ^a	307 ± 23	n.c.	0.93 ± 0.41	0.92 ± 0.15
XR9576	n.c.	1000 ± 45	531 ± 162	n.c.	0.41 ± 0.08	0.44 ± 0.05
LY335979	n.c.	>10 μM ^a	>10 μM	n.c.	n.c.	n.c.
WK-X-34	n.c.	370 ± 38 ^a	328 ± 96	n.c.	1.56 ± 0.53	1.51 ± 0.41
VX-710	n.c.	2675 ± 31	1638 ± 520	n.c.	1.04 ± 0.40	0.46 ± 0.12
OC144-093	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	1.83 ± 0.59	3.61 ± 0.41

a: Kawahara et al., [*Drug. Metab. Dispos.* 2020, 48, 491], n.c.: not calculated. IC_{50} on $P_{app,AB}$: the inhibitor concentration to achieve 50% increase of $P_{app,AB}$ of mitoxantrone. IC_{50} on $P_{app,BA}$: the inhibitor concentration to achieve 50% decrease of $P_{app,BA}$ of mitoxantrone. IC_{50} on ER: the inhibitor concentration to achieve 50% decrease of ER of mitoxantrone. Data are represented as mean ± S.D. for three experiments using different wells from a single passage of Caco-2 cells.

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 2)

1-3-3 LY335979 または WK-X-34 併用による P-gp 基質の消化管吸収への影響

LY335979 は P-gp 阻害活性が高く、また P-gp 選択性の高い阻害薬であることが明らかとなり、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阻害薬として優れた特性を有すると考えられた。そこで、P-gp 基質の paclitaxel をモデル化合物とし、WT マウスあるいは KO マウスに LY335979 を併用した際の paclitaxel の吸収性について P-S difference 法を用いて比較検討を行った。マウスに薬物を経口投与後の門脈及び全身血漿中濃度から消化管より吸収された薬物量を算出し、薬物の吸収率を評価した。また、P-gp と BCRP の dual inhibitor である WK-X-34 についても同様の検討を行った。

はじめに、マウスにおける paclitaxel の消化管吸収における P-gp の寄与について検討した。Mdr1a/1b KO マウスに、paclitaxel を経口投与したときの AUC_{sys} は 3086 nM・h であり、WT マウスの 1089 nM・h よりも約 3 倍高かった (Table 3)。また、 AUC_{pv} は WT マウスが Mdr1a/1bKO マウスよりも 3.3 倍大きかった。経口投与時の C_{max} は WT マウスに比べ KO マウスにおいて全身血漿中濃度は 442 nM から 1179 nM、門脈血漿中濃度は 730 nM から 2523 nM とそれぞれ 2.7 倍、3.5 倍の上昇が認められた。一方、paclitaxel を静脈内投与したときの V_{dss} 、 CL_{tot} は、WT と KO マウスの間にほとんど差は認められなかった (Table 3)。以上の結果から、paclitaxel の BA 及び $Fa \cdot Fg$ は WT マウスが 11.7% と 16.6%、KO マウスが 29.0% と 66.3% であり、KO マウスのほうがそれぞれ 2.3 倍と 4.1 倍高かった。以上のことから、paclitaxel の消化管吸収に P-gp が障壁となることを示唆するものと考えられる。

次に、paclitaxel の消化管吸収に対する WK-X-34 の影響について検討した。WT マウスに WK-X-34 併用時の paclitaxel の消失速度定数 (ke) は、paclitaxel 単独投与における ke よりもかなり低く、KO マウスの約 1/2 であった。WK-X-34 を前投与した際の paclitaxel の経口投与時における AUC_{sys} は 8636 nM・h と、KO マウス ($AUC_{sys} = 3086$ nM・h) と比較して約 3 倍上昇した。これらの結果から、WK-X-34 は paclitaxel の消失過程における排出トランスポーターや代謝酵素を阻害することが示唆された。

また、WT または KO マウスにおける paclitaxel の経口投与について、LY335979 併用 (60 mg/kg)、非併用時の PK プロファイルを解析した。WT マウスに 60 mg/kg LY335979 を前投与した際の paclitaxel の C_{max} は、全身血漿中濃度で 1208 nM と WT マウスの 2.7 倍まで上昇し、KO マウスとほぼ同じであった (Table 3)。また、LY335979 を前投与した際の門脈血の C_{max} は 2258 nM と KO マウスと差は認められなかった。また、LY335979 を前投与した際の paclitaxel の AUC_{sys} 及び AUC_{pv} はそれぞれ 3201 nM・h、7970 nM・h であり、KO マウス ($AUC_{sys} = 3086$ nM・h、 $AUC_{pv} = 6575$ nM・h) と比較し、わずかな上昇が認められた。また、WT マウスに LY335979 を前投与した際の paclitaxel の $Fa \cdot Fg$ は 86.8% となり、WT マウス及び KO マウスと比較して、それぞれ 5.2 倍、1.3 倍の上昇が認められた。一方、LY335979 を前投与した際の paclitaxel の ke は $0.64 h^{-1}$ と、WT マウスと同程度の値となったため、paclitaxel の消失過程での排出に関与するトランスポーターや代謝酵素に対する影響は小さいと考えられる。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of paclitaxel after intravenous and oral administration to wild type (WT) and *mdr1a/1b* knockout (KO) mice.

		WT		<i>mdr1a/1b</i> KO			WT + WK-X-34		WT + LY335979		
		IV	po		IV	po		po		po	
			pv	sys		pv	sys	pv	sys	pv	sys
Dose	(mg/kg)	5	20	5	20	20	20	20	20		
C_{max}	(nM)	—	730	442	—	2523	1179	3018	1631	2258	1208
T_{max}	(h)	—	1	1	—	1	1	0.5	2	0.5	1
AUC	(nM·hr)	2320	2002	1089	2661	6575	3086	10,615	8636	7970	3201
k_e	(h ⁻¹)		0.43	0.50		0.55	0.35	0.26	0.23	0.53	0.64
$t_{1/2}$	(h)	2.38	1.62	1.37	2.12	1.25	2.00	2.69	2.98	1.30	1.09
MRT	(h)	1.71	2.51	2.29	1.47	2.16	3.09	4.15	4.67	2.42	2.25
CL_{tot}	(L/h/kg)	2.52			2.20						
Vd_{ss}	(L/kg)	4.32			4.15						
BA			11.7			29.0					
F_aF_g			16.6			66.3		36.0		86.8	
F_h			70.6			45.7					

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 3)

1-3-4 Paclitaxel の吸収速度に対する P-gp 阻害薬の影響

ここまで、paclitaxel の消化管吸収における P-gp 阻害薬の影響について、P-S difference 法を用いて評価してきた。しかし、吸収過程あるいは消失過程における P-gp 以外のトランスポーターや代謝酵素への影響により、過大評価あるいは過小評価してしまうリスクがあることが示唆された。そこで、P-gp 以外の因子への影響を最小にするため、阻害薬の投与量を減らした。また、阻害薬を投与後の早い時間に採血を行い、paclitaxel の吸収速度を算出した。

各 P-gp 阻害薬を前投与したマウスに paclitaxel を 10 mg/kg で経口投与後 10 分における全身血漿中濃度と門脈血漿中濃度及び吸収速度を Table 4 に示す。全身血漿中濃度 (C_{sys}) において、WT マウスと KO マウスに顕著な差は認められなかった。しかしながら、門脈血漿中濃度 (C_{pv}) においては、KO マウスで 967 nM となり、WT マウスの 439 nM と比較して顕著に上昇した。WT マウスと KO マウスにおける吸収速度はそれぞれ 15.7、54.3 nmol/min/kg となり、KO マウスは WT マウスに比べ約 3.5 倍高かった。WT マウスに CsA または WK-X-34 を前投与すると、paclitaxel の吸収速度はそれぞれ 38.7、39.8 nmol/min/kg に上昇し、これらの値は KO マウスにおける吸収速度よりわずかに低かった。

一方、LY335979 の前投与によって WT マウスにおける paclitaxel の吸収速度は顕著に上昇した (60.2 nmol/min/kg)。この速度は KO マウスと同程度であった。さらに、CsA、LY335979、WK-X-34 を前投与した際の paclitaxel の全身血漿中濃度 (C_{sys}) は、KO マウスの濃度と同程度であった。したがって、これらの阻害薬を併用した際の血中濃度は、paclitaxel の代謝の影響を最小限にした結果と考えられる。

また、P-gp 阻害薬を前投与したマウスに paclitaxel 10 mg/kg を投与後 30 分における全身血漿中濃度及び門脈血漿中濃度を測定し、吸収速度を算出した (Table 5)。KO マウスにおける paclitaxel の全身血

漿中濃度 (C_{sys}) は、WT マウスと比較してわずかな上昇であったのに対して、門脈血漿中濃度 (C_{pv}) は WT マウスと比較して顕著に上昇した。吸収速度は WT マウスと KO マウスで、それぞれ 12.4、63.7 nmol/min/kg となり、KO マウスにおいて、WT マウスの約 5.1 倍の上昇が認められた。また、各 P-gp 阻害薬を 15 mg/kg で投与した際の paclitaxel の全身血漿中濃度及び門脈血漿中濃度は、両者とも WT マウスと比較して上昇傾向はあるものの顕著な差は認められず、阻害薬併用による P-gp の阻害効果はほとんど認められなかった。一方、阻害薬を 30 mg/kg で前投与した場合、 C_{sys} 、 C_{pv} 、 V が顕著に上昇した。特に、LY335979 を前投与した際には、paclitaxel の吸収速度は 66.4 nmol/min/kg と、KO マウスとほぼ同程度まで上昇した。一方、WT マウスに cyclosporin A を前投与した際の paclitaxel の吸収速度は KO マウスよりも低かった。WT マウスに P-gp 阻害薬を 30 mg/kg で前投与した際の paclitaxel の C_{sys} は、未処置の WT マウスや KO マウスよりも高くなったが、LY335979 は C_{sys} の上昇の程度が小さかった。LY335979 においては、代謝酵素阻害の影響は小さいと考えられる。一方、WK-X-34 を前投与した際の paclitaxel の吸収速度と C_{sys} は、KO マウスと比べ上昇したことから、WK-X-34 が paclitaxel の代謝過程に影響を及ぼしていると考えられる。

Table 4 Absorption rate of paclitaxel (10 mg/kg) at 10 min after its oral administration with or without P-gp inhibitor in WT and Mdr1a/1b KO mice.

	<i>n</i>	+Inhibitor (mg/kg)	C_{pv} (nM)	C_{sys} (nM)	$C_{pv} - C_{sys}$ (nM)	Absorption Rate <i>V</i> (nmol/min/kg)
WT mice	3		439 ± 98	223 ± 76	216 ± 80	15.7
+Cyclosporin A	5	30	708 ± 77	263 ± 168	534 ± 102	38.7
+LY335979	6	30	1009 ± 149	202 ± 52	830 ± 140	60.2
+WK-X-34	3	30	746 ± 57	196 ± 64	549 ± 7.5	39.8
<i>mdr1a/1b</i> KO mice	6		967 ± 191	218 ± 100	749 ± 165	54.3

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 4)

Table 5 Absorption rate of paclitaxel (10 mg/kg) at 30 min after its oral administration with or without P-gp inhibitor in WT and Mdr1a/1b KO mice.

	<i>n</i>	+Inhibitor (mg/kg)	C_{pv} (nM)	C_{sys} (nM)	$C_{pv} - C_{sys}$ (nM)	Absorption Rate <i>V</i> (nmol/min/kg)
WT mice	3		328 ± 41	135 ± 41	165 ± 61	12.4
+Cyclosporin A	2	15	540	315	225	16.9
+LY335979	3	15	626 ± 82	368 ± 30	259 ± 45	19.5
+WK-X-34	3	15	674 ± 139	238 ± 63	437 ± 127	32.9
+Cyclosporin A	3	30	1488 ± 146	829 ± 166	657 ± 38	49.4
+LY335979	3	30	1407 ± 70	524 ± 58	883 ± 59	66.4
+WK-X-34	3	30	2069 ± 204	757 ± 100	1311 ± 87	98.6
<i>mdr1a/1b</i> KO mice	3		1092 ± 118	245 ± 69	847 ± 144	63.7

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 5)

1-3-5 BCRP に対する P-gp 阻害薬の影響

In vivo における P-gp 阻害薬の選択性を確認するため、BCRP 基質である topotecan をマウスに経口投与後 30 分における C_{sys} 、 C_{pv} 、 V に対する P-gp 阻害薬の影響を検討した。Topotecan を経口投与後 30 分における Mdr1a/1b KO マウスの C_{sys} は WT マウスと比較してほぼ同程度であったのに対して、Bcrp KO マウスでは上昇傾向が認められた (Table 6)。また、 C_{pv} は Bcrp KO マウスで 469 nM となり、WT マウス及び Mdr1a/1b KO マウスの約 2 倍に上昇した。また、Bcrp KO マウスにおける吸収速度は 5.30 nmol/min/kg となり、WT マウス及び Mdr1a/1b KO マウスに比べ、それぞれ約 4.1 倍及び 2.4 倍の上昇が認められた。以上の結果は、topotecan の消化管吸収に BCRP が大きく関与していることを示している。一方、WT マウスにおける topotecan の吸収速度は、WK-X-34 (30 mg/kg) の前投与により顕著に上昇し、Bcrp KO マウスとほぼ同レベルに達した。一方で、WT マウスに LY335979 を併用した際の topotecan の吸収速度は、Mdr1a/1b KO マウスとほぼ同程度であった。以上の結果は、WK-X-34 の BCRP 阻害活性が高いのに対し、LY335979 は BCRP に対する親和性が低いことを示唆するものとなった。

Table 6 Absorption rate of topotecan (2 mg/kg) at 30 min after its oral administration with or without P-gp inhibitor in WT, Mdr1a/1b KO and Bcrp KO mice.

	<i>n</i>	+Inhibitor (mg/kg)	C_{pv} (nM)	C_{sys} (nM)	$C_{pv} - C_{sys}$ (nM)	Absorption Rate V (nmol/min/kg)
WT mice	3		196 ± 29	179 ± 25	17.1 ± 5.7	1.29
+Cyclosporin A	2	30	298	240	58.5	4.40
+LY335979	3	30	249 ± 26	228 ± 22.3	20.5 ± 9.7	1.54
+WK-X-34	3	30	464 ± 53	388 ± 19	76.6 ± 27	5.76
<i>mdr1a/1b</i> KO mice	3		236 ± 30	207 ± 28	28.9 ± 8.4	2.17
<i>bcrp</i> KO mice	3		469 ± 64	398 ± 88	70.5 ± 20	5.30

(*Pharmaceutics*, **13**, 388 (2021): Table 6)

1-4 考察

本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* の消化管吸収における P-gp の影響について評価するための P-gp 阻害薬の有用性について検討を行った。各 P-gp 阻害薬の paclitaxel 及び mitoxantrone の Caco-2 膜透過に対する阻害活性及び選択性を、膜透過係数及び ER から算出した IC_{50} を用いて評価した。Paclitaxel の $P_{app,AB}$ から算出した IC_{50} は、 $P_{app,BA}$ から算出した IC_{50} と比較して低くなる傾向が認められた。また、mitoxantrone において、阻害薬併用時の $P_{app,AB}$ の増大が認められなかったため、 $P_{app,AB}$ から IC_{50} は算出できなかった。P-gp 阻害薬の P-gp 基質または BCRP 基質に対する阻害作用は、排出方向よりも吸収方向のほうが弱いことが示唆された。実際に Troutman らは、ほとんどの薬物で吸収方向の透過から算出した P-gp に対する K_m が、排出方向における K_m より大きくなることを報告しており⁵⁸、著者の検討結果と一致した。つまり、各薬物間での P-gp の影響を比較する際に、ER が必ずしも吸収方向の透過における P-gp の寄与を反映するパラメータではないと考えられる。したがって、各阻害薬が有する P-gp 阻害活性と BCRP 阻害活性を評価する際には、paclitaxel 及び mitoxantrone の $P_{app,BA}$ から算出した IC_{50} をもとに評価した。

Caco-2 膜透過性試験において、GF120918、WK-X-34 及び VX-710 は P-gp と BCRP の両方に対する阻害活性が認められた。Jonker らは、Mdr1a/1b KO マウスに BCRP 基質である topotecan を経口投与したところ、GF120918 併用時において AUC が約 6 倍上昇したことを報告している⁵⁹。他の検討においても、P-gp と BCRP 両方の基質である dasatinib や crizotinib の血漿中及び脳中濃度が GF120918 によって顕著に上昇することが報告されている^{60,61}。これらの結果は GF120918 が P-gp と BCRP の両方の強い阻害薬であることを示している。また、WK-X-34 は、BCRP を過剰発現させた MCF7 細胞において mitoxantrone の取り込みを有意に阻害することから BCRP 阻害活性も有する化合物であることを報告している⁶²。GF120918 と WK-X-34 は、いずれも強力な P-gp 阻害薬によく認められる N-ethyl-tetrahydroisoquinoline 構造を有しており⁶³、この構造が BCRP に認識される可能性が考えられる。VX-710 は BCRP を過剰発現させた MCF7 AdVp3000 細胞において BCRP 基質である mitoxantrone や SN-38 の取り込みを顕著に減少させることが報告されており⁶⁴、本研究において得られた結果を支持するものとなった。したがって、これら 3 種の阻害薬で特に GF120918 や WK-X-34 は P-gp 及び BCRP 阻害活性が高いことから、排出トランスポーター阻害時の薬物体内動態の評価に有用な化合物であると考えられる。

