

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790147

研究課題名（和文） 吸収／排泄型トランスポーターの相殺性に基づく薬物吸収動態予測

研究課題名（英文） Quantitative Evaluation of the Effect of Influx/Efflux Transporters on Oral Drug Absorption

研究代表者

白坂 善之（SHIRASAKA YOSHIYUKI）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：60453833

研究成果の概要（和文）：薬物の消化管吸収・排泄に働く influx および efflux トランスポーターの薬物への作用を定量的に解析したところ、talinalol、pravastatin および pitavastatin など様々な薬物の消化管吸収に Oatp が関与している可能性が示され、さらに Oatp によるそれらの輸送が P-gp により相殺される可能性が示された。本研究成果によって、より精度の高い薬物吸収性評価法を提唱するにあたり、これら両タイプのトランスポーター活性に対する優位性・相殺性を組み込むことの重要性が示された。

研究成果の概要（英文）： In the present study, we aimed to clarify the contribution of OATP/Oatp and P-gp to the intestinal absorption of various drugs by means of various *in vitro*, *in situ* and *in vivo* experimental techniques. Through the studies with various drugs including talinalol and pravastatin, pitavastatin, finally, this study revealed that OATP/Oatp is involved in intestinal drug absorption and the contribution of OATP/Oatp-mediated uptake was apparently attenuated by P-gp-mediated efflux in intestinal drug absorption process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学、経口吸収、消化管、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターの基質となる医薬品は、薬物間相互作用や薬物-食物間相互作用も懸念されている。例えば、P 糖蛋白質(P-gp)は、基質薬物を吸収方向とは逆に消化管腔に汲み出す「排泄型トランスポーター」の一つであるが、P-gp の基質となる薬物は、他の基質

薬物との相互作用によりその吸収性が増大され、様々な副作用を生ずる危険性を有する。最近では、フェキソフェナジン(抗アレルギー薬)の吸収率がフルーツジュースの併用により低下したことが報告され、これらの臨床事実を吸収促進に働くと考えられている有機アニオントランスポーター(OATP)の阻害によるものと結論づけられた。しかし、フェ

キソフェナジンは、P-gp の基質であることから、当初は、その吸収率はフルーツジュースによる P-gp 阻害効果により上昇すると推測されていた。こうした予想に反した結果は、フルーツジュースが P-gp よりも OATP を優位かつ効果的に阻害することで生じたものと考察できる。このように、複数のトランスポーターに同時に認識される薬物の場合、その吸収性予測は複雑化する。

消化管吸収に影響を及ぼすトランスポーターとしては、P-gp をはじめ、BCRP、MRP など、種々の排泄型トランスポーターが注目されている。一方で、吸収促進に働くトランスポーターに関しては、ペプチドトランスポーター PEPT1 や OATP などが注目されているが、その位置付けは明確ではない。このような中、研究代表者は、これまでに薬物の経細胞輸送に対する P-gp の影響とその定量的評価に関する研究を行ってきた。そこで本研究では、これまでの研究報告を基盤に、「トランスポーターを介した薬物のヒト吸収性予測システム」を構築することにより、医薬品開発あるいは臨床での医薬品適正使用に貢献していくという着想に至った。

2. 研究の目的

複雑で多様な構造を持った新規医薬品候補化合物の開発に伴い、複数のトランスポーターに基質として認識される医薬品が増加している。これに伴い、生理環境・種差などによる薬物動態特性の複雑さはより一層増大し、特に経口投与薬の有効性を決定する消化管吸収性の予測を困難にしている。そのため現行の *in vitro* 評価システムの妥当性に混乱を招くに至っている。このような事実は、製薬企業においては医薬品開発の中断・変更を引き起こし、その損益に大きく関係することから、創薬早期段階におけるより精度の高い吸収性評価システムの樹立が待望されている。そこで本研究を介して、薬物の消化管吸収・排泄に働く influx (吸収型) および efflux (排泄型) トランスポーターの薬物吸収への作用を、両タイプのトランスポーター間にある活性の優位性 (どちらのタイプのトランスポーターが相対的に優位に影響を及ぼしているのか?) と相殺性 (どちらのタイプのトランスポーターが見かけ上観察できるようになるのか?) という視点から速度論的・定量的に解析し、トランスポーターの影響を考慮できる新しいヒト吸収性予測システムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

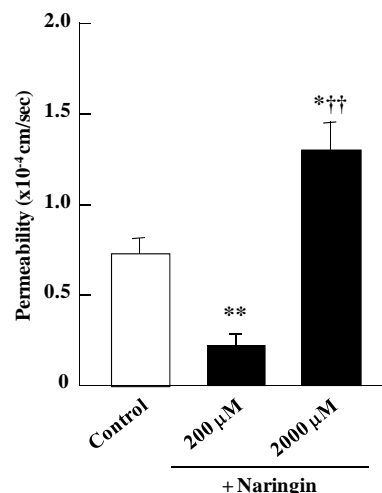
本研究は、主に下記に示した計画 (概要) で進めた。すなわち、

- (1) *In vitro*, *ex vivo*, *in situ* および *in vivo* による薬物の吸収特性比較と薬物動態的解析
- (2) (1) より、原因トランスポーター分子の同定・クローニングおよび消化管発現レベル評価
- (3) (1)-(2) より注目された原因トランスポーターの *in vitro* 細胞系への遺伝子導入
- (4) (3) を用いた種々薬物のトランスポーター輸送特性と速度論的解析ならびに 1) との比較・評価
- (5) (4) の比較・評価とこれに基づいた速度論的評価法の提唱

