

氏名	ふじた ありみ 藤田 有美
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2022年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	組織薬物分布に対するMDR1およびBCRP寄与の胎盤・脳関門間比較
論文審査委員	(主査) 教授 登美 斉俊 (博士(薬学)) (副査) 教授 松元 一明 (博士(薬学)) 教授 齋藤 義正 (博士(医学))

論文内容の要旨

【背景】

母体薬物治療における胎児毒性を考慮する上で薬物の胎児移行性は重大な要素である。一般に、薬物の胎児移行性は齧歯類を用いた非臨床試験によって評価される。しかし、胎盤の構造は動物種によって異なるため、齧歯類で得られた結果をそのままヒトに適用することは難しい。そのため、ヒトにおける胎児薬物移行性を齧歯類から予測するには、齧歯類とヒトにおける薬物の胎児分布機構の比較評価が必要である。

血液脳関門や胎盤関門には抗がん剤などを組織外に汲み出す輸送体として **multidrug resistance protein 1 (MDR1)** と **breast cancer resistance protein (BCRP)** が発現する。ヒトおよびマウス脳では、MDR1とBCRPは血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞の **luminal membrane** に発現している。ヒト胎盤関門では、MDR1とBCRPは胎盤関門の実体である合胞体栄養膜細胞層 (SynT) 単層の刷子縁膜 (MVM) に発現している。ヒト胎盤および血液脳関門において、MDR1とBCRPは循環血に接して発現しており、両者ともに基質薬物を循環血中に汲み出すことで胎児や脳への薬物分布抑制に寄与している。一方、齧歯類胎盤はヒト胎盤や脳とは異なり、MDR1とBCRPは循環血に接していない。齧歯類において胎盤迷路部に位置するSynT層は、母体血に接するSynT-Iと胎児血に接するSynT-IIの二層で存在し、MDR1とBCRPはSynT-IIの **apical membrane** に発現している。齧歯類胎盤のSynT-IとSynT-IIは **connexin26** で構成された **gap** 結合にて結びつき、最小内径が1.4 nmの細胞間チャンネルを形成している。したがって、SynT-IとSynT-II間での物質の授受は細胞膜および **gap** 結合を介した経路が存在し、薬物によっては **gap** 結合チャンネルを透過することでMDR1やBCRPによる排出機構を迂回することが想定される。

MDR1およびBCRPの発現量とその輸送活性は相関する。血液脳関門において、マウスとカニクイザルの脳毛細血管内皮細胞におけるMDR1の発現量をそれぞれ算出することで、MDR1基質薬物のマウス脳移行性からカニクイザル脳移行性の予測が可能であることが報告

されている。そのため、胎盤関門においても血液脳関門同様に MDR1 および BCRP の発現分子数を算出することで種差の定量的評価が可能であるように思われる。しかし、齧歯類胎盤において MDR1 と BCRP の局在はヒト胎盤とは異なるため、MDR1 と BCRP 発現量の種差と基質薬物の胎児移行抑制活性の種差が関連しない可能性がある。

【目的】

本研究では、齧歯類胎盤における MDR1 と BCRP 局在の独自性が胎児薬物分布抑制活性に与える影響を定量的に評価することを目的とした。具体的には、マウス血液脳関門とマウス胎盤関門における MDR1 と BCRP の組織薬物分布抑制機能を定量的に比較することで、MDR1 と BCRP の局在の違いが基質薬物の胎児移行抑制における MDR1 と BCRP 寄与に与える影響を明らかにすることを目指した。

【方法】

組織間での MDR1 と BCRP の機能比較を行うためには各組織での MDR1 と BCRP のタンパク質発現量情報が必須である。本研究ではまず、マウス胎盤関門と血液脳関門における MDR1 と BCRP 発現量を比較した。マウス胎盤関門では、妊娠進行に伴って MDR1 と BCRP の発現が変動することが報告されているため、妊娠 (GD) 13.5 および 15.5、17.5 日マウス胎盤迷路部細胞膜画分の MDR1A および MDR1B、BCRP 発現分子数を LC-MS/MS を用いて定量した。マウス脳毛細血管内皮細胞における MDR1 と BCRP 発現分子数は報告値を用いた。さらに、ヒトとマウスでの種差を検討するため、ヒト満期胎盤 MVM における MDR1 と BCRP 発現分子数についても定量した。