これに対し、LY335979 あるいは XR9576 に関しては、高い P-gp 阻害活性が認められ、BCRP に対する親和性は比較的低かった。特に LY335979 に関しては、paclitaxel の Caco-2 の BA 方向の透過 ($P_{app,BA}$) から算出した IC_{50} が mitoxantrone のそれと比較し 1/100 以下となり、P-gp に対する選択性がかなり高いと考えられる。Shepard らも LY335979 は P-gp への親和性が BCRP への親和性の 100 倍高いことを報告しており⁶⁵、本結果を支持するものとなった。一方、XR9576 に関して、paclitaxel の $P_{app,BA}$ に対する IC_{50} は、mitoxantrone における IC_{50} よりも 15.6 倍弱かった。Pick らは、XR9576 の

P-gp による Hoechst33342 の透過に対する IC_{50} は、BCRP による mitoxantrone に対する IC_{50} よりも約 20 倍低いことを報告しており⁶⁶、我々の検討結果と一致した。以上の結果から、LY335979 が強力な選択的な P-gp 阻害薬と考えられた。

次に、P-gp と BCRP の dual inhibitor である WK-X-34 及び LY335979 について、paclitaxel の *in vivo* 消化管吸収に対する影響を検討した。これまで、数種の P-gp 阻害薬において、paclitaxel の *in vivo* 消化管吸収に対する検討が報告されている⁶⁷⁻⁶⁹。しかしながら、その大多数が全身血から得られる薬物動態パラメータを用いた評価を行っており、本検討で用いた P-S difference 法を用いて P-gp 阻害薬を併用した際の paclitaxel の消化管吸収性を評価した報告はなされていない。当研究室では、P-S difference 法が消化管吸収性を評価する方法として有用であることを明らかにしてきた。この手法は *in vivo* における局所吸収動態の詳細な解析に有効な手段の一つであり、これまで種々の薬物の吸収速度や吸収率を解析するのに応用されてきた^{70,71}。P-S difference 法は、正味の $Fa \cdot Fg$ を見積もるのに有用性が高い方法と考えられる。本研究において、WK-X-34 併用により paclitaxel の消失が遅れたことから、WK-X-34 は P-gp や BCRP の排出トランスポーターだけでなく、代謝酵素も阻害することが示唆された。Paclitaxel は主に CYP2C8 や CYP3A4 によって代謝されることが報告されている^{72,73}。WT マウスにおいて WK-X-34 を前投与した paclitaxel の経口投与時における AUC_{sys} は、Mdr1a/1b KO マウスの 1.6 倍に留まり、WT マウスの $Fa \cdot Fg$ は Mdr1a/1b KO マウスの半分程度であった。これに関しては、40 mg/kg の投与量では P-gp を完全に阻害しきれていないことや、WK-X-34 の P-gp 阻害時間が短いと考えられた。それに対して、LY335979 を前投与した paclitaxel の経口投与時における AUC_{sys} は、未処置の WT マウスの約 2.9 倍であり、Mdr1a/1b KO マウスと同等であった。さらに、LY335979 は paclitaxel の消失過程への影響が少ないと考えられ、Danzig らは CYP3A4 に対する LY335979 の親和性は P-gp よりも約 60 倍弱いことを報告しており⁷⁴、我々の結果を支持するものであった。しかしながら、WT マウスに LY335979 を前投与した paclitaxel の $Fa \cdot Fg$ は、Mdr1a/1b KO マウスよりも高かったことから、LY335979 は小腸における CYP3A4 を阻害する可能性が示唆された。

さらに、paclitaxel の消化管吸収における P-gp 阻害薬の影響を検討する際、代謝の影響を最小限にするため、LY335979 の用量を減らし薬物投与後の早い段階で血漿中濃度を測定した。WT マウスに P-gp 阻害薬を前投与した paclitaxel 経口投与後 10 分の C_{sys} は、Mdr1a/1b KO マウスに対して顕著な差が認められなかったことから、代謝の影響を大幅に軽減できたものと考えられる。さらに、WT マウスに LY335979 を前投与した topotecan 経口投与後 30 分の C_{sys} 及び C_{pv} は、未処置の WT マウスや Mdr1a/1b KO マウスと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 に選択性の高い阻害薬として最も有用であることが明らかとなった。薬物の消化管吸収における BCRP の寄与を評価するための阻害薬として P-gp 選択的阻害薬の LY335979 及び P-gp と BCRP の両者に対する阻害薬 WK-X-34 を選定した。

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

2-1 緒言

消化管には P-gp のほかに BCRP が発現していることが明らかとなり、その発現量は MDR1 よりも高いことが報告されている^{36,75,76}。したがって、消化管に発現する BCRP もまた薬物の吸収障壁として機能する可能性が考えられる。多剤耐性癌細胞から 1998 年に発見された BCRP は^{75,77,78}、P-gp 同様分子内に ATP 結合部位と膜貫通部位を持つ 72 kDa の膜タンパク質であり、癌細胞だけでなく、胎盤、肝臓、脳、小腸など数多くの正常組織における発現が確認されている⁷⁹。他の多くの ABC transporter が分子内に二つの ATP 結合部位を持つのに対して、BCRP は一つしか持たないことから half-transporter と呼ばれているが、分子間ジスルフィド結合を介した homodimer または homotetramer の状態で存在、機能していると推定されている^{80,81}。また、BCRP は P-gp と同じく極めて幅広い基質認識性を有し、抗癌剤などの各種薬物に加えて、内因性物質のグルクロン酸及び硫酸抱合体、尿酸などを良好な基質とする⁸²⁻⁸⁴。臨床においても薬物動態に及ぼす BCRP の影響が確認されている。P-gp と BCRP の阻害薬である GF120918 を topotecan と併用すると、topotecan のヒトにおける BA が 40 % から 97 % にまで顕著に増大するという報告がなされている⁸⁵など、消化管における BCRP の影響は無視できないものとなっている。発現系を用いた解析は各薬物が BCRP の基質であるかの判定において有用であるが、消化管吸収における寄与の見積もりは困難である。したがって、創薬の探索段階において、薬物の消化管吸収における BCRP の寄与の定量的な評価が必要であると考えられる。

そこで本章では、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、第 1 章で選定した P-gp 選択的阻害薬の LY335979 及び P-gp と BCRP の両者に対する阻害薬の WK-X-34 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。

2-2 方法

2-2-1 実験材料

Caffeine、Sepazol-RNAI Super[®]、DMEM、antibiotic-antimycotic mixed stock solution (×100)、0.25% trypsin / 1 mM EDTA solution はナカライテスクより、HBSS、daidzein、sulfasalazine、GF120918 (elacridar) は Sigma 社より、SN-38 は和光純薬工業より、ciprofloxacin は LKT Laboratories, Inc. より、nitrofurantoin は MP Biomedicals, Inc. より、topotecan HCl は Alexis Corporation より、WK-X-34 はコスモバイオより、LY335979 (zosuquidar) はフナコシよりそれぞれ購入した。D-[1-¹⁴C] mannitol (specific radioactivity: 8 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. より、[6,7-³H(N)]-estrone sulfate, ammonium salt (specific radioactivity : 57.3 Ci/mmol) は PerkinElmer[®] Life and Analytical Sciences より、Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG は Thermo Fisher より、real-time PCR primer set は Eurofin Genomics より、RT (5×) buffer、dNTP mix、random primer、oligo (dT)₂₀ 及び ReverTra Ace は TOYOBO より、Transwell[®] は Corning よりそれぞれ購入した。その他の試薬については市販の特級品を用いた。

2-2-2 細胞培養

Caco-2 細胞は DS Pharma Biomedical (Osaka) より購入した。細胞は 10% FBS、1% non-essential amino acid solution、penicillin G (100 U/mL) ならびに streptomycin (100 µg/mL) を含有する DMEM で培養し、継代は約 80% コンフルエントの時に行った。培養フラスコ上で培養した細胞を 0.02% EDTA / 0.05% trypsin を用いて剥離後、 1×10^5 個の細胞を 12 well Transwell[®] (0.4 µm pore size, 12 mm id) に播種した。培地交換は 3 日毎に行い、播種後 3 週間培養したものを実験に供した。

2-2-3 Real-time RT-PCR

Transwell[®] 上で 3 週間培養した Caco-2 細胞から Sepazol-RNA I Super[®] を用いて常法に従い total RNA を抽出した。TaqMan[®] Gene Expression Assays プロトコールに従い、ABI 7500 Fast Real Time PCR System を用いて PCR を行った。各 primer、probe の sequence は Table 7 に示した。データ解析は 7500 Fast SDS Software を用いて定量し、各 target mRNA product 量を GAPDH mRNA product 量で補正することにより、target mRNA / GAPDH mRNA の相対比を求めた。

Table 7 Sequences and size of real-time RT-PCR primers.

Target Protein	Sequence	PCR product size (bp)
MDR1 (ABCB1)		
Forward primer	5'-AGG AAG CCA ATG CCT ATG ACT TTA-3'	80
Reverse primer	5'-CAA CTG GGC CCC TCT CTC TC-3'	
TaqMan probe	5'-ATG AAA CTG CCT CAT AAA TTT GAC ACC CTG G-3'	
BCRP (ABCG2)		
Forward primer	5'-TGA CTC AGA TCA TTG TCA CAG TCG-3'	106
Reverse primer	5'-ACT GGT TGG TCG TCA GGA AGA-3'	
TaqMan probe	5'-TGG AAT CCA GAA CAG CGA TGG GGT TCT-3'	
MRP2 (ABCC2)		
Forward primer	5'-TGC AGC CTC CAT AAC CAT GA-3'	88
Reverse primer	5'-GGA CTT CAG ATG CCT GCC A-3'	
TaqMan probe	5'-TCG AAC ACT TAG CCG CAG TTC TAG GTC CA-3'	
CYP3A4		
Forward primer	5'-AGG ATG AAA GAA AGT CGC CTC G-3'	166
Reverse primer	5'-TGG TTT CAT AGC CAG CAA AA-3'	
TaqMan probe	5'-TGG AGC TCG TGG CCC AAT CAA TTA TC-3'	
GAPDH		
Forward primer	5'-GAA GGT GAAGGT CGG AGT C-3'	226
Reverse primer	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	
TaqMan probe	5'-CAA GCT TAA CGT TCT CAG CC-3'	

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Suppl Table 1)

2-2-4 透過実験

Caco-2 単層膜を HBSS で 1 回洗浄後、AP 側に 0.5mL、BL 側に 1.5mL の HBSS を加え、37 °C 恒温槽上で 10 分間プレインキュベーション後、AP 側または BL 側を薬液で置換し実験を開始した。経時的に receptor 側より一定量採取した後、等量の HBSS を receptor 側に加えた。一方、阻害実験ではプレインキュベーションの段階から実験終了時まで両側に阻害薬を終濃度 0.01、0.1、0.3、1、3、10 μM となるように調整した HBSS あるいは薬液を添加した。以上の方法により、阻害薬共存及び非共存条件下における AP 側から BL 側への吸収方向の透過性 (P_{AB})、BL 側から AP 側への排出方向への透過性 (P_{BA}) を求めた。

2-2-5 測定条件

透過実験における [^{14}C]mannitol、[^3H]estrone-3-sulfate の定量は採取した receptor 溶液にシンチレーションカクテル (Cleosol I、ナカライテスク) を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター

(BECKMANLS-6500、Beckman) にて測定した。その他の化合物については、以下の HPLC 条件により測定した。

LC | Shimadzu LC-10A series HPLC

カラム | COSMOSIL 5C18-AR-II (3.5 μm, 4.6 × 150 mm、ナカライテスク)

流速 | 1.0 mL/min

カラム温度 | 40 °C

移動相、検出 (UV または蛍光) |

Caffeine : 10 mM phosphate buffer (pH 3.0) with methanol (75:25, v/v)、UV 273 nm

Daidzein : 0.1% formic acid with acetonitrile (73:27, v/v)、UV 250 nm

Nitrofurantoin : 10 mM phosphate buffer (pH 3.0) with acetonitrile (83:17, v/v)、UV 366 nm

Sulfasalazine : 5 mM phosphate buffer (pH 6.0) with acetonitrile (78:22, v/v)、UV 357 nm

Ciprofloxacin : 10 mM formate buffer (pH 3.0) with methanol and acetonitrile (82:9:9, v/v)、Ex 280 nm、Em 460nm

SN-38 : 10 mM phosphate buffer (pH 3.0) with acetonitrile (74:26, v/v)、Ex 380 nm、Em 550 nm

Topotecan : 10 mM phosphate buffer (pH 3.7) with methanol (76:24, v/v)、Ex 361 nm、Em 527 nm

2-2-6 データ解析

Caco-2 膜透過試験における透過係数、阻害薬 IC_{50} 、トランスポーター活性 ER の算出については、1-2-8 項に記載した。

Caco-2 単層膜透過性における BCRP 及び P-gp の寄与を評価するにあたり、Troutman らは、薬物の Caco-2 単層膜透過性における P-gp の寄与を反映させるパラメータとして Absorptive Quotient (AQ) を提唱しており⁸⁶、算出方法を以下に示す。

$$AQ = (P_{AB,+inhibitor} - P_{AB}) / P_{AB,+inhibitor}$$

AQ は吸収方向の透過における P-gp の寄与率を表す。 AQ は 0-1 の値をとり、1 に近いほど吸収方向における P-gp の寄与が大きいことを示す。

上記の理論と Tachibana らの報告⁸⁷を基に、我々は net flux に対する排出トランスポーターの寄与を反映させた AQ を新たに設定した。

$$AQ_{efflux} = \frac{P_{AB,+WK-X-34} - P_{AB}}{P_{AB,+WK-X-34}} = \frac{P_{P-gp} + P_{BCRP}}{P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{P-gp} + P_{BCRP}}$$

$$AQ_{P-gp} = \frac{P_{AB,+LY335979} - P_{AB}}{P_{AB,+WK-X-34}} = \frac{(P_{AP,eff} + P_{BL,eff}) \cdot P_{P-gp}}{(P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{P-gp} + P_{BCRP}) \cdot (P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{BCRP})}$$

$$AQ_{BCRP} = \frac{P_{AB,+WK-X-34} - P_{AB,+LY335979}}{P_{AB,+WK-X-34}} = \frac{P_{BCRP}}{P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{BCRP}}$$

ここで、 AQ_{efflux} は P-gp と BCRP 両方が関与する AQ 、 AQ_{P-gp} は P-gp が関与する AQ 、 AQ_{BCRP} は

BCRP が関与する AQ 、 $P_{AP,eff}$ は細胞内から AP 側への受動輸送による膜透過係数、 $P_{BL,eff}$ は細胞内から BL 側への受動輸送による膜透過係数、 P_{P-gp} は P-gp による膜透過係数、 P_{BCRP} は BCRP による膜透過係数を表す。P-gp 選択的阻害薬である LY335979 は BCRP の輸送に対して阻害をしないと仮定した (Fig. 7)。

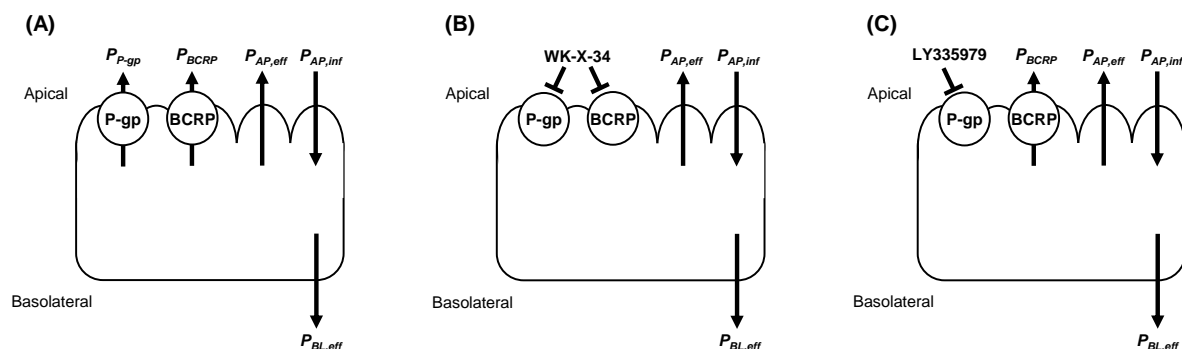


Fig. 7 Schematic diagrams for calculating AQ using WK-X-34 and LY335979. Models for AP-to-BL permeability considering the intrinsic influx and efflux clearance. (A) Without inhibitors, (B) with WK-X-34, and (C) with LY335979.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 1)