具体的には、本研究はヒトでの評価が困難であるため、ヒトを十分に考慮した上での動物 (ラット) 実験が基本となる。まず、実際に影響することが推察されるトランスポーター遺伝子 (OATP1A2、OATP2B1、Oatpla5、Oatp2b1、P-gp (MDR1/Mdr1a)、BCRP/Bcrp) を LLC-PK1 細胞あるいはアフリカツメガエル卵母細胞 (oocyte) に導入し *in vitro* 実験系を構築した。本 *in vitro* 実験系を用い各消化管トランスポーターの活性を評価し薬物動態パラメータを得た。一方、ラット消化管を用いて *in situ* 実験 (closed loop method) を行い、得られた膜透過性と *in vitro* 実験の結果を速度論的に比較し、各トランスポーターの消化管吸収過程に対する寄与を解析した。

4. 研究成果

まず、Oatp 発現 oocyte を用いた検討により、talinalol が Oatpla5 の基質となることが明らかとなった。また、Oatpla5 による talinalol の輸送は OATP/P-gp 阻害剤である naringin により阻害され、その IC_{50} 値は $10 \cdot M$ 程度と算出された。一方、LLC-PK1/Mdr1 細胞による検討から P-gp による talinalol の輸送も naringin により阻害され、その IC_{50} 値が $600 \cdot M$ 程度であることが示された。したがって、実際の消化管における talinalol の吸収は、naringin の IC_{50} 値の違いに基づいた Oatpla5 および P-gp 阻害に影響される可能性が示唆された。すなわち、低濃度の naringin



により Oatpla5 が阻害され吸収性が低下し、高濃度の naringin により Oatpla5 に加え P-gp も阻害され吸収性が回復することが期待される。そこで次に、talinalol の消化管吸収に及ぼす Oatpla5 の影響を観察することを目的に、様々な濃度の naringin 併用下におけるラット小腸膜透過性の評価を試みた(図)。その結果、talinalol の膜透過性は低濃度 naringin 存在下で有意に低下し、高濃度 naringin 存在下で有意に上昇した。経口投与後における talinalol の AUC も同様な変動傾向が観察されたことから、talinalol の吸収過程において Oatpla5 と P-gp がその活性の優位性に基づいて機能している可能性が示唆された。ヒト OATP も naringin によって阻害されたことから、talinalol の吸収が P-gp および OATP により調節されていることが推察される。

同様に、pravastatin および pitavastatin が Oatpla5 の基質となることが示された。また、それらの輸送は naringin により阻害され、 IC_{50} 値はそれぞれ $30 \cdot M$ および $20 \cdot M$ 程度と算出された。次に、 $1000 \cdot M$ naringin による、両薬物のラット小腸膜透過性を評価したところ、pravastatin の膜透過性は naringin により有意に低下したが、pitavastatin の膜透過性は有意に上昇した。経口投与後における AUC も同様な変動傾向が観察されたことから、pravastatin 吸収には Oatp が、pitavastatin 吸収には Oatp に加え排泄型トランスポーターが関与している可能性が推察された。LLC-PK1/Mdr1a 細胞を用いた検討により、pitavastatin が P-gp の基質となることが示された。また、その輸送は naringin により阻害され、 IC_{50} 値は $500 \cdot M$ 程度と算出された。ここで、Oatpla5 および Mdr1a を介した pitavastatin 輸送に対する IC_{50} 値に着目した場合、 $200 \cdot M$ naringin が Oatpla5 のみを効率的に阻害する可能性が考えられる。実際に、pitavastatin の小腸膜透過性は、 $200 \cdot M$ naringin 存在下で有意に低下し、pitavastatin 吸収における Oatpla5 の関与が改めて示唆された。

以上より、本研究では、モデル化合物として talinalol、pravastatin および pitavastatin を用い、薬物の消化管吸収性予測における OATP/Oatp 評価の重要性を示した。特に薬物の消化管吸収において Oatp と P-gp がその影響を相殺していることが容易に推察できた。すなわち、*in vitro* による単純な P-gp 評価のみでは、試験化合物の実際の *in vivo* 吸収性やそれに対する P-gp の影響を予測することは困難であり、OATP/Oatp のような influx トランスポーターの影響を含めた総合的な解析が必要であることが示唆された。今後は、celiprolol、nadolol のような他の β_1 受容体遮断薬や、fexofenadine、