続いて MDR1 と BCRP の機能を胎盤と脳で比較した。基質薬物として、Mdr1a/b あるいは Bcrp 欠損マウスを用いた脳組織移行試験にて MDR1 や BCRP が脳移行を抑制していることが報告され、かつ MDR1 または BCRP 過剰発現細胞株を用いた透過試験においても MDR1 や BCRP を介した輸送が認められた薬物のうち、各輸送体で分子量が同程度で pH 7.4 での log D 値や分子の立体構造が異なる薬物 2 種類を選択した。具体的には MDR1 の基質薬物として paclitaxel と digoxin、BCRP 基質薬物として genistein と dantrolene を用いた。野生型および Mdr1a/b 欠損妊娠マウスに対し、投与終了が GD15.5 と 17.5 となるように paclitaxel あるいは digoxin をそれぞれ 48 時間または 72 時間、浸透圧ポンプで持続投与した。野生型および Bcrp 欠損妊娠マウスに対し、genistein では GD15.5 と 17.5 に、dantrolene では GD15.5 にシリンジポンプで 2 時間持続投与した。母体、胎児血漿と母体脳中薬物濃度を LC-MS/MS で定量し、胎児血漿/母体血漿薬物濃度比 ($K_{p,fp}$) および脳/血漿薬物濃度比 ($K_{p,brain}$) を算出した。野生型および欠損妊娠マウスの $K_{p,fp}$ および $K_{p,brain}$ から K_p ratio ($K_{p,欠損型}/K_{p,野生型}$) を求め、MDR1 あるいは BCRP の薬物分布抑制への寄与 (K_p ratio - 1) を算出した。

齧歯類胎盤関門における MDR1 または BCRP 基質薬物の経胎盤透過速度論モデルを構築すると、 K_p ratio - 1 は以下の通り表すことができる。

$$K_{p,\text{brain ratio}} - 1 = \frac{PS_{\text{MDR1 or BCRP, BBB}}}{PS_{l,\text{eff}}} \quad (1)$$

$$K_{p,\text{fp ratio}} - 1 = \frac{PS_{\text{MDR1 or BCRP, PB}}}{PS_{\text{AP2,eff}} + PS_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{PS_{\text{AP2,inf}}}{PS_{\text{BM1,inf}}}\right)} \quad (2)$$

$PS_{\text{MDR1 or BCRP, BBB}}$ と $PS_{\text{MDR1 or BCRP, PB}}$ は、それぞれ脳と胎盤での MDR1 または BCRP による排出輸送、 $PS_{l,\text{eff}}$ と $PS_{\text{AP2,eff}}$ はそれぞれ脳毛細血管内皮細胞 luminal membrane と胎盤 SynT-II apical membrane での MDR1 または BCRP 以外による排出輸送、 PS_{GJ} は gap 結合を介した透過、 $PS_{\text{AP2,inf}}$ と $PS_{\text{BM1,inf}}$ はそれぞれ胎盤 SynT-II apical membrane と SynT-I basal plasma membrane での取込み輸送のクリアランスを表す。

血液脳胎盤関門に対する胎盤関門の MDR1 と BCRP 寄与比 ($R_{P/B}$) は下式に基づいて算出でき、また式 (1) と (2) を用いて表すこともできる。

$$\begin{aligned} R_{P/B} &= \frac{(K_{p,\text{fp ratio}} - 1)/\text{胎盤関門での MDR1 or BCRP 発現分子数}}{(K_{p,\text{brain ratio}} - 1)/\text{脳関門での MDR1 or BCRP 発現分子数}} \\ &= \frac{P_{l,\text{eff}}}{P_{\text{AP2,eff}} + P_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{P_{\text{AP2,inf}}}{P_{\text{BM1,inf}}}\right)} \end{aligned} \quad (3)$$

MDR1 あるいは BCRP 過剰発現細胞株より得られた *in vitro* efflux ratio についても、血液脳関門同様に、*in vitro* efflux ratio に対する胎盤関門の MDR1 と BCRP 寄与比 ($R_{P/C}$) を算出した。なお、*in vitro* efflux ratio は既報にて報告されている値を使用した。

$$\begin{aligned} R_{P/C} &= \frac{(K_{p,\text{fp ratio}} - 1)/\text{胎盤関門での MDR1 or BCRP 発現分子数}}{(\textit{in vitro} \textit{ efflux ratio})/\text{過剰発現細胞株での MDR1 or BCRP 発現分子数}} \\ &= \frac{P_{a,\text{eff}}}{P_{\text{AP2,eff}} + P_{\text{GJ}} \times \left(1 + \frac{P_{\text{AP2,inf}}}{P_{\text{BM1,inf}}}\right)} \end{aligned} \quad (4)$$

$PS_{a,\text{eff}}$ は過剰発現細胞株 apical membrane での MDR1 または BCRP 以外による排出輸送クリアランスを表す。

動物実験は、慶應義塾大学動物実験委員会の承認 (承認番号 12040) を受け、ガイドラインを遵守して行った。ヒト胎盤を用いた研究は慶應義塾大学薬学部 (承認番号: 171222-2、180427-4、200312-3、201005-1) および医学部 (承認番号:20110250)の倫理委員会で承認を得て行った。

【結果】

・マウス胎盤における MDR1 および BCRP の発現分子数解析

マウス胎盤迷路部細胞膜画分での GD13.5 と 15.5 における MDR1A と MDR1B のタンパク発現分子数は同程度であり、いずれも 0.5 fmol/μg_{protein} 前後であった。しかし、出産 1 日

前の GD17.5 において、MDR1A 発現分子数が 0.65 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ であった一方で MDR1B 発現は 0.16 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ に減少し、GD17.5 では MDR1B 発現量は MDR1A に比べ有意に低かった。マウス胎盤迷路部における MDR1A と MDR1B を合計した MDR1 の総発現分子数は GD13.5、15.5、17.5 でそれぞれ 0.93、1.25、0.82 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ であり、GD17.5 が最も発現量が少なかった。マウス胎盤迷路部での BCRP 発現分子数は GD13.5、15.5、17.5 でそれぞれ 0.76、2.53、0.65 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ であり、GD15.5 が最大となるように妊娠進行に伴って一過性の発現変動を示した。ヒト胎盤 MVM 画分における MDR1 と BCRP 発現分子数はそれぞれ 0.26 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ と 0.68 fmol/ $\mu\text{g_protein}$ であった。

・MDR1 基質と BCRP 基質の妊娠期別 $K_{p,fp}$ と $K_{p,brain}$ 比較

Paclitaxel の Mdr1a/b 欠損マウスにおける $K_{p,fp}$ は野生型マウスに比べて GD15.5 で 3.2 倍に、GD17.5 で 7.5 倍に増加し、 $K_{p,brain}$ は 28 倍であった。Digoxin の Mdr1a/b 欠損マウスにおける $K_{p,fp}$ は GD15.5 と GD17.5 共に野生型マウスに比べて 1.4 倍であった。一方、digoxin の Mdr1a/b 欠損マウスにおける $K_{p,brain}$ は野生型マウスに比べて 43 倍に増加し、digoxin の MDR1 による脳移行抑制効果は paclitaxel よりもさらに大きかった。Bcrp 欠損妊娠マウスにおける genistein の $K_{p,fp}$ は GD15.5 では野生型に比べ 2 倍に増加し、GD17.5 では 1.5 倍に増加傾向を示した。一方、genistein の $K_{p,brain}$ は、野生型に比べ 6 倍に増加した。Dantrolene では、Bcrp 欠損妊娠マウスの $K_{p,brain}$ は野生型に比べて 5.7 倍に上昇した一方で、 $K_{p,fp}$ は Bcrp の有無による差は認められず、dantrolene 胎児分布への胎盤 BCRP の寄与は検出されなかった。

・胎盤関門と血液脳関門における MDR1 および BCRP の寄与比較

算出した $R_{p/B}$ と $R_{p/C}$ を表に示す。 $R_{p/B}$ と $R_{p/C}$ は、胎盤関門での MDR1 と BCRP の寄与が血液脳関門あるいは *in vitro* efflux ratio と同等である場合、1 に近い値をとる。Paclitaxel の $R_{p/B}$ と $R_{p/C}$ は最小で 0.23、最大 2.5 であり、胎盤関門での MDR1 による胎児 paclitaxel 移行抑制寄与は血液脳関門と同等であることが示唆された。一方、digoxin の $R_{p/B}$ および $R_{p/C}$ は 1 を大きく下回ったため、血液脳関門と比較して胎盤関門での MDR1 は digoxin の排出ポンプとして効率的に機能していないことが示唆された。

Genistein の $R_{p/B}$ および $R_{p/C}$ は最小が 0.059 で最大が 0.53 であった。特に、genistein の $K_{p,fp}$ に野生型と Bcrp 欠損マウスの間で有意差があった GD15.5 での $R_{p/B}$ と $R_{p/C}$ は 0.059 と 0.26 と 1 を大きく下回った。また、dantrolene は BCRP の有無で $K_{p,fp}$ に差がなかったため、胎盤関門での BCRP は dantrolene の排出ポンプとして実質的に機能していないことが示唆された。

【考察】

・胎盤関門と血液脳関門における MDR1 および BCRP の発現量比較

胎盤迷路部は母体側から栄養膜巨細胞、SynT-I および SynT-II による 2 層の合胞体栄養膜細胞層、胎児毛細血管内皮細胞の計 4 種の細胞層から構成される (図 1C)。MDR1 と BCRP が局在する SynT-II 細胞の apical membrane が、胎盤迷路部細胞膜の約 1/8 を占めると仮定すると、SynT-II 細胞の apical membrane に発現する MDR1 と BCRP 発現量は胎盤迷路部細胞膜画分の 8 倍と概算される。MDR1 と BCRP が発現する細胞膜あたりの発現量を胎

盤関門と血液脳関門で比較すると、胎盤 SynT-II の apical membrane での推定 MDR1 発現量は脳毛細血管内皮細胞 luminal membrane の GD15.5 では 35%、GD17.5 では 23%であり、胎盤 SynT-II の apical membrane に発現する推定 BCRP 発現量は脳毛細血管内皮細胞 luminal membrane の GD15.5 では 280%、GD17.5 では 73%であった。ヒト胎盤 MVM 画分中の MDR1 および BCRP タンパク量を GD17.5 妊娠マウスでの SynT-II apical membrane における推定 MDR1 および BCRP タンパク量と比較すると、それぞれ 4.0%と 13%に過ぎない。満期ヒト胎盤関門における MDR1 および BCRP 発現量はマウスよりも低いことが示唆された。

・胎盤関門と血液脳関門における MDR1 および BCRP の組織薬物移行抑制への寄与比較

$R_{P/B}$ および $R_{P/C}$ が 1 に近い値を示した paclitaxel では、胎盤関門において MDR1 による paclitaxel の胎児移行抑制への寄与は、血液脳関門とほぼ同等か、やや低いことが示された。一方、BCRP の有無で $K_{p,fp}$ に差がなかった dantrolene や、 $R_{P/B}$ および $R_{P/C}$ が 1 を大きく下回った digoxin と genistein の胎児移行抑制への胎盤関門における MDR1 と BCRP の寄与は、血液脳関門での寄与と比較すると著しく低いことが示された。

式 (3) と (4) から、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ が 1 を大きく下回る場合、 $P_{l,eff}$ や $P_{a,eff}$ よりも $P_{AP2,eff} + P_{Gj} \times (1 + P_{AP2,inf}/P_{BM1,inf})$ が大きくなる。 $P_{l,eff}$ 、 $P_{a,eff}$ 、 $P_{AP2,eff}$ 、 $P_{AP2,inf}$ 、 $P_{BM1,inf}$ が専ら単純拡散 (P_{diff}) によると仮定する。このとき、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ は connexin26 による gap 結合を介した透過性 (P_{Gj}) と単純拡散 (P_{diff}) のみで表すことができ、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ は P_{Gj} に対する P_{diff} の比 (P_{Gj}/P_{diff}) と逆相関する。つまり、 $R_{P/B}$ と $R_{P/C}$ が 1 を大きく下回る場合、 P_{Gj}/P_{diff} は大きい値を示す。ヒト connexin26 による gap 結合チャネルの結晶構造によると、6 つのサブユニットのアミノ末端ヘリックスが細胞内孔の入り口に並んで漏斗様構造を形成しており、その最小内径は 1.4 nm である。本研究で用いた薬物の投影像から求めた最小分子径は paclitaxel で 1.6 nm、digoxin で 1.3 nm、genistein で 0.9 nm、dantrolene で 0.8 nm であり、paclitaxel を除く 3 つの薬物で gap 結合の最小内径より小さい。そのため、paclitaxel と比較して digoxin や genistein、dantrolene の P_{Gj} は大きいことが想定される。細胞膜は脂質二重膜で構成されているため、脂溶性が高い薬物は細胞膜透過性が優れている。Paclitaxel の pH 7.4 での log D は 6.83 であり、digoxin、genistein、dantrolene の pH 7.4 での log D はそれぞれ 1.26 と 3.94、1.56 と比較して脂溶性が高い。実際に、pH 7.4 における parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) の単純拡散透過性は paclitaxel で 398 cm/s と報告されており、digoxin の 0.8 cm/s よりもはるかに大きい。そのため、digoxin と genistein、dantrolene は paclitaxel に比べて P_{diff} が小さいことが想定される。以上より、digoxin や genistein、dantrolene は paclitaxel に比べ大きな P_{Gj}/P_{diff} を有していたため、結果として胎盤での MDR1 や BCRP が digoxin や genistein、dantrolene の胎児分布に与える影響は小さいと考えることができる。

【結論】

これまで、MDR1 や BCRP 基質薬物の胎児移行性を齧歯類からヒトに外挿する際には、局在の差異は考慮されていなかった。しかし、本研究において経胎盤輸送速度論モデルを構築

して検討を行った結果、分子径が 1.4 nm 未満で gap 結合による透過性が大きく、単純拡散による透過性が小さい基質では、齧歯類胎盤関門での MDR1 や BCRP の寄与が小さくなる可能性が示された。本研究は、MDR1 と BCRP の胎児薬物分布制御における齧歯類とヒトとの種差を克服し、ヒトでの薬物の胎児移行性を定量的に評価するための端緒となる研究であり、安全で有効な妊婦薬物治療の確立に寄与する知見である。

論文審査結果の要旨

ヒト胎盤関門は単層構造であり、MDR1 と BCRP は合胞体栄養膜細胞膜層の母体側細胞膜に発現している。これまで、MDR1 と BCRP の機能は妊娠齧歯類を用いた薬物の胎児移行性試験によって評価されてきた。しかし、齧歯類胎盤関門は二層構造であり、MDR1 と BCRP は胎児側合胞体栄養膜細胞層の母体側細胞膜に局在し、connexin26 による gap 結合と共局在している。そのため、ヒトと齧歯類の間には、胎盤関門 MDR1 および BCRP による薬物胎児分布抑制能に種差が存在すると考えられ、その評価は周産期薬物治療における胎児での毒性や有効性を予測する上で重要である。

本研究の意義は、齧歯類胎盤における MDR1 と BCRP 局在の独自性が、薬物の胎児分布抑制に与える影響を定量的に評価した点である。本研究では、単層構造の 1 例としたマウス血液脳関門と、胎盤関門を比較することとし、まず MDR1 および BCRP の発現分子数比較を行った。その結果、血液脳関門に比べて胎盤関門における MDR1 発現量は 1/4 程度である一方、BCRP 発現量は同程度か妊娠日数によっては胎盤関門の方が血液脳関門よりも一過的に高いことを明らかとした。さらに、申請者は MDR1 基質として paclitaxel と digoxin、BCRP 基質として genistein と dantrolene を用い、野生型および *Mdr1a/b* 欠損あるいは *Bcrp* 欠損妊娠マウスにおける移行性を比較評価した。評価結果から、各関門における発現分子数あたりの MDR1 あるいは BCRP の寄与を算出し、胎盤関門の血液脳関門に対する比を求めた。その結果、paclitaxel は胎盤関門と血液脳関門で組織薬物分布抑制における MDR1 の寄与に差がなかった一方、digoxin、genistein、および dantrolene では胎盤関門における MDR1 あるいは BCRP の寄与は血液脳関門での寄与に比べて顕著に低いことを明らかにした。さらに、申請者は、マウス胎盤関門の経胎盤輸送速度論モデルを構築し、胎盤関門における MDR1 と BCRP の寄与は、connexin26 による gap 結合を介した透過の単純拡散透過に対する比と逆相関することを示した。Connexin26 による gap 結合を透過できる分子径を有し単純拡散速度が遅い MDR1 あるいは BCRP 基質は、gap 結合による迂回輸送の影響で、マウス胎盤関門における MDR1 または BCRP の寄与が小さくなることが示唆された。

本研究は、動物実験によって評価される胎児移行性や毒性からヒトにおける移行性や毒性を予測する上で考慮すべき重要な発見を含むものであり、その学術的意義は大きい。また、博士学位論文審査会では、自らの研究に関する周辺知識及び研究成果を明快に説

明し、議論を展開していた。評価教員からは、薬物胎児分布における代謝の影響、本研究で得られた知見の臨床への応用、MDR1A と MDR1B の機能差などについて質問があり、申請者の応答は概ね妥当であった。以上より、本研究は博士（薬学）の学位論文に値すると認める。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

A Fujita, S Noguchi, R Hamada, S Inoue, T Shimada, S Katakura, T Maruyama, Y Sai, T Nishimura, M Tomi: Limited Impact of Murine Placental MDR1 on Fetal Exposure of Certain Drugs Explained by Bypass Transfer between Adjacent Syncytiotrophoblast Layers. *Pharm Res* doi: 10.1007/s11095-022-03165-6. Online ahead of print.

【参考論文】

K Isoda, J Nakade, Y Suga, A Fujita, T Shimada, Y Sai: Initial Serum C-reactive Protein Level as a Predictor of Increasing Serum Vancomycin Concentration During Treatment. *The Drug Monit* 2021, 43(5):652-656.

T Shimada, M Okano, M Yamada, Y Ogawa, A Ueda, Nagase K, Sai Y: Administration of Erlotinib in Apple Juice Overcomes Decreased Absorption in a Rat Model of Gastric Acid Suppression, *Drug Metab Pharmacokinet* 2020, 35(6):534-538.