2-2-7 統計解析

2 群間の比較には ANOVA を、control に対する多群比較には Dunnett's 検定を使用した。

2-3 結果

2-3-1 BCRP 基質化合物の Caco-2 単層膜透過性及び BCRP の寄与の評価

今回選択したモデル化合物のコントロール条件下及び BCRP または P-gp の阻害薬共存下における Caco-2 膜透過性試験を行い、膜透過における BCRP と P-gp の寄与の程度について検討を行った。第 1 章の結果から、本検討においては BCRP と P-gp 双方の阻害薬として 10 μ M の WK-X-34、P-gp 阻害薬として 1 μ M の LY335979 を用いることとした。薬物の Caco-2 単層膜透過性における排出トランスポーターの関与を反映するパラメータとして *ER* 及び *AQ* を用いた。

はじめに、受動拡散のみで膜を透過する caffeine 及び mannitol の膜透過性に対する WK-X-34 及び LY335979 の影響について検討した。Caffeine と mannitol は WK-X-34 及び LY335979 共存下においても、AB、BA 両方向の膜透過性に変化は認められなかった (Fig. 8)。次に、典型的な BCRP 基質である topotecan 及び estrone-3-sulfate (E3S) の Caco-2 単層膜透過性について検討した。Topotecan の *ER* が 12.7 を示すことから、排出トランスポーターの関与が確認された (Fig. 9A)。さらに、LY335979 共存下において、topotecan の透過性にほとんど変化が認められなかったのに対し、WK-X-34 共存下において、AB 方向の透過性の改善及び BA 方向の透過性の低下が認められ、膜透過における方向性が消失したことから、topotecan が BCRP の良好な基質であることが確認された。一方、E3S の *ER* は 2.1 となり (Fig. 9B)、膜透過性において排出トランスポーターの関与が示されたものの、AB 方向の透過性は比較的良好 ($P_{AB}=9.88 \times 10^{-6}$ cm/s) であり、WK-X-34 共存下においてもほとんど改善されなかったことから、E3S の吸収方向の透過における BCRP の寄与は小さいことが示唆された。しかしながら、WK-X-34 共存下における E3S の BA 方向の透過性は顕著に低下し、排出方向において BCRP の影響を大きく受けることが示された。

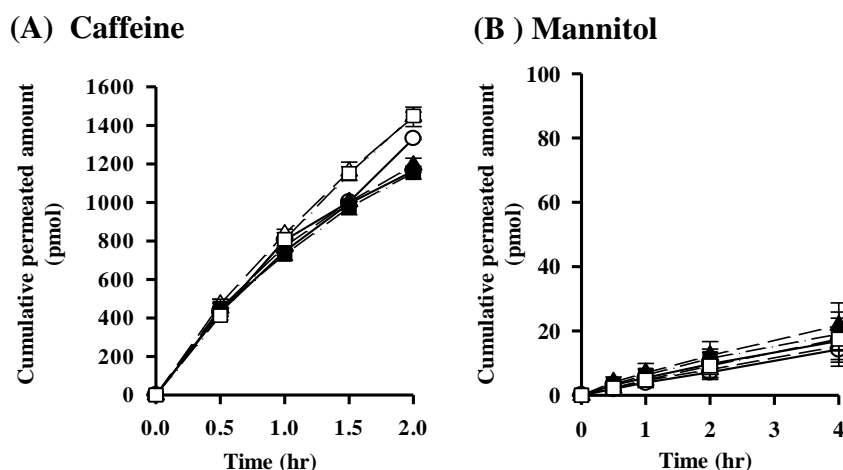


Fig. 8 Bidirectional transport of caffeine (A) and mannitol (B) across Caco-2 cell monolayers.

The AP-to-BL and BL-to-AP transport of caffeine (5 μ M) and mannitol (5 μ M) in the absence or presence of WK-X-34 or LY335979 in Caco-2 cell monolayers. Data are represented as means \pm S.D. of 3 experiments. Keys: (\circ) control, AP-to-BL; (\bullet) control, BL-to-AP; (\blacktriangle) + WK-X-34, AP-to-BL; (\triangle) + WK-X-34, BL-to-AP; (\blacksquare) + LY335979, AP-to-BL; (\square) + LY335979, BL-to-AP.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 3)

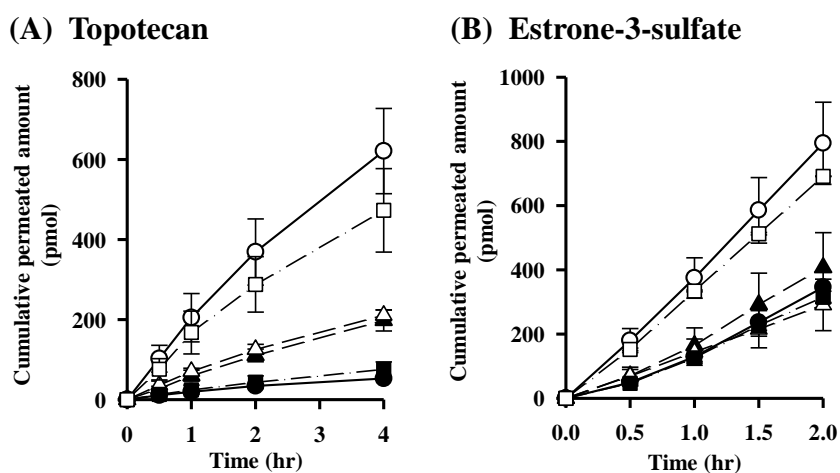


Fig. 9 Bidirectional transport of topotecan (A) and estrone-3-sulfate (B) across Caco-2 cell monolayers.

The AP-to-BL and BL-to-AP transport of topotecan (5 μ M) and estrone-3-sulfate (5 μ M) in the absence or presence of WK-X-34 or LY335979 in Caco-2 cell monolayers. Data are represented as means \pm S.D. for 3 experiments. Keys: (\circ) control, AP-to-BL; (\bullet) control, BL-to-AP; (\blacktriangle) + WK-X-34, AP-to-BL; (\triangle) + WK-X-34, BL-to-AP; (\blacksquare) + LY335979, AP-to-BL; (\square) + LY335979, BL-to-AP.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 4)

2-3-2 モデル化合物の Caco-2 単層膜透過性及び BCRP の寄与の評価

Daidzein, ciprofloxacin, nitrofurantoin, SN-38 及び sulfasalazine の Caco-2 単層膜透過性及び BCRP の寄与について検討した。Daidzein の吸収方向の透過性は、 P_{AB} が $20.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ と高く、飽和性の透過を示した (Fig. 10A)。さらに、 ER は 1.6 と膜透過性に方向性がなく、阻害薬の影響もほとんど認められなかったことから、daidzein の Caco-2 単層膜における BCRP の寄与はほとんどないものと考えられた。Ciprofloxacin の透過性においても ER は 2.4 と膜透過における排出トランスポーターの関与が示唆された (Fig. 10B)。しかしながら、 AQ_{efflux} は 0.15 と排出方向において P-gp 及び BCRP はほとんど寄与しないことが明らかとなった。

一方、nitrofurantoin の ER 及び AQ_{efflux} はそれぞれ 7.6 及び 0.46 であったことから (Fig. 11A)、Caco-2 単層膜透過性において排出トランスポーターが関与していることが示された。しかし、nitrofurantoin の AQ_{BCRP} と $AQ_{\text{P-gp}}$ は 0.37 と 0.09 であったことから、P-gp はほとんど寄与していないと考えられた。SN-38 及び sulfasalazine の ER はそれぞれ 6.7 と 71.6 であり (Fig. 11B、Fig. 11C)、排出トランスポーターの関与が認められた。特に sulfasalazine の P_{AB} は $0.19 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ と低い透過性を示したのに対して、 P_{BA} は $13.3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ と顕著に高く、 ER が 71.6 であったことから、排出トランスポーターの影響が極めて大きいことが示された。両化合物ともに LY335979 共存下において膜透過性にほとんど変化が認められなかった ($AQ_{\text{P-gp}}=0, 0.10$) ことから、これら化合物の Caco-2 単層膜透過に P-gp はほとんど寄与していないことが示された。しかしながら、WK-X-34 共存下における SN-38 及び sulfasalazine の透過性は顕著に改善され、 AQ_{BCRP} はそれぞれ 0.74 及び 0.59 であった。したがって、これら化合物の膜透過に BCRP が極めて大きく影響していることが明らかとなった。

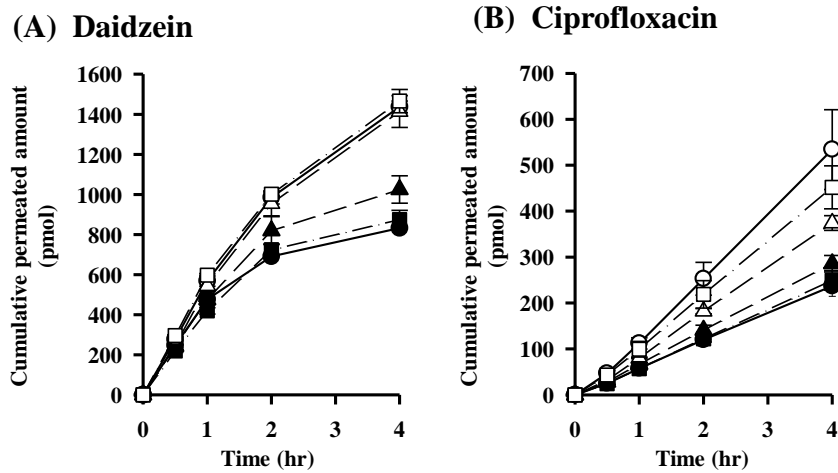


Fig. 10 Bidirectional transport of daidzein (A) and ciprofloxacin (B) across Caco-2 cell monolayers.

The AP-to-BL and BL-to-AP transport of daidzein (5 μM) and ciprofloxacin (5 μM) in the absence or presence of WK-X-34 or LY335979 in Caco-2 cell monolayers. Data are represented as means \pm S.D. for 3 experiments. Keys: (\circ) control, AP-to-BL; (\bullet) control, BL-to-AP; (\blacktriangle) + WK-X-34, AP-to-BL; (\triangle) + WK-X-34, BL-to-AP; (\blacksquare) + LY335979, AP-to-BL; (\square) + LY335979, BL-to-AP.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 5)

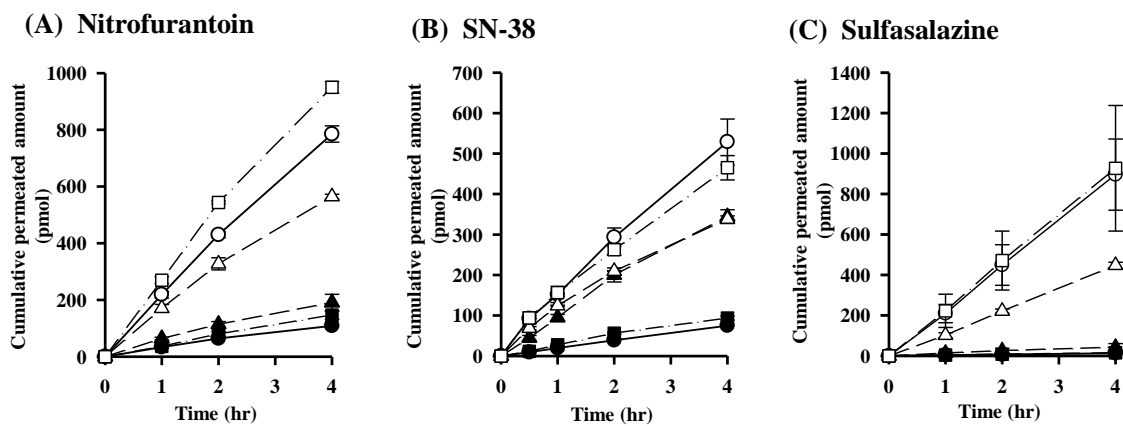


Fig. 11 Bidirectional transport of nitrofurantoin (A), SN-38 (B), and sulfasalazine (C) across Caco-2 cell monolayers.

The AP-to-BL and BL-to-AP transport of nitrofurantoin (5 μM), SN-38 (5 μM), and sulfasalazine (5 μM) in the absence or presence of WK-X-34 or LY335979 in Caco-2 cell monolayers. Data are represented as means \pm S.D. for 3 experiments. Keys: (\circ) control, AP-to-BL; (\bullet) control, BL-to-AP; (\blacktriangle) + WK-X-34, AP-to-BL; (\triangle) + WK-X-34, BL-to-AP; (\blacksquare) + LY335979, AP-to-BL; (\square) + LY335979, BL-to-AP.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 6)

Table 8 Apparent permeability coefficient, efflux ratio, and absorptive quotient values for the absorptive and secretory transport of model compounds across Caco-2 cell monolayers.

Compound	P_{AB} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		AQ_{efflux}		AQ_{BCRP}		$AQ_{\text{P-gp}}$		P_{BA} ($\times 10^{-6}$ cm/s)		ER
	Control	+WK-X-34	+LY335979	+LY335979	+LY335979	+LY335979	Control	+WK-X-34	+LY335979	+LY335979	
1. Caffeine	33.2 \pm 4.66	32.4 \pm 0.90	28.2 \pm 0.43	0.00	0.13	0.00	36.4 \pm 3.98	42.6 \pm 1.80	41.3 \pm 0.31	1.10	
2. Mannitol	0.46 \pm 0.09	0.61 \pm 0.18	0.49 \pm 0.13	0.24	0.20	0.04	0.41 \pm 0.10	0.44 \pm 0.11	0.46 \pm 0.17	0.89	
3. Daidzein	20.1 \pm 1.43	29.6 \pm 3.30	18.9 \pm 1.30	0.36	0.36	0.00	25.1 \pm 1.26	36.2 \pm 1.90	26.2 \pm 0.45	1.55	
4. E3S	9.88 \pm 0.38	11.3 \pm 2.86	8.97 \pm 0.34	0.21	0.21	0.00	20.3 \pm 3.09	7.31 \pm 1.94*	17.8 \pm 0.03	2.06	
5. Ciprofloxacin	2.80 \pm 0.58	3.31 \pm 0.52	3.22 \pm 0.40	0.15	0.03	0.13	6.57 \pm 1.39	4.44 \pm 0.35*	5.80 \pm 0.41	2.35	
6. Nitrofurantoin	1.81 \pm 0.18	3.36 \pm 0.00**	2.11 \pm 0.68	0.46	0.37	0.09	13.8 \pm 1.01	10.6 \pm 1.95	14.2 \pm 0.25	7.60	
7. Topotecan	0.81 \pm 0.06	3.23 \pm 0.56**	1.25 \pm 0.04	0.75	0.61	0.14	10.3 \pm 1.53	3.41 \pm 0.52**	8.33 \pm 0.83	12.7	
8. SN-38	1.31 \pm 0.50	4.96 \pm 0.31*	1.29 \pm 0.06	0.74	0.74	0.00	8.83 \pm 3.80	4.43 \pm 0.16	5.90 \pm 0.29	6.73	
9. Sulfasalazine	0.19 \pm 0.04	0.61 \pm 0.13**	0.25 \pm 0.01	0.70	0.59	0.10	13.3 \pm 0.95	6.45 \pm 1.34**	15.4 \pm 6.47	71.6	

Results are expressed as the mean \pm SD of three to six experiments.

*p < 0.05; **p < 0.01, compared with the corresponding control group.

(*Drug Metab. Dispos.* **48**, 491–498 (2020): Table 1)

2-4 考察

本章では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、創薬の探索段階において膜透過性スクリーニングに汎用されている 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 の寄与の評価を行った。

受動拡散によって膜を透過する daidzein は高い膜透過性を示し ($P_{AB}=20.1 \times 10^{-6}$ cm/s)、WK-X-34 共存下において膜透過性はわずかに上昇した ($P_{AB+WK-X-34}=29.6 \times 10^{-6}$ cm/s) (Fig. 10A、Table 8)。Kobayashi らは daidzein の Caco-2 単層膜透過性が BCRP 基質である E3S 存在下において 1.7 倍上昇すると報告しており、今回の結果と一致した⁸⁸。このことから daidzein の Caco-2 単層膜透過性における BCRP の寄与は小さいと考えられ、daidzein の比較的低い AQ_{BCRP} 及び ER (0.36 及び 1.55) も我々の結果を支持している。これに対し、Enokizono らは daidzein を Bcrp KO マウスに経口投与した際の AUC が WT マウスの 3.7 倍に上昇したことから⁸⁹、daidzein の消化管吸収に BCRP が関与するとの報告をしている。同様の結果も報告されている^{90,91}。しかし、daidzein は非常に高い膜透過性を示したことから、消化管上皮に発現している BCRP は飽和していると考えられること、また静脈内投与した際にも Bcrp KO マウスにおいて血漿中濃度が上昇したことから、消化管吸収よりもむしろ消失過程において BCRP が関与していると考えられる。

E3S、ciprofloxacin についても ER が 2 以上と排出トランスポーターの影響が示唆された (Fig. 10B、Fig. 11B、Table 8)。E3S の AQ_{BCRP} は 0.21 であり、Caco-2 膜透過に小さいながらも BCRP の関与が認められた。Gram らは Caco-2 膜透過における E3S の P_{AB} が BCRP 阻害薬である fumitremorgin C によって 1.4 倍上昇することを報告しており⁹²、我々の結果と一致する。E3S の Caco-2 細胞内への取り込みには AP 側に発現している organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 が関与しており⁹³、OATP2B1 によって取り込まれた E3S が BCRP によって細胞外へと汲み出されることが報告されている⁹⁴。今回の検討においても、E3S の吸収方向の透過性が比較的良好 ($P_{AB}=9.88 \times 10^{-6}$ cm/s) であり、また WK-X-34 によって BCRP を阻害した際の透過性は AB 方向優位であった ($P_{AB+WK-X-34}=11.3 \times 10^{-6}$ cm/s、 $P_{BA+WK-X-34}=7.31 \times 10^{-6}$ cm/s) ことから、本研究において用いた Caco-2 細胞においても OATP2B1 と BCRP が協奏的に機能していると考えられる。Ciprofloxacin の AQ_{BCRP} は 0.03 であり、Caco-2 膜透過において BCRP はほとんど寄与しないと考えられる。Merino らは、選択的 BCRP 阻害薬である Ko143 共存下において、BCRP 発現 MDCK II 細胞における ciprofloxacin の吸収方向の透過性に影響がみられなかったと報告している⁹⁵。しかしながら、彼らは ciprofloxacin の排出方向の透過性は Ko143 によって低下することを示している。我々の検討においても ciprofloxacin の排出方向の透過性は、WK-X-34 共存下のほうが、LY335979 共存下よりも低い結果を得ており ($P_{BA+WK-X-34}=4.44 \times 10^{-6}$ cm/s、 $P_{BA+LY335979}=5.80 \times 10^{-6}$ cm/s)、Merino らの報告と一致している。また、Haslam は、継代数の多い (115-120 passages) Caco-2 細胞では ciprofloxacin の排出方向への透過性が Ko143 によって低下するが、継代数の少ない (34-40 passages) Caco-2 細胞では Ko143 の影響を受けないことを示している⁹⁶。さらに、

ciprofloxacin は OATP1A2 などの取り込みトランスポーター基質となることが報告されている⁹⁷⁻⁹⁹。また、ヒトにおける消化管吸収率は 70-100% と良好である¹⁰⁰。さらに、ciprofloxacin を WT マウスに経口及び静脈内投与した時の血漿中濃度は、Bcrp KO マウス に比べて 2 倍及び 1.5 倍高かった。このことから、ciprofloxacin の BCRP の関与は消化管吸収に比べて消失過程の方が大きいと考えられる。

Nitrofurantoin の P_{AB} は 1.81×10^{-6} cm/s であり、 ER が 7.6 と排出トランスポーターの関与が強く示唆された (Fig. 11A, Table 8)。しかし、 AQ_{BCRP} は 0.37 と比較的小さかった。さらに、WK-X-34 によって P-gp 及び BCRP を阻害した際においても nitrofurantoin の ER は 3 以上を示した。それに対して、nitrofurantoin の Caco-2 膜透過において、Ko143 によって排出方向の透過を 92% 阻害することが報告されており¹⁰¹、BCRP 発現 MDCK II 細胞においても同様の結果が認められている¹⁰²。したがって、WK-X-34 によって、nitrofurantoin の膜透過性を完全に改善できなかった可能性もあることから、本検討の結果だけでは BCRP が nitrofurantoin の Caco-2 膜透過の障壁となるか否かについては不明である。

一方、topotecan、SN-38、sulfasalazine の吸収方向の透過性は、他の化合物よりも低く ($P_{AB}=0.81, 1.31, 0.19 \times 10^{-6}$ cm/s) (Fig. 9A, Fig. 11B, Fig. 11C, Table 8)、 AQ_{BCRP} 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ことが示された。Matsuda らは Ko143 を前投与したラットにおいて topotecan 及び sulfasalazine の吸収率が 4 倍程度増大することを示した¹²。さらに、Dahan らは、BCRP 阻害薬である fumitremorgin C や pantoprazole によって、sulfasalazine の吸収方向の透過を顕著に上昇することを示しており¹⁰³、我々の検討結果と一致する。また、彼らは BCRP 阻害薬が Caco-2 細胞において sulfasalazine の排出方向の透過を減少させることも報告している。我々の sulfasalazine の排出方向の透過性において、WK-X-34 共存下の方が、LY335979 共存下よりも顕著に低く ($P_{BA,WK-X-34} = 6.45 \times 10^{-6}$ cm/s、 $P_{BA,LY335979} = 15.4 \times 10^{-6}$ cm/s)、Dahan らの検討結果と一致する。Sulfasalazine に関して、Caco-2 細胞における OATP2B1 の発現と、sulfasalazine が OATP2B1 の基質となることが報告されている^{9,93}。したがって、sulfasalazine は Caco-2 細胞の AP 側から OATP2B1 によって取り込まれるが、脂溶性が低いいため膜透過性は低くなる。また、Caco-2 単層膜の BL 側に sulfasalazine を添加後の細胞内取り込み量は、AP 側添加後に比べて顕著に高かった (14.0 nmol/mg protein 及び 6.62 nmol/mg protein)。このことから、sulfasalazine の BL 側からの取り込みにトランスポーターが関与する可能性が示唆された。

この結果に対して、topotecan、SN-38、sulfasalazine の AQ_{P-gp} は 0.1 以下と小さかったことから、Caco-2 単層膜を介した吸収方向の透過に P-gp はほとんど寄与しないことが示唆された。しかしながら、透過性試験を Ko143 のような BCRP 選択的阻害薬を用いて行った際に AQ_{P-gp} は以下の式で表される。

$$AQ_{P-gp} = \frac{P_{P-gp}}{P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{P-gp}}$$

すなわち、 AQ_{P-gp} は以下の式において求められるが、 P_{BCRP} が分母にあるため、 AQ_{P-gp} を過小評価する可能性がある (2-2-6 項参照)。

$$AQ_{P-gp} = \frac{P_{AB,LY335979} - P_{AB}}{P_{AB,WK-X-34}} = \frac{(P_{AP,eff} + P_{BL,eff}) \cdot P_{P-gp}}{(P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{P-gp} + P_{BCRP}) \cdot (P_{AP,eff} + P_{BL,eff} + P_{BCRP})}$$

しかしながら、本研究において用いた薬物はいずれも BCRP 特異的な基質であり AQ_{P-gp} を小さく見積もる可能性は低いと考えられるが、P-gp と BCRP の両方の基質となる化合物の AQ_{P-gp} を見積もる際には過小評価の可能性を考慮する必要がある。

これまでに、数種の BCRP 特異的阻害薬が開発されており、*in vitro* 小腸上皮細胞を用いた BCRP に関する検討が行われている。とりわけ、Ko143 は広く使われており、Caco-2 膜透過における BCRP の寄与の評価についても有用性が高い。しかし、我々が開発した方法も、BCRP 選択的阻害薬と同様に、*in vitro* 膜透過性における BCRP の寄与を評価可能であると考えられる。したがって、 AQ を用いた *in vitro* のアプローチは、消化管吸収における BCRP と P-gp の寄与の評価に有用と考えられる。

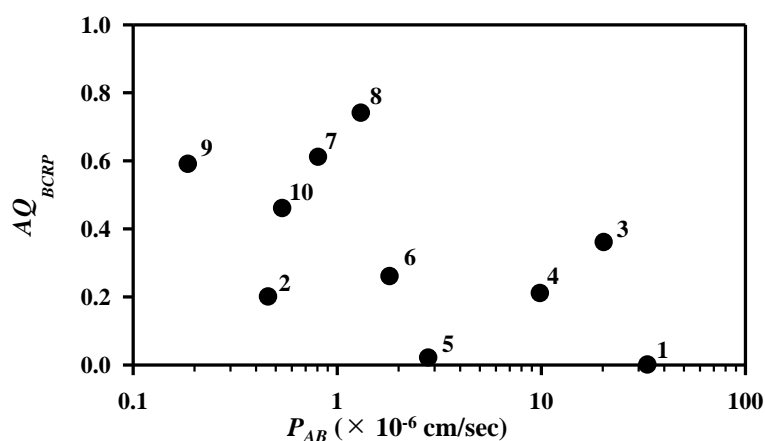


Fig. 12 The relationship between P_{AB} and AQ_{BCRP} of selected compounds.

Key: 1, caffeine; 2, mannitol; 3, daidzein; 4, estrone-3-sulfate; 5, ciprofloxacin; 6, nitrofurantoin; 7, topotecan; 8, SN-38; 9, sulfasalazine; 10, mitoxantrone.

(*Drug. Metab. Dispos.* **48**, 491-498 (2020): Fig. 7)

以上の結果から、 P_{AB} と AQ_{BCRP} との関係性をプロットした (Fig. 12)。BCRP 基質として報告されている化合物が様々な P_{AB} 及び AQ_{BCRP} を示すことが明らかとなった。特に P_{AB} が約 $1.0 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ より小さい値を示す場合に膜透過において BCRP の寄与を大きく受ける可能性が示された。また、 P_{AB} が比較的高値を示した E3S や ciprofloxacin においては、OATP などの取り込みトランスポーターと BCRP が協奏的に機能していることが推察された。発現系を用いた解析においては 2 種以上のトラン

スポーターの基質となる場合に、その寄与の程度を誤って評価し得るが、様々なトランスポーターを発現する Caco-2 細胞を用いることで、このような場合においても精度よく膜透過性におけるトランスポーターの寄与を評価可能であると考えられる。

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

3-1 緒言

第 2 章において、Caco-2 細胞における BCRP 基質の膜透過性を検討し、これら基質の膜透過における BCRP の寄与について AQ_{BCRP} を用いることにより評価できることを明らかにした。近年見出される医薬品候補化合物は、分子量が大きく、脂溶性が高いなど排出トランスポーターの基質となりやすい物性を有している。したがって、 AQ_{BCRP} を用いた本評価系が *in vivo* 消化管吸収の予測において有用であることが証明されれば、医薬品開発における吸収性を評価するツールの一つとして有益な情報を提示できると考えられる。そのためには、 AQ_{BCRP} が *in vivo* 消化管吸収における BCRP の寄与を反映したものであるか否かを精査する必要がある。

2002 年、Jonker らにより *Bcrp* KO マウスが作製され¹⁰⁴、多くの薬物の経口吸収性が *Bcrp* KO マウスを用いることにより評価されてきた^{102,105,106}。しかし、これらの多くは WT 及び *Bcrp* KO マウス間において経口投与後の全身血漿中濃度を比較、議論しており、*BA* の上昇が消化管吸収性の増大によるものであるのか、またはクリアランスの低下によるみかけの消化管吸収率の増大によるものであるのか明確ではない。特に、マウスにおいては消失に関わる肝や腎に *Bcrp* が高発現しており、薬物の消失過程における *Bcrp* の影響についても数多く報告されていることから^{102,105-107}、上述の評価方法では消化管における *Bcrp* の影響を過大評価している可能性も考えられる。

そこで、本章においては、Caco-2 細胞により得られた *in vitro* AQ_{BCRP} による 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 マウスに P-S difference 法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。

3-2 方法

3-2-1 実験材料

Caffeine はナカライテスクより、ciprofloxacin は LKT Laboratories, Inc. より、nitrofurantoin は MP Biomedicals, Inc. より、topotecan HCl は Alexis Corporation よりそれぞれ購入した。Sulfasalazine は Sigma 社より、Transwell® は Corning よりそれぞれ購入した。その他の試薬については市販の特級品を用いた。

3-2-2 動物

WT, Mdr1a/1b KO マウス及び Bcrp KO マウス (10-18 週齢, 23-35 g) は Taconic Farms (Germantown, NY) から購入し、清水実験材料に飼育・繁殖を委託した。マウスは、温度及び湿度が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。食餌と水は自由摂取とした。すべての動物実験は、京都薬科大学の動物倫理委員会によって承認された上で実施した。

3-2-3 投与液の調製

静脈内投与実験において、ciprofloxacin 及び topotecan の投与液は 0.2 mg/mL、nitrofurantoin 及び sulfasalazine の投与液は 0.1 mg/mL となるように 1% DMSO、10% polyethylene glycol 400 (PEG 400) を含む生理食塩水を用いて調製した。経口投与実験においては、ciprofloxacin 及び topotecan の投与液は 0.2 mg/mL、nitrofurantoin 及び sulfasalazine の投与液は 0.5 mg/mL となるように 1% DMSO、10% Solutol HS15 を含む水を用いて調製した。

3-2-4 マウスにおける薬物動態試験

WT, Mdr1a/1b KO 及び Bcrp KO マウスを一晩絶食させ、実験に供した。静脈内投与に関して、ciprofloxacin、topotecan、nitrofurantoin、sulfasalazine のすべての化合物において 1 mg/kg の投与量で各マウスに麻酔下で尾静脈内投与した。投与後、0.083、0.17、0.5、1、2、4、8 時間に腹部大静脈より採血を行った。経口投与に関して、ciprofloxacin 及び topotecan については 1 mg/kg、nitrofurantoin については 2 mg/kg、sulfasalazine については 5 mg/kg の投与量で各マウスに経口投与した。投与後、0.083、0.17、0.5、1、2、4、8 時間に門脈及び腹部大静脈より同時採血を行った。得られた血液試料は 4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離後、血漿試料を採取した。血漿試料は分析時まで -30 °C で保存した。

3-2-5 全血-血漿間分配率の測定

全血と血漿間での各化合物の分配率 (R_b) を以下の方法により求めた。37 °C、3 分間プレインキュベーションした血液に各化合物の標準溶液を添加し、1 µg/mL の血液試料とした。続いて 37 °C、15 分間インキュベーションした後、4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿試料 (C_p) を得た。また、

血漿を用いて同様の処理を行い、対照試料 (C_B) を得た。 R_b は C_B を C_p で除して算出した。

3-2-6 薬物濃度測定

Ciprofloxacin と nitrofurantoin の血漿試料は、それぞれジクロロメタン、酢酸エチルにより抽出を行った。有機層を 60 °C で蒸発乾固後、移動相で再溶解し、測定試料とした。Topotecan と sulfasalazine に関しては、血漿試料にアセトニトリルを加えて 4 °C、750 g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を回収し、60 °C で蒸発乾固後、移動相にて再溶解した。Topotecan では、0.85 % リン酸を加えてすべて lactone 体とし測定試料とした。測定条件は第 2 章記載の方法に準じて行った。

3-2-7 データ解析

消失速度定数 (k_e) は時間に対して片対数表示した血漿中濃度の消失相を直線回帰したときの勾配より求めた。消失半減期 ($t_{1/2}$) は次式により求めた。

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e$$

AUC 及び $AUMC$ は最終測定時間までの値を用い、対数台形公式により算出した。 AUC_{∞} 及び $AUMC_{\infty}$ は AUC_t 及び $AUMC_t$ に最終採血時間から無限時間までの AUC の外挿値 (最終測定時間の血漿中濃度 / k_e) 及び $AUMC$ の外挿値 (最終測定時間の血漿中濃度 / $(k_e)^2$ + 最終測定時間の血漿中濃度 × 最終測定時間 / k_e) を加えて算出した。 CL_{tot} 、 V_{dss} は次式を用いて計算した。

$$CL_{tot} = Dose / AUC$$

$$V_{dss} = AUMC_{iv} / AUC_{iv} \times CL_{tot}$$

経口投与後の吸収速度定数 ka は 非線形最小二乗法プログラム MULTI¹⁰⁸ を用いて算出した。また、みかけの消化管吸収率 $Fa \cdot Fg$ は P-S difference 法に則り、以下の式により算出した。

$$Fa \cdot Fg = Q_{pv} \times R_b \times (AUC_{pv} - AUC_{sys}) / Dose$$

ここで、 Q_{pv} は門脈血流量、 AUC_{pv} 及び AUC_{sys} はそれぞれ門脈血及び全身血の血漿中濃度-時間曲線下面積を表す。なお、本研究において Q_{pv} は文献値の平均値より 106.6 mL/min/kg^{57,109} を用いた。

また、経口投与後の BA は次式により算出した。

$$BA = AUC_{oral} / AUC_{iv} \times Dose_{iv} / Dose_{oral} \times 100$$

肝代謝回避率 Fh はみかけの消化管吸収率 $Fa \cdot Fg$ より算出した。

$$Fh = F / (Fa \cdot Fg)$$

次に、消化管吸収における BCRP 及び P-gp の寄与を表すパラメータとして *in vitro* において算出した AQ の概念をもとに以下に示す式により、*in vivo* における AQ を算出した (Fig. 13)。分母は BCRP 及び P-gp が関与しないときの吸収速度定数を、分子は BCRP または P-gp によって低下した吸収速度定数を表す。

$$AQ_{Bcrp} = \frac{k_{a, Bcrp} - k_{a, WT}}{k_{a, WT} + (k_{a, Bcrp} - k_{a, WT}) + (k_{a, P-gp} - k_{a, WT})}$$

$$AQ_{P-gp} = \frac{k_{a, P-gp} - k_{a, WT}}{k_{a, WT} + (k_{a, Bcrp} - k_{a, WT}) + (k_{a, P-gp} - k_{a, WT})}$$

同様に、消化管吸収における BCRP 及び P-gp の寄与率を表すパラメータとして、contribution ratio (R_{Bcrp} 、 R_{P-gp}) を考案し、算出方法を以下に示す。

$$R_{Bcrp} = \frac{FaF_{gBcrp} - FaF_{gWT}}{FaF_{gWT} + (FaF_{gBcrp} - FaF_{gWT}) + (FaF_{gP-gp} - FaF_{gWT})}$$

$$R_{P-gp} = \frac{FaF_{gP-gp} - FaF_{gWT}}{FaF_{gWT} + (FaF_{gBcrp} - FaF_{gWT}) + (FaF_{gP-gp} - FaF_{gWT})}$$

分母は BCRP 及び P-gp が関与しないときの消化管吸収率を、分子は BCRP または P-gp によって低下した消化管吸収率を表す。

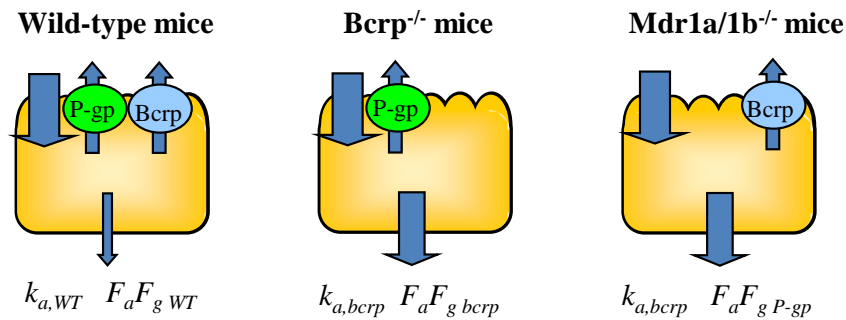


Fig. 13 Schematic representation of *in vivo* measures of Bcrp or P-gp modulated drug absorption used in this study.

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Fig. 2)

3-3 結果

3-3-1 マウスにおける各モデル化合物の消化管吸収特性と BCRP の寄与の評価

本節では、WT、Bcrp KO、Mdr1a/1b KO マウスに P-S difference 法を適用し、モデル化合物の BCRP、P-gp の寄与を評価した。モデル化合物は前章で用いた 9 種の中より、ciprofloxacin、nitrofurantoin、topotecan、sulfasalazine を選択した。

In vivo における薬物の吸収性を評価するにあたり、本研究において使用した WT、Bcrp KO、Mdr1a/1b KO マウスの消化管各部位、肝、腎における排出トランスポーターと代謝・抱合酵素の mRNA 発現量について比較検討した。その結果、各マウス間において、消化管における Mrp2 mRNA 発現量や消化管及び肝臓における Cyp3a11、Slut1a1、Ugt1a1 の発現量に顕著な差は認められなかった (Fig. 14, Fig. 15)。また、モデル化合物の全血-血漿間分配率 (R_b) を測定した。すべてのモデル化合物において R_b はほぼ 1 であったことから、血球及び血漿への分配は同程度であることが確認された (ciprofloxacin 1.20 ± 0.10 , nitrofurantoin 1.18 ± 0.10 , topotecan 0.94 ± 0.05 , sulfasalazine 1.28 ± 0.03)。Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスにおける R_b は WT マウスと同程度であった。

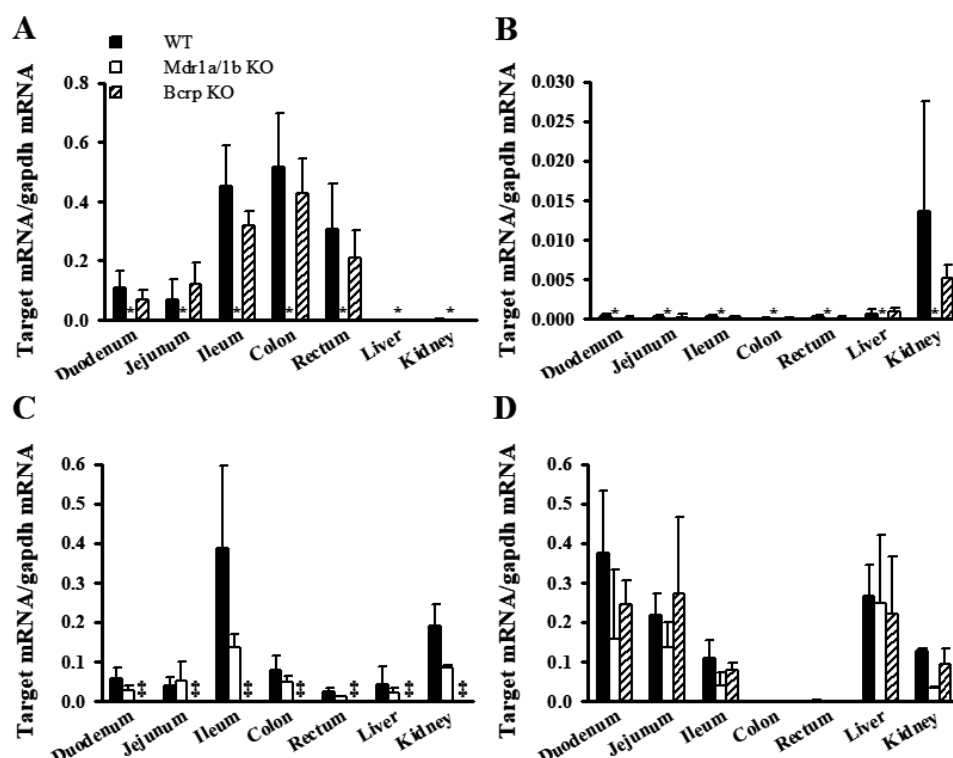


Fig. 14 Regional mRNA levels of efflux transporters.

The mRNA expression of Mdr1a (A), Mdr1b (B), Bcrp (C) and Mrp2 (D) was compared among the five intestinal regions, liver and kidney in WT, Mdr1a/1b KO and Bcrp KO mice. Gapdh was selected as an endogenous RNA control to normalize the difference in amount of total RNA. Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3-7). Mdr1a and Mdr1b mRNA were not detected in Mdr1a/1b KO mice. Bcrp mRNA was not detected in Bcrp^{-/-} mice.

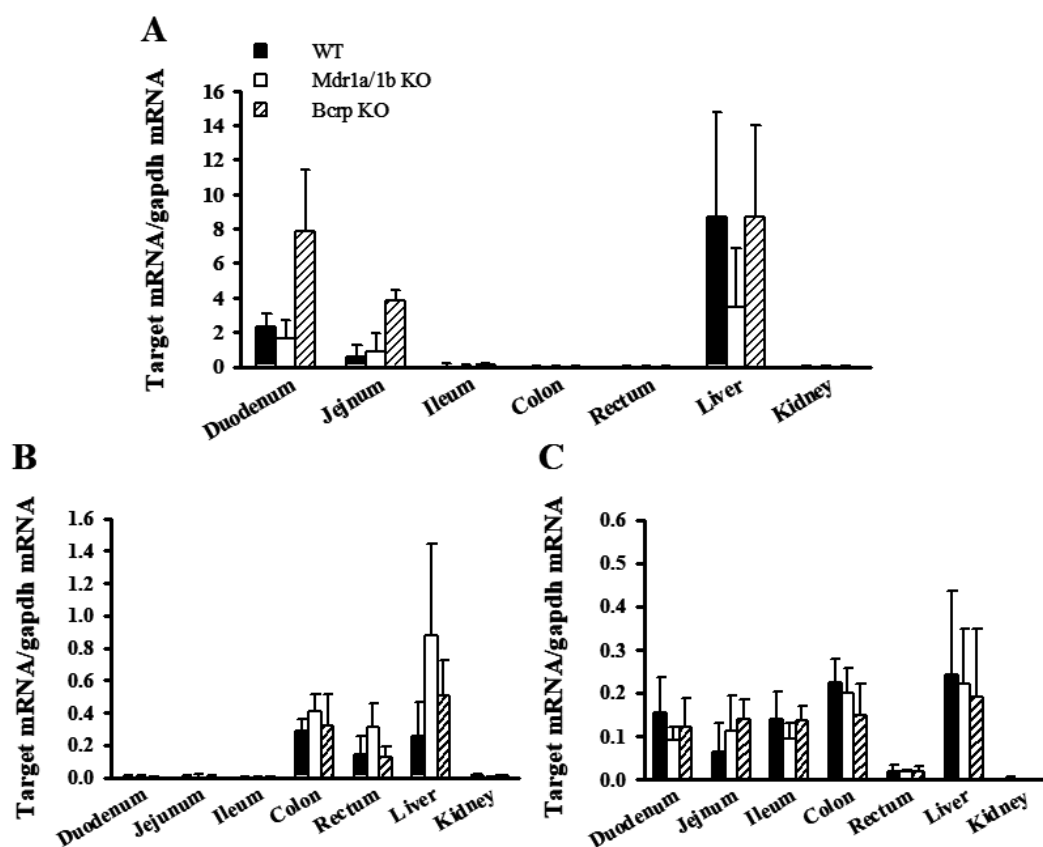


Fig. 15 Regional mRNA levels of metabolic and conjugating enzymes.

The mRNA expression of Cyp3a11 (A), Sult1a1 (B) and Ugt1a1 (C) was compared among the five intestinal regions, liver and kidney in WT, Mdr1a/1b KO and Bcrp KO mice. Gapdh was selected as an endogenous RNA control to normalize the difference in amount of total RNA. Each bar represents the means \pm S.D. (n=3-7).

Ciprofloxacin

Ciprofloxacin を WT、Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスに 静脈内投与及び経口投与したときの血漿中濃度推移を Fig. 16 に、薬物動態学的パラメータを Table 9 に示した。Ciprofloxacin 経口投与後の門脈血漿中濃度は WT、Bcrp KO、Mdr1a/1b KO のいずれのマウスにおいても 10 分で最も高かったことから、経口投与後速やかに消化管上部から吸収されることが推察された。Bcrp KO マウスに ciprofloxacin 経口投与後の AUC_{pv} 、 AUC_{sys} はともに WT マウスと同程度であり、これより算出した Bcrp KO マウスにおける $Fa \cdot Fg$ は 50.6% と WT マウスにおける $Fa \cdot Fg$ の 46.5% とほとんど同じであった。また、 ka についても Bcrp KO マウスと WT マウスの間にほとんど差が認められず (1.85 及び 1.6 h^{-1})、ciprofloxacin の消化管吸収において Bcrp はほとんど影響しないことが明らかとなった。

これに対し、Bcrp KO マウスに ciprofloxacin を静脈内投与した際の AUC_{sys} は約 1.5 倍に上昇し (1200 vs. $886 \text{ nM}\cdot\text{h}$)、 CL_{tot} の低下 (2.51 vs. 3.41 L/h/kg) が認められたことから ciprofloxacin の消失過程における Bcrp の関与が示唆された。

一方、Mdr1a/1b KO マウスに経口投与後の $Fa \cdot Fg$ は 75.0%、 ka は 2.18 h^{-1} と WT マウスに比して顕著に増大し、また静脈内投与後の AUC_{sys} の上昇及び CL_{tot} の低下が認められたことから、消化管吸収及び消失の両過程において P-gp の関与が示唆された。

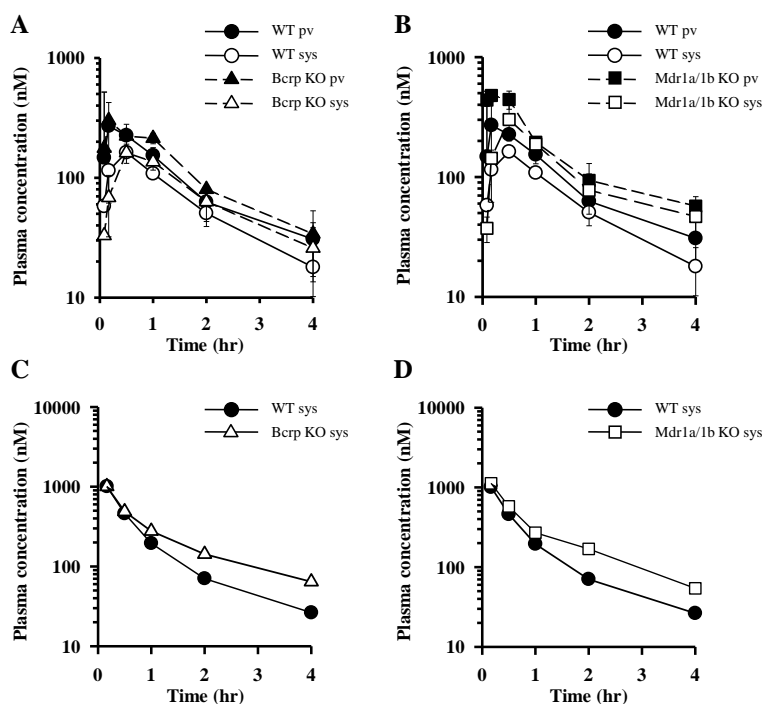


Fig. 16 The plasma concentration versus time profiles of ciprofloxacin in WT, Bcrp KO and Mdr1a/1b KO mice after oral administration (1mg/kg; A, B) and intravenous administration (1mg/kg; C, D).

Each point is expressed as means \pm S.D. (po: $n=3$) or means (iv; $n=2$).

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Fig. 3)

Table 9 Pharmacokinetic parameters of ciprofloxacin after oral and intravenous administration to WT, Bcrp KO and Mdr1a/1b KO mice.

	wild-type			Bcrp (-/-)			Mdr1a/1b (-/-)		
	iv	po		iv	po		iv	po	
		pv	sys		pv	sys		pv	sys
Dose (mg/kg)	1.0	1.0		1.0	1.0		1.0	1.0	
C_{max} (nM)	---	270	162	---	302	161	---	479	301
T_{max} (h)	---	0.17	0.50	---	0.17	0.50	---	0.17	0.50
$t_{1/2}$ (h)	1.41	---	1.34	1.75	---	1.56	1.49	---	2.74
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (nM · h)	886	489	306	1200	564	365	1290	896	601
CL_{tot} (L/h/kg)	3.41	---		2.51	---		2.33	---	
Vd_{ss} (L/kg)	3.55	---		4.36	---		3.70	---	
k_a (h^{-1})		1.6			1.85			2.18	
$F_a \cdot F_g$ (%)		46.5			50.6			75.0	
F_h (%)		74.3			59.9			61.9	
BA (%)		34.5			30.3			46.4	

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020); Table 1)

Nitrofurantoin

Nitrofurantoin を WT、Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスに静脈内または経口投与したときの血漿中濃度推移を Fig. 17 に、薬物動態学的パラメータを Table 10 に示した。Nitrofurantoin の WT マウスにおける $F_a \cdot F_g$ 、 k_a はそれぞれ 63.7%、 $5.8 h^{-1}$ となり、WT マウスにおける消化管吸収性も比較的良好であることが示された。Nitrofurantoin 経口投与後の AUC_{pv} 、 AUC_{sys} は Bcrp KO においてはそれぞれ 3410、2560 nM·h、Mdr1a/1b KO マウスにおいては 3180、2350 nM·h と WT の 2550、1840 nM·h に比較して約 1.5 倍に上昇し、Bcrp KO マウスにおける $F_a \cdot F_g$ 及び Mdr1a/1b KO マウスにおける $F_a \cdot F_g$ はそれぞれ 77.1、75.2%、また Bcrp KO マウス及び Mdr1a/1b KO マウスにおける k_a に関してもそれぞれ 6.89 、 $7.20 h^{-1}$ と WT マウスに比較して上昇した。したがって、nitrofurantoin の消化管吸収において Bcrp と P-gp の両方が関与していることが示唆された。

一方、これらマウス間において nitrofurantoin を静脈内投与した際の AUC_{sys} 及び CL_{tot} にほとんど差異が認められなかったことから、消失過程におけるこれらトランスポーターの関与はないものと考えられる。

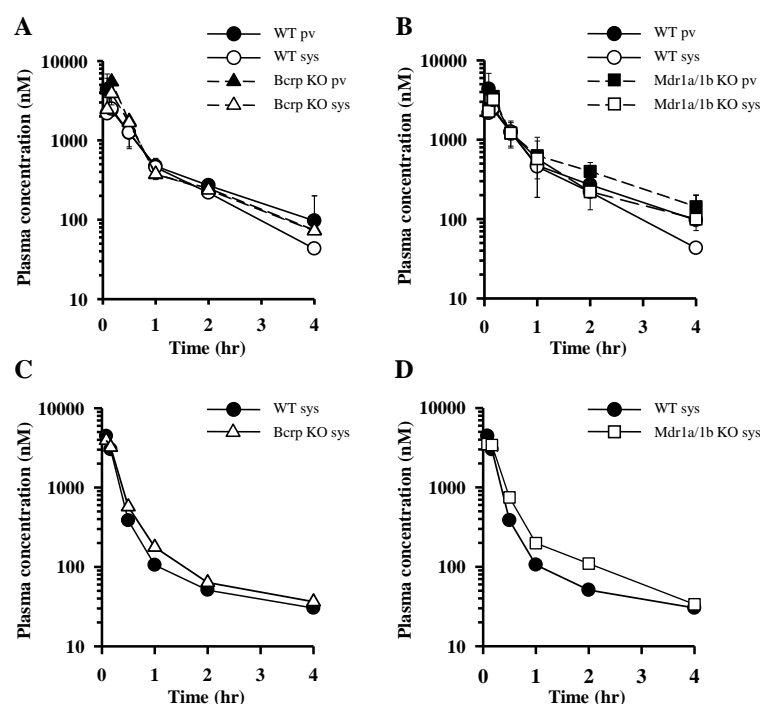


Fig. 17 The plasma concentration versus time profiles of nitrofurantoin in WT, Bcrp KO and Mdr1a/1b KO mice after oral administration (2mg/kg; A, B) and intravenous administration (1mg/kg; C, D). Each point is expressed as means \pm S.D. (po: n=3) or means (iv; n=2). (*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Fig. 4)

Table 10 Pharmacokinetic parameters of nitrofurantoin after oral and intravenous administration to wild-type, Bcrp (-/-) and Mdr1a/1b (-/-) mice.

	wild-type			Bcrp (-/-)			Mdr1a/1b (-/-)		
	iv	po		iv	po		iv	po	
		pv	sys		pv	sys		pv	sys
Dose (mg/kg)	1.0	1.0		1.0	1.0		1.0	1.0	
C_{max} (nM)	---	3000	2490	---	5480	3910	---	3910	3210
T_{max} (h)	---	0.17	0.17	---	0.17	0.17	---	0.17	0.17
$t_{1/2}$ (h)	2.87	---	0.93	1.41	---	1.25	1.17	---	1.22
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (nM · h)	1840	2550	1840	1840	3410	2560	1950	3180	2350
CL_{tot} (L/h/kg)	2.28	---		2.28	---		2.15	---	
Vd_{ss} (L/kg)	1.94	---		1.45	---		1.36	---	
k_a (h ⁻¹)		5.8			6.89			7.20	
$F_a F_g$ (%)		63.7			77.1			75.2	
F_h (%)		78.3			90.0			79.9	
BA (%)		49.9			69.4			60.00	

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Table 2)

Topotecan

Topotecan を WT、Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスに静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度推移を Fig. 18 に、薬物動態学的パラメータを Table 11 に示した。Topotecan を WT マウスに経口投与した際の門脈血漿中濃度推移及び ka が 2.33 h^{-1} と比較的高い値が得られたことより、WT マウスにおいても topotecan は投与後速やかに消化管上部より吸収されることが推察された。また、WT マウスにおける BA は 37.3 % と、ヒトの 40 %^{110, 111} とほぼ一致した結果が得られた。Bcrp KO マウスに topotecan 経口投与後の AUC_{pv} 、 AUC_{sys} は WT マウスに比較してともに約 3 倍へと顕著に上昇した (1510 vs. 577, 1140 vs. 370 $\text{nM}\cdot\text{h}$)。これより算出された WT マウスにおける $Fa \cdot Fg$ は 56.8% であつたのに対して Bcrp KO マウスにおける $Fa \cdot Fg$ は 103% と著しく増大し、また、Bcrp KO マウスにおける ka も 5.18 h^{-1} であつたことから、Bcrp が topotecan の消化管吸収性を大きく支配していることが示された。

また、静脈内投与した際に Bcrp KO マウスにおける AUC_{sys} の上昇と CL_{tot} の低下がわずかに認められたことから、topotecan の消失においても Bcrp の関与が唆された。一方、Mdr1a/1b KO マウスにおいては経口及び静脈内投与のいずれの場合においても体内動態に変化が認められなかったことから、topotecan の消化管吸収及び排泄における P-gp の影響はないものと考えられる。

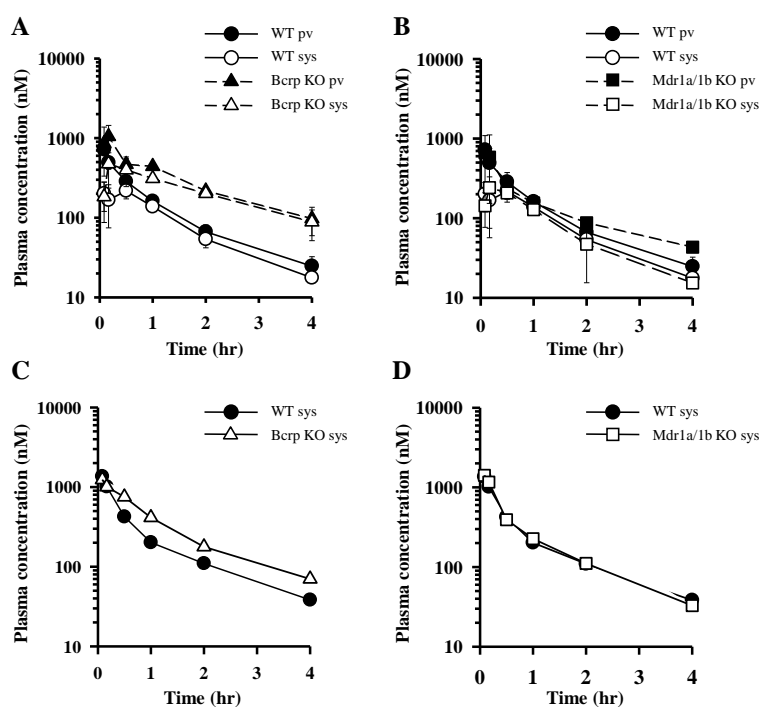


Fig. 18 The plasma concentration versus time profiles of topotecan in WT, Bcrp KO and Mdr1a/1b KO mice after oral administration (1mg/kg; A, B) and intravenous administration (1mg/kg; C, D). Each point is expressed as means \pm S.D. (po: n=3) or means (iv: n=2).

(*Pharmacol. Res. Perspect.* 8, e00544 (2020): Fig. 5)

Table 11 Pharmacokinetic parameters of topotecan after oral and intravenous administration to wild-type, Bcrp (-/-) and Mdr1a/1b (-/-) mice.

	wild-type			Bcrp (-/-)			Mdr1a/1b (-/-)		
	iv	po		iv	po		iv	po	
		pv	sys		pv	sys		pv	sys
Dose (mg/kg)	1.0	1.0		1.0	1.0		1.0	1.0	
C_{max} (nM)	---	720	218	---	855	476	---	664	242
T_{max} (h)	---	0.08	0.50	---	0.08	0.17	---	0.08	0.17
$t_{1/2}$ (h)	1.26	---	1.04	1.49	---	1.47	1.08	---	1.23
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (nM · h)	994	577	370	1490	1510	1140	1020	589	358
CL_{tot} (L/h/kg)	2.20	---		1.47	---		2.13	---	
Vd_{ss} (L/kg)	2.59	---		2.21	---		2.19	---	
k_a (h ⁻¹)		2.33			5.18			3.68	
$F_a F_g$ (%)		56.8			103			63.8	
F_h (%)		65.6			74.0			54.8	
BA (%)		37.3			76.3			34.9	

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Table 3)

Sulfasalazine

Sulfasalazine を WT、Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスに静脈内または経口投与したときの血漿中濃度推移を Fig. 19 に、薬物動態学的パラメータを Table 12 に示した。WT マウスにおける sulfasalazine の $F_a \cdot F_g$ 及び BA は 16.9、10.2 % とヒトにおける報告 (12 % 及び < 15 %) ¹¹²⁻¹¹⁴ とほぼ一致し sulfasalazine は極めて消化管吸収性が悪い化合物であることが確認された。Bcrp KO マウスに sulfasalazine 経口投与後の $t_{1/2}$ は 7.1 h と WT マウスの 1.0 h に比較して著しく延長した。さらに、Bcrp KO マウスにおける AUC_{pv} 、 AUC_{sys} は WT マウスの 130 倍以上と顕著に上昇し (290000 vs. 2200、288000 vs. 1940 nM·h)、これより得られた $F_a \cdot F_g$ は約 100 % となったことから、sulfasalazine の低い消化管吸収性に Bcrp が大きく関与していることが明らかとなった。

しかし、Bcrp KO マウスにおける T_{max} は 2.0h と WT マウスにおける 0.5h に比較して著しく遅延した。また、静脈内投与後の AUC_{sys} も WT マウスの 15 倍であり (60500 vs. 3820 nM·h)、 CL_{tot} も WT マウスにおいて 0.66 L/h/kg であったのに対して、Bcrp KO マウスにおいては 0.04 L/h/kg と著しく低下したことから、消失過程においても Bcrp の影響を強く受けていることが示された。興味深いことに、Bcrp KO マウスにおいて静脈内投与した際の C_0 が WT マウスに比較して乖離し (18.1 vs. 11.7 μ M)、分布相がほとんど認められず Vd_{ss} は 0.19 L/kg と極めて低い値を示した。Bcrp KO マウスにおいて T_{max} の遅延と Vd_{ss} の減少が認められたことから、sulfasalazine の消化管吸収率が Bcrp KO マウスにおいて顕著に増大したにも関わらず k_a が小さくなったと考えられる。

一方、Mdr1a/1b KO マウスにおける消化管吸収率は 20.6 % と WT マウスとほとんど差が認められなかったことから、消化管吸収における P-gp の寄与はほとんどないと考えられる。また、Bcrp KO マウスにおいてみられた C_0 の乖離や V_{dss} の減少は Mdr1a/1b KO マウスにおいては認められなかった。

Sulfasalazine は大腸において腸内細菌により sulfapyridine と 5-aminosalicylic acid に分解される¹¹²。Sulfapyridine は消化管においてはほぼ完全に吸収されるが、本検討において Bcrp KO マウスにおける血漿中 sulfapyridine 濃度は WT マウスや Mdr1a/1b KO マウスに比して顕著に低かった。これは、WT 及び Mdr1a/1b KO マウスにおいては sulfasalazine の吸収率が低いために sulfapyridine へ分解される割合が増加するのに対して、Bcrp KO マウスにおいては sulfasalazine としてほぼ完全に吸収されるためであると考えられる。

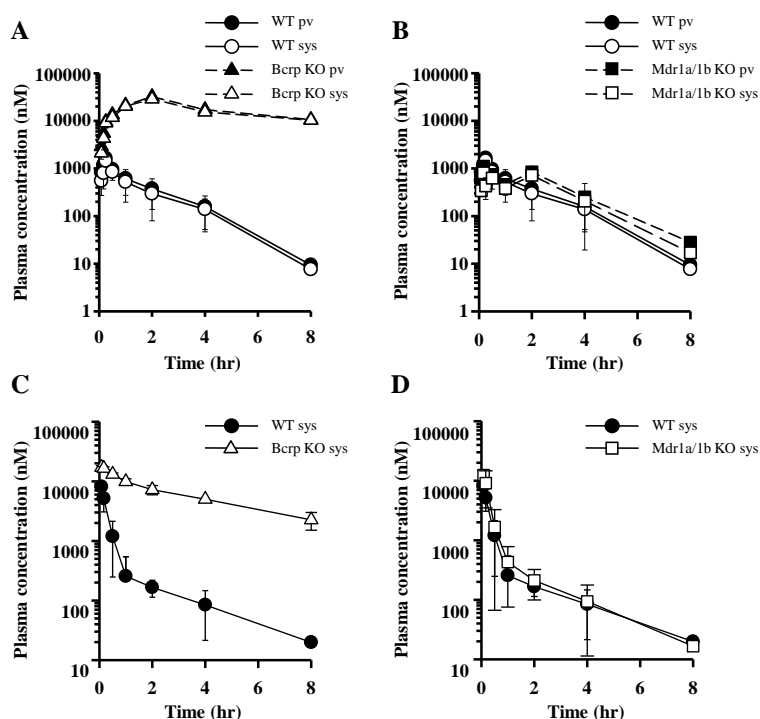


Fig. 19 The plasma concentration versus time profiles of sulfasalazine in WT, Bcrp KO and Mdr1a/1b KO mice after oral administration (5mg/kg; A, B) and intravenous administration (1mg/kg; C, D). Each point is expressed as means \pm S.D. (po; n=3) or means (iv; n=2).

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Fig. 6)

Table 12 Pharmacokinetic parameters of sulfasalazine after oral and intravenous administration to wild-type, Bcrp (-/-) and Mdr1a/1b (-/-) mice

	wild-type			Bcrp (-/-)			Mdr1a/1b (-/-)		
	iv	po		iv	po		iv	po	
		pv	sys		pv	sys		pv	sys
Dose (mg/kg)	1.0	1.0		1.0	1.0		1.0	1.0	
C_{max} (nM)	---	1180	845	---	32100	28800	---	814	629
T_{max} (h)	---	0.17	0.50	---	2.00	2.00	---	0.17	0.50
$t_{1/2}$ (h)	1.95	---	1.11	3.57	---	7.07	1.63	---	1.11
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (nM · h)	3820	2200	1940	60500	290000	288000	4280	2770	2450
CL_{tot} (L/h/kg)	0.66	---		0.04	---		0.59	---	
Vd_{ss} (L/kg)	0.59	---		0.19	---		0.45	---	
k_a (h ⁻¹)		1.40			0.49			0.93	
$F_a F_g$ (%)		16.9			130			20.6	
F_h (%)		60.1			73.2			55.6	
BA (%)		10.2			95.2			11.5	

(Pharmacol. Res. Perspect. 8, e00544 (2020): Table 4)

3-3-2 各モデル化合物の消化管吸収における Bcrp 及び P-gp の寄与

本検討により得られた各マウスにおけるモデル化合物の吸収速度定数 k_a と消化管吸収における Bcrp 及び P-gp の寄与について Table 13 にまとめた。Sulfasalazine 以外の化合物においては、Bcrp KO または Mdr1a/1b KO マウスにおける k_a が WT マウスに比較して上昇し、消化管吸収においてこれらトランスポーターが関与していることが示唆された。しかし、化合物によってこれらトランスポーターの寄与の程度は異なり、AQ は様々な値を示した。AQ は理論上 0-1 の値をとるが、topotecan の AQ_{Bcrp} が 0.35 とやや高い値を示したのに対して、他の化合物の AQ は低値を示し、消化管吸収においていずれのトランスポーターの寄与もほとんど受けないことが示唆された。Sulfasalazine に関しては、前述のように Bcrp KO マウスにおいて消化管吸収率 $F_a \cdot F_g$ が顕著に増大したにも関わらず、 k_a が減少したために AQ が算出できなかった。

そこで、各マウスにおける消化管吸収率 $F_a \cdot F_g$ を用いて、消化管吸収における Bcrp 及び P-gp の寄与率 R を算出し、Table 14 にまとめた。AQ と同様に、 R_{Bcrp} 及び R_{P-gp} は理論上 0-1 の値をとるが、検討した 4 種のモデル化合物は様々な R を示した。すなわち、ciprofloxacin 及び nitrofurantoin は R_{P-gp} と R_{Bcrp} が小さかったことから、これら 2 化合物の消化管吸収における Bcrp 及び P-gp の影響は小さいと考えられる。一方、topotecan や sulfasalazine は比較的大きな R_{Bcrp} を示したのに対し、 R_{P-gp} はほぼ 0 であり、これら化合物の消化管吸収障壁として主に BCRP が機能していることが認められた。

Table 13 Data summary for k_a and AQ values *in vivo*

Compound	$k_{a, wt}$	$k_{a, Bcrp}$	$k_{a, P-gp}$	AQ_{Bcrp}	AQ_{P-gp}
Ciprofloxacin	1.63	1.85	2.18	0.09	0.19
Nitrofurantoin	5.80	6.89	7.20	0.13	0.14
Topotecan	3.18	5.18	3.68	0.35	0.08
Sulfasalazine	1.40	0.49	0.93	---	---

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Table 5)

Table 14 Data summary for F_aF_g and rate for of contribution (R) values *in vivo*

Compound	$(F_aF_g)_{wt}$	$(F_aF_g)_{Bcrp}$	$(F_aF_g)_{P-gp}$	R_{Bcrp}	R_{P-gp}
Ciprofloxacin	0.47	0.51	0.75	0.05	0.36
Nitrofurantoin	0.64	0.77	0.75	0.15	0.13
Topotecan	0.57	1.03	0.64	0.42	0.06
Sulfasalazine	0.16	1.30	0.30	0.79	0.09

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Table 6)

3-3-3 *In vitro*–*in vivo* 相関性に関する検討

前節において、*in vivo* AQ は薬物の消化管吸収におけるトランスポーターの寄与を正確に見積もることのできない化合物がある可能性が示唆され、*in vivo* AQ の代替パラメータとして R を設定した。この R を用いて、*in vitro* で得られた AQ との整合性について検討した (Fig. 20)。これまでに著者らのグループでは、P-gp が消化管吸収障壁となる化合物は $AQ_{P-gp} > 0.4$ を示す傾向にあることを提唱している。また、本検討においても AQ_{BCRP} 、 $R_{BCRP} > 0.4$ を示す化合物において BCRP が消化管吸収障壁として機能している可能性が示唆された。これらの結果より、transporter が消化管吸収障壁となる AQ 及び R のクライテリアを 0.4 に設定し、*in vitro*、*in vivo* 両系において 0.4 以上を示す true positive: T(+), 両系において 0.4 未満となる true negative: T(-), *in vivo* においてのみ、また *in vitro* においてのみ 0.4 以上を示す false positive: F(+), false negative: F(-) とした。さらに、 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。今回検討したすべての化合物に対して、*in vitro* と *in vivo* の両系において同様の結果が得られる T(+) または T(-) に分類され、Caco-2 単層膜透過実験より算出した AQ を用いることによって消化管吸収における BCRP 及び P-gp の寄与を正確に予測できることが示された。

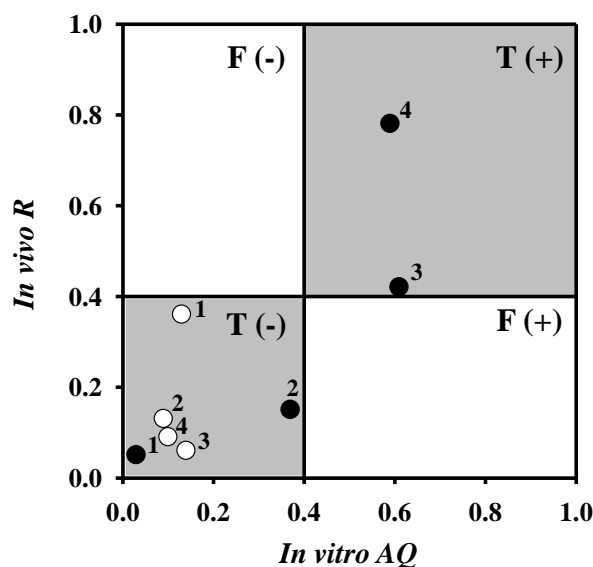


Fig. 20 Relationship between *in vitro* AQ and *in vivo* contribution ratio (R) for 4 model drugs. Open or closed circles represent the relationship between *in vitro* AQ_{P-gp} and *in vivo* R_{P-gp} or *in vitro* AQ_{BCRP} and *in vivo* R_{BCRP} , respectively. Key: 1, ciprofloxacin; 2, nitrofurantoin; 3, topotecan; 4, sulfasalazine. F (-): False negative, F (+): False positive, T (-): True negative, T (+): True positive. (*Pharmacol. Res. Perspect.* **8**, e00544 (2020): Fig. 7)

3-4 考察

本章では、P-S difference 法を WT、Bcrp KO 及び Mdr1a/1b KO マウスに適用することにより消化管吸収における Bcrp と P-gp の寄与の程度を評価した。そして、Bcrp の寄与を定量的に表す *in vivo*R を算出し、*in vitro*AQ_{BCRP} との間に比較的良好な相関性が認められた。BA を支配する要因として重要な消化管吸収と腸管及び肝での初回通過効果を分離するために様々な手法が開発されてきた。一般的な手法として静脈内、門脈内及び経口投与後の薬物動態の比較試験が挙げられる。しかし、門脈内投与は、投与基材の影響や投与速度を吸収速度と一致させることが難しいなどの問題点がある。P-S difference 法は *in vivo* における局所吸収動態の解析に有効な手段の一つであり、これまでに種々の薬物の吸収率や腸肝循環及び小腸代謝を解析するのに応用されてきた^{70,71}。この方法は生理的狀態を保持したまま直接門脈から血液を採取するため上記の問題点を考慮しなくてよい。これらの理由から、本研究では局所吸収動態を解析するため、P-S difference 法を用いた。

Ciprofloxacin の消化管吸収において Bcrp の寄与はなく、P-gp が寄与することが示唆された (Fig. 16、Table 9、Table 13)。しかし、WT マウスにおける消化管吸収率が約 50% であり、ヒトにおいても約 70% 以上の値を示す¹⁰⁰ことから消化管吸収において P-gp の影響を問題視する必要はないと考えられる。また消失過程における Bcrp 及び P-gp の関与が示唆されたことに加え、Ando らは Bcrp KO マウスにおいて胆汁排泄クリアランス及び腎臓中対血漿中濃度比が約 3 倍上昇し、両排泄経路において Bcrp が大きく寄与することを報告している¹¹⁵。しかしながら、ヒトにおいては尿中排泄が主排泄経路であり、またヒトの腎臓における Bcrp の発現はほとんど認められない⁷⁹ことから消失過程における Bcrp を介した薬物間相互作用は起こり難いと考えられる。

次に、nitrofurantoin の消化管吸収においては Bcrp 及び P-gp の両 transporter が影響することが示唆されたが (Fig. 17、Table 10、Table 13)、WT マウスにおける消化管吸収率も良好であり、ヒトにおいて BCRP や P-gp を介した薬物間相互作用などの臨床報告もないことから、これらトランスポーターの影響は無視できると考えられる。

一方、topotecan の脳移行性は、Bcrp よりも P-gp によって主に制御されていることが報告されているが⁵⁵、消化管吸収においては Bcrp が主に寄与していることが明らかとなった (Fig. 18、Table 11、Table 13)。さらに、topotecan の消失過程においても Bcrp の関与が示唆された。マウス及びヒトにおける topotecan の主排泄経路は尿中排泄であると報告されている^{116,117}。しかし、Jonker らは、マウスに topotecan を静脈内投与した際、BCRP 阻害薬である GF120918 を併用した群において胆汁排泄が減少したのに対して、尿中排泄はほとんど変化しないことを報告しており⁵⁹、胆汁排泄において Bcrp が関与した結果、Bcrp KO マウスで CL_{tot} が低下したものと考えられる。

また、ヒトにおける topotecan 経口投与時の BA は 40% であり、topotecan はほとんど代謝を受けない化合物である¹¹¹ことから消化管吸収率も約 40% と比較的消化管吸収性の悪い化合物であると考えられるが、GF120918 を経口で併用するとその BA が約 100% へと顕著に増大することが報告されて

いる^{8,10}。また、BCRP の遺伝子多型 (*ABCG2 421 C>A*) の患者においても経口投与後の *BA* が 1.3 倍増大することが明らかとなっている¹⁰。したがって、これら報告は本検討で得られた結果と一致し、ヒトにおいても *topotecan* の消化管吸収障壁として BCRP が大きく影響していると考えられる。

さらに、*sulfasalazine* の消化管吸収においても *topotecan* と同様に、*Bcrp* が大きく寄与し、*P-gp* の影響は小さいことが明らかとなった (Fig. 19, Table 12, Table 13)。しかしながら、興味深いことに *Bcrp* KO マウスにおいて T_{max} が遅延し、 V_{dss} の顕著な減少が認められ、その結果、消化管吸収率が増大したにも関わらず、*ka* はむしろ小さくなった。この結果は、Karibe や Liao らの報告と一致していた^{118,119}。Zaher らは WT マウスと *Bcrp* KO マウスとの間で *sulfasalazine* の血漿タンパク結合率に差がないことを確認しており¹²⁰、血漿タンパク結合の差異が原因ではないと考えられる。また、他の化合物においても同様の報告があり¹⁰⁶、さらなる検討が必要であると考えられる。ヒトにおいて *sulfasalazine* 経口投与時の *AUC* が BCRP の遺伝子多型 (*ABCG2 421 C>A*) の hetero 患者において wild-type 患者の約 2 倍、homo 患者においては約 3 倍に上昇することが報告された¹²¹。また、各患者群において消失に差異は認められておらず、このことは *sulfasalazine* の腎排泄が胆汁中に比して大きく、ヒト腎に BCRP の発現がほとんど認められない事実を反映しており、臨床においても *sulfasalazine* の消化管吸収に BCRP が大きく影響しているものと考えられる。

以上、P-S difference 法を *Bcrp* KO マウスに適用することにより、モデル化合物の消化管吸収に及ぼす *Bcrp* の寄与について検討を行ったところ、 R_{Bcrp} が比較的高値を示した *topotecan* 及び *sulfasalazine* については臨床において BCRP が消化管吸収障壁や薬物間相互作用などの原因となっていることが明らかとされており、マウスにおいて得られたデータがヒトを精度よく反映できていると考えられる。

最後に、*in vivo* において得られた *R* を踏まえ、前章の *Caco-2* 単層膜透過実験より得られた *in vitro* AQ_{BCRP} が消化管吸収における BCRP の寄与を評価するのに有用であるか否かを検討した (Table 15)。*In vitro* AQ_{BCRP} が低値を示した *ciprofloxacin* 及び *nitrofurantoin* においては *in vivo* R_{Bcrp} も低値を示したのに対して、臨床報告からその消化管吸収に BCRP が大きく影響していると考えられる *topotecan*、*sulfasalazine* に関しては、*in vivo* R_{Bcrp} 、*in vitro* AQ_{BCRP} ともに 0.4 より大きな値を示した。しかし、その絶対値の差異はいずれの化合物においても認められたことから、マウスとヒトの BCRP の基質認識性に差異がある可能性が考えられた。一方、*topotecan* の臨床報告^{8,10}より推定されるヒトでの AQ_{BCRP} は 0.58 であり、*in vitro* AQ_{BCRP} の 0.61 と同程度であった。したがって、*Caco-2* 単層膜透過実験より算出した *in vitro* AQ_{BCRP} を用いることによってヒト消化管吸収における BCRP 寄与を精度よく予測できる可能性が示された。本検討は、4 化合物による評価であったため、今後より多くのモデル化合物を用いて詳細な検討をする必要があると考えられる。

Table 15 Comparison between *in vitro* *AQ* and *in vivo* rate of contribution (*R*) for Bcrp and P-gp

Compound	<i>in vitro</i> (Caco-2)		<i>in vivo</i> (mouse)	
	AQ_{Bcrp}	$AQ_{\text{P-gp}}$	R_{Bcrp}	$R_{\text{P-gp}}$
Ciprofloxacin	0.03	0.13	0.05	0.36
Nitrofurantoin	0.37	0.09	0.15	0.13
Topotecan	0.61	0.14	0.42	0.06
Sulfasalazine	0.59	0.05	0.79	0.09

(*Pharmacol. Res. Perspect.* **28**, e00544 (2020): Table 8)

総括

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良く研究されている P-gp と共に、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、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、予備的検討として、paclitaxel 及び mitoxantrone をそれぞれ P-gp 及び BCRP 基質のモデル化合物として選択し、既知の 7 種の P-gp 阻害薬 (CsA, GF120918, XR9576, LY335979, WK-X-34, VX-710, OC144-093) の P-gp 及び BCRP に対する阻害活性ならびに選択性について Caco-2 細胞を用いて検討した。GF120918, XR9576, LY335979 は P-gp 基質である paclitaxel の BA 方向の Caco-2 膜透過性を顕著に減少し、P-gp に対し強い阻害作用を有することが示された。その中で、LY335979 は BCRP 基質である mitoxantrone の Caco-2 膜透過性に対する影響が小さく、薬物の消化管吸収における 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。そこで、paclitaxel の消化管吸収に及ぼす LY335979 の影響について P-S difference 法を用いて検討した。LY335979 は paclitaxel の消失過程に関与する代謝酵素などへの影響は受けなかったものの、小腸における代謝酵素を阻害する可能性が示唆された。そこで、代謝の影響を最小限にするため、LY335979 の用量を減らし薬物投与後の早い段階で血漿中濃度を測定した。WT マウスに LY335979 を前投与した paclitaxel の吸収速度は Mdr1a/1b KO マウスとほぼ同程度まで上昇したことから、代謝の影響を大幅に軽減できたものと考えられた。さらに、WT マウスに LY335979 を前投与した際の 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 による 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 章では、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、ヒト小腸モデルとして汎用されている 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 AQ_{BCRP} を用いることにより定量的に評価した。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、第 1 章の結果を踏まえて、P-gp 選択的阻害薬の LY335979 及び P-gp と BCRP の両者に対する阻害薬 WK-X-34 を用いた。検討したモデル化合物のうち、topotecan, SN-38, sulfasalazine の吸収方向の透過性 P_{AB} は他の化合物よりも低く (0.81, 1.13, 0.19×10^{-6} cm/s)、 AQ_{BCRP} 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、BCRP 基質となる化

化合物が様々な P_{AB} と AQ_{BCRP} を示しており、特に P_{AB} が約 1.0×10^6 cm/s より小さい値を示す場合に膜透過において BCRP の寄与を大きく受ける可能性が示された。

第 3 章では、第 2 章において得られた *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 の寄与の程度を評価した。その結果、 AQ_{BCRP} 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。これら 2 化合物については消化管に発現する BCRP を介した薬物間相互作用や BCRP 遺伝子多型患者において BA が上昇するなどの臨床報告がなされており、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 の寄与を表すパラメータとして、contribution ratio (R_{Bcrp}) を考案した。 AQ_{BCRP} 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} 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。

以上、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。

謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学薬剤学分野 山本 昌教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり有益なご助言とご校閲を賜りました京都薬科大学薬物動態学分野 栄田 敏之教授、臨床薬学分野 西口 工司教授に深く感謝いたします。

本研究に対して、直接のご指導とご助言を賜りました立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室 藤田卓也教授（前京都薬科大学薬剤学教室助教授）に心より感謝の意を表します。

本研究に際し、多くの貴重なご助言を頂きました神戸薬科大学 河野 裕允講師（前立命館大学立命館グローバルイノベーション研究機構研究准教授）に厚く感謝致します。

さらに、本研究を実施するにあたりご協力をいただきました京都薬科大学薬剤学教室 松浦（旧姓西川） 聡予氏、篠崎 浩平氏、野村 郁雄氏、楠本 憲司氏、立命館大学薬学部分子薬物動態学研究室 丸谷 穂乃花氏に心から御礼申し上げます。

また、学位取得に対して、日本たばこ産業株式会社医薬総合研究所薬物動態研究所所長 野村 幸広氏を始めとした関係者の皆様には多大なるご助言を頂きましたことを御礼申し上げます。

最後に、研究に専念できる時間を与えてくれた妻と子供たちに心から感謝いたします。

引用文献

1. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **9**, 215-236 (2010).
2. Kancy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption process. *J. Med. Chem.* **41**, 1007-1010 (1998).
3. Sugano K, Hamada H, Machida M, and Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J. Biomol. Screen.* **6**, 189-196 (2001).
4. Martin YC. A practitioner's perspective of the role of quantitative structure-activity analysis in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **24**, 229-237 (1981).
5. Balon K, Riebesehl BU and Muller BW. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm. Res.* **16**, 882-888 (1999).
6. Clark DE. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* **88**, 807-814 (1999).
7. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Screen.* **6**, 189-196 (2001).
8. Kuppens IELM, Witteveen EO, Jewell RC, Radema SA, Paul EM, Mangum SG, Beijnen JH, Voest EE, and Schellens JHM. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3276-3285 (2007).
9. Kusuhara H, Furuie H, Inano A, Sunagawa A, Yamada S, Wu C, Fukizawa S, Morimoto N, Ieiri I, Morishita M, Sumita K, Mayahara H, Fujita T, Maeda K, and Sugiyama Y. Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an *in vivo* inhibitor of BCRP. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1793-1803 (2012).
10. Sparreboom A, Loos WJ, Burger H, Sissung TM, Verweij J, Figg WD, Nooter K, and Gelderblom H. Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 650-658 (2005).
11. Shekhawat BP, and Pokharkar BV. Understanding peroral absorption: regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles. *Acta. Pharm. Sin. B.* **7**, 260-280 (2017).
12. Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, Nagai M, Taguchi T, Satsukawa M, and Yamashita S. *In vivo* assessment of the impact of efflux transporter on oral drug absorption using portal vein-cannulated rats. *Drug. Metab. Dispos.* **41**, 1514-1521 (2013).
13. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, and Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy.* **21**, 778-796 (2001).
14. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, and Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 1083-1089 (1996).

15. Jones CR, Hatley OJ, Ungell AL, Hilgendorf C, Peters SA, and Rostami-Hodjegan A. Gut wall metabolism. Application of pre-clinical models for the prediction of human drug absorption and first-pass elimination. *AAPS. J.* **18**, 589-604 (2016).
16. Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, and Leibach FH. Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am. J. Physiol.* **264**, G939-G946 (1993).
17. Han TK, Proctor WR, Costales CL, Cai H, Everett RS, and Thakker DR. Four cation-selective transporters contribute to apical uptake and accumulation of metformin in Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **352**, 519-528 (2015).
18. Maulén NP, Henríquez EA, Kempe S, Cárcamo JG, Schmid-Kotsas A, Bachem M, Grünert A, Bustamante ME, Nualart F, and Vera JC. Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 9035-9041 (2003).
19. Petri N, Tannergren C, Rungstad D, and Lennemäs H. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharm. Res.* **21**, 1398-1404 (2004).
20. Xia CQ, Liu N, Yang D, Miwa G, and Gan LS. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug. Metab. Dispos.* **33**, 637-643 (2005).
21. Naim HY, Joberty G, Alfalah M, and Jacob R. Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **274**, 17961-17967 (1999).
22. Quan YS, Fujita T, Tohara D, Tsuji M, Kohyama M, and Yamamoto A. Transport kinetics of leucine enkephalin across Caco-2 monolayers: quantitative analysis for contribution of enzymatic and transport barrier. *Life Sci.* **64**, 1243-1252 (1999).
23. Artursson P, and Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 880-885 (1991).
24. Balimane PV, Hann YH, and Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS. J.* **8**, E1-E13 (2006).
25. Shirasaka Y, Sakane T, and Yamashita S. Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane. *J. Pharm. Sci.* **97**, 553-565 (2008).
26. Fisher JM, Wrighton SA, Calamia JC, Shen DD, Kunze KL, and Thummel KE. Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1143-50 (1999).
27. Siissalo S, Zhang H, Stilgenbauer E, Kaukonen AM, Hirvonen J and Finel M. The expression of most UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) is increased significantly during Caco-2 cell differentiation, whereas UGT1A6 is highly expressed also in undifferentiated cells. *Drug. Metab. Dispos.* **36**, 2331-6 (2008).
28. Frølund S, Marquez OC, Larsen M, Brodin B, and Nielsen CU. Delta-aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1339-53 (2010).
29. Nielsen CU, Carstensen M, and Brodin B. Carrier-mediated γ -aminobutyric acid transport across the basolateral membrane of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 458-62 (2012).

30. Voigt V, Laug L, Zebisch K, Thondorf I, Markwardt F, and Brandsch M. Transport of the areca nut alkaloid arecaidine by the human proton-coupled amino acid transporter 1 (hPAT1). *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 582-90 (2013).
31. Wang H, Dutta B, Huang W, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V, and Prasad PD. Human Na⁽⁺⁾-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim. Biophys. Acta.* **1461**, 1-9 (1999).
32. Ramanathan S, Pooyan P, Stein S, Prasad PD, Wang J, Leibowitz MJ, Ganapathy V, and Sinko PJ. Targeting the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) for improving the oral absorption properties of a retro-inverso Tat nonapeptide. *Pharm. Res.* **18**, 50-6 (2001).
33. Dantzig AH, and Bergin L. Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1027**, 211-7 (1990).
34. Thwaites DT, Hirst BH, and Simmons NL. Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H⁽⁺⁾-coupled absorption. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 1050-6 (1994).
35. Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J. Pharm. Sci.* **97**, 712-725 (2008).
36. Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, and Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 164-170 (2001).
37. Oostendorp RL, Buckle T, Beijnen JH, van Tellingen O, and Schellens JH. The effect of P-gp (Mdr1a/1b), BCRP (Bcrp1) and P-gp/BCRP inhibitors on the *in vivo* absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib. *Invest. New. Drugs.* **27**, 31-40 (2009).
38. Holmstock N, Mols R, Annaert P, and Augustijns P. *In situ* intestinal perfusion in knockout mice demonstrates inhibition of intestinal p-glycoprotein by ritonavir causing increased darunavir absorption. *Drug. Metab. Dispos.* **38**, 1407-1410 (2010).
39. Dey S, Gunda S, and Mitra AK. Pharmacokinetics of erythromycin in rabbit corneas after single-dose infusion: role of P-glycoprotein as a barrier to *in vivo* ocular drug absorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 246-255 (2004).
40. Sababi M, Borgå O, and Hultkvist-Bengtsson U. The role of P-glycoprotein in limiting intestinal regional absorption of digoxin in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 21-27 (2001).
41. König J, Müller F, and Fromm MF. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol. Rev.* **65**, 944-966 (2013).
42. Wachter VJ, Wu CY, and Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer therapy. *Mol. Carcinog.* **13**, 129-134 (1995).
43. Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, and Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm. Res.* **16**, 408-414 (1999).

44. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, and Grand-Perret T. *In vitro* and *in vivo* reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **53**, 4595-4602 (1993).
45. Newman MJ, Rodarte JC, Benbatoul KD, Romano SJ, Zhang C, Krane S, Moran EJ, Uyeda RT, Dixon R, Guns ES, and Mayer LD. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **60**, 2964-2972 (2000).
46. Roe M, Folkes A, Ashworth P, Brumwell J, Chima L, Hunjan S, Pretswell I, Dangerfield W, Ryder H, and Charlton P. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 595-600 (1999).
47. Slate DL, Bruno NA, Casey SM, Zutshi N, Garvin LJ, Wu H, and Pfister JR. RS-33295-198: a novel, potent modulator of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Anticancer Res.* **15**, 811-814 (1995).
48. Varma MV, Ashokraj Y, Dey CS, and Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol. Res.* **48**, 347-359 (2003).
49. Jekerle V, Klinkhammer W, Scollard DA, Breitbach K, Reilly RM, Piquette-Miller M, and Wiese M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. *Int. J. Cancer.* **119**, 414-422 (2006).
50. Modok S, Mellor HR, and Callaghan R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 350-354 (2006).
51. Lum BL, Kaubisch S, Yahanda AM, Adler KM, Jew L, Ehsan MN, Brophy NA, Halsey J, Gosland MP, and Sikic BI. Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* **10**, 1635-1642 (1992).
52. Guns ES, Denyssevych T, Dixon R, Bally MB, and Mayer L. Drug interaction studies between paclitaxel (Taxol) and OC144-093-a new modulator of MDR in cancer chemotherapy. *Eur. J. Metab. Pharmacokinet.* **27**, 119-126 (2002).
53. Callies S, de Alwis DP, Wright JG, Sandler A, Burgess M, and Aarons L. A population pharmacokinetic model for doxorubicin and doxorubicinol in the presence of a novel MDR modulator, zosuquidar trihydrochloride (LY335979). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **51**, 107-118 (2003).
54. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, and Bates SE. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell. Sci.* **113**, 2011-2021 (2000).
55. de Vries NA, Zhao J, Kroon E, Buckle T, Beijnen JH, and van Tellingen O. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6440-6449 (2007).
56. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, and Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 788-796 (2010).
57. Davies B, and Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* **10**, 1093-1095 (1993).

58. Troutman MD, and Thakker DR. Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayer. *Pharm. Res.* **20**, 1200-1209 (2003).
59. Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, and Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer. Inst.* **92**, 1651-1656 (2000).
60. Lagas JS, van Waterschoot RA, van Tilburg VA, Hillebrand MJ, Lankheet N, Rosing H, Beijnen JH, and Schinkel AH. Brain accumulation of dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by elacridar treatment. *Clin. Cancer. Res.* **15**, 2344-2351 (2009).
61. Tang SC, Nguyen LN, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, and Schinkel AH. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int. J. Cancer.* **134**, 1484-1494 (2014).
62. Jekerle V, Klinkhammer W, Reilly RM, Piquette-Miller M, and Wiese M. Novel tetrahydroisoquinolin-ethyl-phenylamine based multidrug resistance inhibitors with broad-spectrum modulating properties. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **59**, 61-69 (2007).
63. Wu Y, Pan M, Dai Y, Liu B, Cui J, Shi W, Qui Q, Huang W, and Qian H. Design, synthesis and biological evaluation of LBM-A5 derivatives as potent P-glycoprotein-mediated multidrug resistance inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 2287-2297 (2016).
64. Minderman H, O'Loughlin KL, Pendyala L, and Baer MR. VX-710 (biricodar) increases drug retention and enhances chemosensitivity in resistant cells overexpressing P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Clin. Cancer. Res.* **10**, 1826-1834 (2004).
65. Shepard RL, Cao J, Starling JJ, and Dantzig AH. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int. J. Cancer.* **103**, 121-125 (2003).
66. Pick A, Müller H, and Wiese M. Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8224-8236 (2008).
67. Hendrikx JJ, Lagas JS, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH, and Schinkel AH. P-glycoprotein and cytochrome P450 3A act together in restricting the oral bioavailability of paclitaxel. *Int. J. Cancer.* **132**, 2439-2447 (2013).
68. Lee K, Chae SW, Xia Y, Kim NH, Kim HJ, Rhie S, and Lee HJ. Effect of coumarin derivative-mediated inhibition of P-glycoprotein on oral bioavailability and therapeutic efficacy of paclitaxel. *Eur. J. Pharmacol.* **723**, 381-388 (2014).
69. Chae SW, Lee J, Park JH, Kwon Y, Na Y, and Lee HJ. Intestinal P-glycoprotein inhibitors, benzoxanthone analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* **70**, 234-241 (2018).
70. Moriwaki T, Yasui H, and Yamamoto A. A recirculatory model with enterohepatic circulation by measuring portal and systemic blood concentration difference. *J. Pharmacokinetic. Pharmacodyn.* **30**, 119-144 (2003).
71. Moriwaki T, Yasui H, and Yamamoto A. Pharmacokinetic analysis of ramatroban using a recirculatory model with enterohepatic circulation by measuring portal and systemic blood concentration difference in Sprague-Dawley and Eisai hyperbilirubinemic rats. *Pharm. Res.* **21**, 1055-1064 (2004).

72. Rahman, A, Korzekwa, KR, Grogan, J, Gonzalez, FJ, and Harris, JW, Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res.* **54**, 5543-5546 (1994).
73. Sonnichsen DS, Liu Q, Schuetz EG, Schuetz JD, Pappo A, and Relling MV. Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 566-575 (1995).
74. Dantzig, AH, Shepard, RL, Law, KL, Tabas, L, Pratt, S, Gillespie, JS, Binkley, SN, Kuhfeld, MT, Starling, JJ, and Wrighton, SA. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 854-862 (1999).
75. Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, and Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 15665-15670 (1998).
76. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A-L, and Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 1333-1340 (2007).
77. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, and Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **58**, 5337-5339 (1998).
78. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, and Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **59**, 8-13 (1999).
79. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, and Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**, 3458-3464 (2001).
80. Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, and Sugimoto Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer.* **97**, 626-630 (2002).
81. Takada T, Suzuki H, and Sugiyama Y. Characterization of polarized expression of point- or deletion-mutated human BCRP/ABCG2 in LLC-PK1 cells. *Pharm. Res.* **22**, 458-464 (2005).
82. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, and Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **278**, 22644-22649 (2003).
83. Xiao Y, Davidson R, Smith A, Pereira D, Zhao S, Soglia J, Gebhard D, de Morais S, and Duignan DB. A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCK II cell line. *Mol. Pharm.* **3**, 45-54 (2006).
84. Mao Q and Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport—an update. *AAPS. J.* **17**, 65-82 (2015).
85. Kruijtzter CMF, Beijnen JH, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, Schot M, Jewell RC, Paul EM, and Schellens JHM. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2943-2950 (2002).

86. Troutman MD, and Thakker DR. Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharm. Res.* **20**, 1210-1224 (2013).
87. Tachibana T, Kitamura S, Kato M, Mitsui T, Shirasaka Y, Yamashita S, and Sugiyama Y. Model analysis of the concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm. Res.* **27**, 442-446 (2010).
88. Kobayashi S, Shinohara M, Nagai T, and Konishi Y. Transport mechanisms for soy isoflavones and microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2210-2217 (2013).
89. Enokizono J, Kusuhara H, and Sugiyama Y. Effect of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Mol. Pharmacol.* **72**, 967-975 (2007).
90. Álvarez AI, Vallejo F, Barrera B, Merino G, Prieto JG, Tomás-Barberán F, and Espín JC. Bioavailability of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in breast cancer resistance protein 1 knockout mice. *Drug. Metab. Dispos.* **39**, 2008-2012 (2011).
91. Ge S, Wei Y, Yin T, Xu B, Gao S, and Hu M. Transport-glucuronidation classification system and PBPK modeling: New approach to predict the impact of transporters on disposition of glucuronides. *Mol. Pharm.* **14**, 2884-2898 (2017).
92. Gram LM, Rist GM, Lennernäs H, and Steffansen B. Impact of carriers in oral absorption: Permeation across Caco-2 cells for the organic anions estrone-3-sulfate and glipizide. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 378-386 (2009).
93. Sai Y, Kaneko Y, Ito S, Mitsuoka K, Kato Y, Tamai I, Artursson P, and Tsuji A. Predominant contribution of organic anion transporting polypeptide OATP-B (OATP2B1) to apical uptake of estrone-3-sulfate by human intestinal Caco-2 cells. *Drug. Metab. Dispos.* **34**, 1423-1431 (2006).
94. Grube M, Reuther S, Meyer Zu Schwabedissen H, Köck K, Draber K, Ritter CA, Fusch C, Jedlitschky G, and Kroemer HK. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 30-35 (2007).
95. Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH, and Prieto JG. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug. Metab. Dispos.* **34**, 690-695 (2006).
96. Haslam IS, Wright JA, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Coleman T, and Simmons NL. Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug. Metab. Dispos.* **39**, 2321-2328 (2011).
97. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B, Carbon C, and Farinotti R. Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 1728-1734 (1999).
98. Maeda T, Takahashi K, Ohtsu N, Oguma T, Ohnishi T, Atsumi R, and Tamai I. Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Mol. Pharm.* **4**, 85-94 (2007).
99. Lu X, Chan T, Zhu L, Bao X, Velkov T, Zhou QT, Li J, Chan HK, and Zhou F. The inhibitory effects of eighteen front-line antibiotics on the substrate uptake mediated by human organic/cation transporters, organic anion transporting polypeptides and oligopeptide transporters in in vitro models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **115**, 132-143 (2018).

100. Drusano GL, Standiford HC, Plaisance K, Forrest A, Leslie J, and Caldwell J. Absolute oral bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **30**, 444-446 (1986).
101. Wright JA, Haslam IS, Coleman T, and Simmons NL. Breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)-mediated transepithelial nitrofrantoin secretion and its regulation in human intestinal epithelial (Caco-2) layers. *Eur. J. Pharmacol.* **672**, 70-76 (2011).
102. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1758-1764 (2005).
103. Dahan A, and Amidon GL. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **297**, G371-G377 (2009).
104. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RPJO, Rosing H, Beijnen JH, and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15649-15654 (2002).
105. Enokizono J, Kusuhara H, and Sugiyama Y. Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 922-928 (2007).
106. van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JHM, Beijnen JH, and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer. Res.* **63**, 6447-6452 (2003).
107. Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, and Sugiyama Y. Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol. Pharmacol.* **68**, 800-807 (2005).
108. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, and Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **4**, 879-885 (1981).
109. Sarin SK, Groszmann RJ, Mosca PG, Rojkind M, Stadecker MJ, Bhatnagar R, Reuben A, and Dayal Y. Propranolol ameliorates the development of portal-systemic shunting in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension. *J. Clin. Invest.* **87**, 1032-1036 (1991).
110. Herben VM, Rosing H, ten Bokkel Huinink WW, van Zomeren DM, Batchelor D, Doyle E, Beusenberg FD, Beijnen JH, and Schellens JH. Oral topotecan: bioavailability and effect of food co-administration. *Br. J. Cancer.* **80**, 1380-1386 (1999).
111. Schellens JH, Creemers GJ, Beijnen JH, Rosing H, de Boer-Dennert M, McDonald M, Davies B, and Verweij J. Bioavailability and pharmacokinetics of oral topotecan: a new topoisomerase I inhibitor. *Br. J. Cancer.* **73**, 1268-1271 (1996).
112. Azadkhan AK, Truelove SC, and Aronson JK. The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **13**, 523-528 (1982).
113. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, and Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 1873-1879 (2007).

114. Klotz U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin. Pharmacokinet.* **10**, 285-302 (1985).
115. Herben VM, ten Bokkel Huinink WW, and Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of topotecan. *Clin. Pharmacokinet.* **31**, 85-102 (1996).
116. van Hees PA, Bakker JH, and van Tongeren JH. Effect of sulphapyridine, 5-aminosalicylic acid, and placebo in patients with idiopathic proctitis: a study to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Gut.* **21**, 632-635 (1980).
117. Zamboni WC, Houghton PJ, Johnson RK, Hulstein JL, Crom WR, Cheshire PJ, Hanna SK, Richmond LB, Luo X, and Stewart CF. Probenecid alters topotecan systemic and renal disposition by inhibiting renal tubular secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 89-94 (1998).
118. Karibe T, Hagihara-Nakagomi R, Abe K, Imaoka T, Mikkaichi T, Yasuda S, Hirouchi M, Watanabe N, Okudaira N, Izumi T. Evaluation of the usefulness of breast cancer resistance protein (BCRP) knockout mice and BCRP inhibitor-treated monkeys to estimate the clinical impact of BCRP modulation on the pharmacokinetics of BCRP substrates. *Pharm Res.* **32**, 1634-1647 (2015).
119. Liao M, Chuang BC, Zhu Q, Li Y, Guan E, Yu S, Yang J, Prakash S, Xia CQ. Preclinical absorption, distribution, metabolism, excretion and pharmacokinetics of a novel selective inhibitor of breast cancer resistance protein (BCRP). *Xenobiotica.* **48**, 467-477 (2018).
120. Zaher H, Khan AA, Palandra J, Brayman TG, Yu L, and Ware JA. Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol. Pharm.* **3**, 55-61 (2006).
121. Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, Sasaki T, Kimura M, Tabuchi H, Ando Y, Irie S, Ware J, Nakai Y, Higuchi S, and Sugiyama Y. Pharmacogenetic characterization of sulfasalazine disposition based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **84**, 95-103 (2008).