quinolone 系などの様々な薬物を用いて同様の検討を行い、薬物のヒト消化管吸収に及ぼす influx/efflux トランスポーターの影響を精度良く評価出来る方法論の構築を目指した研究を行う予定である。本研究の成果ならびに本研究により提唱される新しい消化管吸収性予測システムは、新規医薬品開発にはもちろんのこと、薬物間相互作用の予測など医薬品の適正使用に対しても貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1) Shirasaka Y., Suzuki K. (他 2 名, 1 番目) Differential effect of grapefruit juice on intestinal absorption of statins due to inhibition of organic anion transporting polypeptide and/or P-glycoprotein. *J Pharm Sci.* **In press** (2011).
- 2) Imanaga J., Shirasaka Y. (他 8 名, 7 番目) The effects of the SLC02B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. *Pharmacogenet Genomics.* **21**:84-93 (2011).
- 3) Shirasaka Y., Suzuki K. (他 3 名, 1 番目) Intestinal Absorption of HMG-CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide and P-Glycoprotein/Multidrug Resistance 1. *Drug Metab Pharmacokinet.* **26**:171-179 (2011).
- 4) Kato K., Shirasaka Y. (他 7 名, 2 番目) Intestinal Absorption Mechanism of Tebipenem Pivoxil, a Novel Oral Carbapenem: Involvement of Human OATP Family in Apical Membrane Transport. *Mol Pharm.* **7**: 1747-1756 (2010).
- 5) Shirasaka Y., Suzuki K. (他 2 名, 1 番目) Intestinal Absorption of HMG-CoA Reductase Inhibitor Pravastatin Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide. *Pharm Res.* **27**:2141-2149 (2010).
- 6) Li Y., Shirasaka Y. (他 2 名, 2 番目) Quantitation of talinalol in rat plasma by LC-MS-MS. *J Chromatogr Sci.* **48**: 367-370 (2010).
- 7) Tachibana T., Shirasaka Y. (他 5 名, 5 番目) Model analysis of the

- Concentration-dependent permeability of P-gp substrates. *Pharm Res.* **27**:442-446 (2010).
- 8) Shirasaka Y., Kuraoka E. (他 4 名, 1 番目) Species difference in the effect of grapefruit juice on intestinal absorption of talinolol between human and rat. *J Pharmacol Exp Ther.* **332**: 181-189 (2010).
- 9) Shirasaka Y., Li Y. (他 6 名, 1 番目) Concentration-dependent effect of naringin on intestinal absorption of α_1 -adrenoceptor antagonist talinolol mediated by P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptide (Oatp). *Pharm Res.* **26**: 560-567 (2009).

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 白坂善之, 中西猛夫, 玉井郁巳 Influx/Efflux トランスポーターによる薬物の消化管吸収制御, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 東日本大震災のため誌上開催
- 2) Yoshiyuki Shirasaka, Kensuke Suzuki, Takeo Nakanishi, and Ikumi Tamai. Differential Interaction of Grapefruit Juice with Intestinal Absorption of HMG-CoA Reductase Inhibitors Pravastatin and Pitavastatin., GPEN 2010 (Globalization of Pharmaceuticals Education Network), 2010 年 10 月 12 日, University of North Carolina, Chapel Hill, NC (USA)
- 3) Yoshiyuki Shirasaka, Kensuke Suzuki, Takeo Nakanishi, and Ikumi Tamai. Differential Transporter-Mediated Interaction of fruit juice with pravastatin and pitavastatin in rats., 第 24 回日本薬物動態学会年会, 2010 年 10 月 9 日, 大宮ソニックシティ (埼玉)
- 4) 白坂善之, 鈴木健介, 中西猛夫, 玉井郁巳 トランスポーターを介した HMG-CoA 還元酵素阻害薬の消化管吸収動態, 日本薬剤学会第 25 年会, 2010 年 5 月 12 日, あわぎんホール徳島県郷土文化会館 (徳島)
- 5) 白坂善之, 松下高志, 中西猛夫, Peter Langguth, 玉井郁巳, トランスポーターに起因した薬物の消化管吸収部位差に関する研究 第 24 回日本薬物動態学会年会, 2009 年 11 月 28 日, 国立京都国際会館 (京都)
- 6) 白坂善之, 薬物の消化管吸収に及ぼす P 糖蛋白質の影響とその評価に関する研究, 日本薬剤学会第 34 回製剤セミナー, 2009

年 7 月 13 日, 浜名湖ロイヤルホテル (静岡)

- 7) 白坂善之, 蔵岡えりか, 中西猛夫, Peter Langguth, 玉井郁巳, OATP/P-gp を介した薬物の消化管吸収動態とその種差, 日本薬剤学会第 24 年会, 2009 年 5 月 21 日, 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡)
- 8) Kensuke Suzuki, Yoshiyuki Shirasaka, Takeo Nakanishi, Ikumi Tamai, OATP-Mediated Intestinal Absorption of HMG-CoA Reductase Inhibitors in Rats, The 3rd Asian Pacific ISSX Regional Meeting 2009, 2009 年 5 月 11 日, The Imperial Queen's Park Hotel (Thailand)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白坂 善之 (SHIRASAKA YOSHIYUKI)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 60453833

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし