

**P糖タンパク質の発現誘導および
ヒト化マウスにおける薬物輸送に関する研究**
—ヒト薬物体内動態予測の精度向上を目指して—

2018年

分子薬物治療学講座 (薬物学研究室)

山崎 由貴

目次

略語一覧	5
序論	7
第1章 P糖タンパク質 (P-gp) ヒト化動物におけるヒト P-gp の発現 および機能解析	9
1.1 序文	11
1.2 実験材料および実験方法	13
1.2.1 P-gp ヒト化マウスの作製	
1.2.2 Reverse Transcription PCR 法	
1.2.3 脳毛細血管および小腸上皮細胞の細胞膜画分におけるタンパク発現 量の測定	
1.2.4 hMDR1-MAC マウスの脳における P-gp の機能解析	
1.2.5 hMDR1-MAC マウスの腸管における P-gp の機能解析	
1.2.6 血漿および脳における薬物濃度の測定	
1.2.7 データ解析	
1.2.8 統計解析	
1.3 結果	23
1.3.1 hMDR1-MAC マウスの各臓器における hMDR1 mRNA の発現	
1.3.2 hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管におけるヒト P-gp タンパクの発 現	
1.3.3 hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分におけるヒト P-gp タン パクの発現	
1.3.4 hMDR1-MAC マウスの脳におけるヒト P-gp の機能	
1.3.5 hMDR1-MAC マウスの腸管におけるヒト P-gp の機能	
1.3.6 WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスにおける7種の P-gp 基質の中枢移行性の比較	
1.3.7 WT および hMDR1-MAC マウスにおける7種の P-gp 基質の基質認 識性の比較	
1.4 考察	44

第2章 <i>In vivo</i> におけるP-gpの発現誘導	49
2.1 序文.....	51
2.2 実験材料および実験方法	53
2.2.1 試薬	
2.2.2 実験動物	
2.2.3 誘導剤の投与	
2.2.4 臓器の摘出	
2.2.5 mRNA発現量の測定	
2.2.6 粗膜画分の調製およびタンパク発現量の測定	
2.2.7 誘導剤投与による薬物間相互作用の解析	
2.2.8 統計解析	
2.3 結果.....	57
2.3.1 腸管のMdr1a/1b mRNAおよびP-gpタンパク発現量に対するPCN投与の影響	
2.3.2 肝臓のMdr1a/1b mRNAおよびP-gpタンパク発現量に対するPCN投与の影響	
2.3.3 脳のMdr1a/1b mRNAおよびP-gpタンパク発現量に対するPCN投与の影響	
2.3.4 Verapamilの中枢移行に対するPCN投与の影響	
2.4 考察.....	66
総括.....	71
参考文献.....	73
主論文目録.....	83
謝辞.....	85
主査・副査名.....	87

略語一覽

ABC	ATP-binding cassette
ATP	adenosine-5'-triphosphate
AUC	area under the curve
BBB	blood-brain barrier
BCRP	breast cancer resistance protein
CYP	cytochrome P450
ES	embryonic stem
ESI	electrospray ionization
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
hMDR1	human MDR1
HPMC	hydroxypropyl methyl cellulose
KO	knockout
$K_{p,brain}$	the ratio of $AUC_{brain (0-2 hr)}$ to $AUC_{plasma (0-2 hr)}$
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MAC	mouse artificial chromosome
MRM	multiplexed multiple reaction monitoring
MRP	multidrug resistance protein
PBS	phosphate buffered saline
PCN	pregnenolone 16 α -carbonitrile
P-gp	P-glycoprotein
PIC	protease inhibitor cocktail
PTFE	polytetrafluoroethylene
PVDF	polyvinylidene difluoride
PXR	pregnane X receptor
RT	reverse transcription
SNP	single-nucleotide polymorphism
Tc	trans-chromosomal
ULQ	under the limit of quantification
WT	wild-type

序論

P 糖タンパク質 (P-glycoprotein, P-gp, 遺伝子名 *MDR1*) は, adenosine-5'-triphosphate (ATP) の加水分解エネルギーを用いて, 基質となる薬物を細胞内から細胞外へ排出する代表的な ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである. P-gp は多剤耐性を獲得したがん細胞に高発現する膜タンパクとして発見され, がん細胞の多剤耐性を克服するための治療標的として注目を集めた (1). その後の研究により, P-gp はがん細胞のみならず, 血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB), 腸管, 肝臓および腎臓などの正常組織にも発現することが明らかとされた (2-4). これらの正常組織に発現する P-gp は, 薬物の中枢移行および腸管吸収の抑制, 胆汁および尿中排泄の促進などを担うことにより, 薬物の血中濃度および組織分布を制御する (2-9). また, P-gp は幅広い組織に発現して薬物の体内動態を制御することに加え, 化学構造や作用機序の異なる多様な薬物を基質として認識することから, 多くの薬物の体内動態に影響をおよぼすことが知られている (7, 8, 10). その中には, 血中濃度のモニタリングが必要な抗てんかん薬および免疫抑制剤, 抗がん剤など, 有害事象の生じやすい薬物も多く含まれる (10, 11). 一方, P-gp の阻害もしくは発現誘導作用を持つ薬物と P-gp 基質を併用することにより, 臨床的に重要な薬物間相互作用が惹起されることも明らかとなっている (10, 11). P-gp を介した薬物間相互作用を活用し, P-gp 基質となる抗がん剤と P-gp 阻害剤の併用により, 腫瘍へ効率的に抗がん剤を送達することで, 抗がん剤の治療効果を向上させる試みもなされている (3, 10-12). つまり, P-gp による薬物の血中濃度や組織内濃度の制御は, 臨床における薬理作用および有害作用の発現に密接に関係する. その重要性から, 本邦の厚生労働省, アメリカ食品医薬品局, 欧州医薬品庁および国際トランスポーターコンソーシアムは, 新薬候補化合物が P-gp の基質となるか否か, また, 候補化合物が P-gp の阻害作用を有するか否かについて, 新薬開発の早期に検討することを推奨している (13-16).

非臨床段階で P-gp 基質の体内動態や毒性作用を *in vivo* で解析可能なツールとして, マウスやラットなどのげっ歯類, および P-gp ノックアウト動物が使用されている (14, 17-19). 一方で, P-gp 基質の中枢移行性にはヒトとげっ歯類の間で差異があり, P-gp による薬物輸送に種差が存在することが示唆されている (20). P-gp は, ヒトでは *MDR1* 遺伝子, げっ歯類では *Mdr1a* および *Mdr1b* 遺伝子によりコードされており, ヒトとげっ歯類の間では, 組織における P-gp の発現量に差異が認められる (21-25). また, P-gp の基質認識性についても, P-gp 発現細胞株を用いた *in vitro* 試験系により, ヒトとげっ歯類の間で差異がある可能

性が示されている (26-28). これらの種差により, 実験動物を用いた薬物動態試験の結果から, ヒトにおける P-gp 基質の体内動態および P-gp を介した薬物間相互作用を予測することは困難である. ヒトにおける P-gp 基質の体内動態および P-gp を介した薬物間相互作用の予測には, 各組織に機能的なヒト P-gp を発現した P-gp ヒト化動物が有用であると考えられるが, そのような P-gp ヒト化動物は未だ樹立されていない.

P-gp の発現は, pregnane X receptor (PXR) をはじめとした種々の核内受容体により制御される (10). PXR リガンドによる PXR の活性化は, *MDR1* 遺伝子の転写活性化を介して P-gp の発現を誘導し, P-gp の基質となる薬物の体内動態を変化させる (10, 29). 先に述べた通り, P-gp は広範な基質認識性を示すことから, PXR リガンドによる P-gp の発現誘導は多くの P-gp 基質の体内動態に影響をおよぼす (10). したがって, PXR リガンドによる P-gp の発現誘導および P-gp の発現誘導を介した薬物間相互作用について明らかにすることは, ヒト *in vivo* における薬物の体内動態を予測するにあたって重要である. これまでに, ヒトおよびげっ歯類を用いた複数の報告により, PXR リガンドの投与によって小腸の P-gp の発現誘導が惹起されることが明らかとなっている (30-38). 一方で, 肝臓および脳のパ-gp については, PXR リガンドの投与により誘導されるか否かについて統一した見解は得られていない. さらに, PXR リガンドにより大腸の P-gp が発現誘導されるか否かについても, 未だ明らかとなっていない.

以上のことから, 本研究の第 1 章では, P-gp ヒト化動物を作製し, P-gp 基質の体内動態予測モデルおよび P-gp を介した薬物間相互作用予測モデルとしての有用性を明らかにすることを目的とした. また, 第 2 章においては, *in vivo* において腸管, 肝臓および脳に発現する P-gp が PXR リガンドによって誘導されるか否かを明らかにすることを目的とした.

第 1 章

P 糖タンパク質 (P-gp) ヒト化動物における ヒト P-gp の発現および機能解析

1.1 序文

P-gp は臨床における薬物動態を考慮する上で極めて重要な因子であることから、新薬候補化合物が P-gp の基質となるか否か、また、候補化合物が P-gp の阻害作用を有するか否かについては、新薬開発の早期に検討することが推奨されている (13-15). その初期スクリーニング方法としては、Caco-2 細胞や P-gp 発現細胞株などを用いた *in vitro* 試験が広く用いられている (13-15). しかし、細胞を用いた *in vitro* 試験のデータから、*in vivo* における薬物の組織分布、有効性および安全性に対する P-gp の影響を明らかにすることは困難である. P-gp 発現細胞株を用いた *in vitro* 試験を応用し、ヒト組織におけるタンパク発現定量法と組み合わせることにより、*in vivo* における P-gp 基質の中枢移行性を予測できる可能性も示されているものの (39, 40), *in vitro* 試験のデータを元に、ヒト *in vivo* における P-gp 基質の体内動態および P-gp を介した薬物間相互作用を予測することは依然として困難である.

非臨床段階で P-gp 基質の体内動態や毒性作用を *in vivo* で解析可能なツールとして、マウスやラットなどのげっ歯類、および P-gp ノックアウト動物が使用されている (14, 17-19). 一方で、P-gp の基質の中枢移行性にはヒトとげっ歯類の間で差異があり、P-gp による薬物輸送に種差が存在することが示唆されている (20). すなわち、げっ歯類のデータを用いてヒト *in vivo* における P-gp 基質の体内動態を予測するにあたっては、P-gp による薬物輸送の種差を考慮する必要がある.

P-gp は、ヒトでは *MDR1* 遺伝子、げっ歯類では *Mdr1a* および *Mdr1b* 遺伝子によりコードされており、ヒトとげっ歯類の間では、組織における P-gp の発現量に差異が認められる. 例えば、マウスおよびラットの脳毛細血管における P-gp タンパク発現量は、ヒトに比較して有意に高値を示す (21-23). 同様の差異は、小腸上皮細胞における P-gp タンパク発現量についても認められている (24, 25). また、P-gp の基質認識性についても、P-gp 発現細胞株を用いた *in vitro* 試験系により、ヒトとげっ歯類の間で差異がある可能性が示されている (26-28). しかしながら、ヒトとげっ歯類の間で基質認識性に大きな差異はないとする報告も存在し (41), P-gp の基質認識性に種差があるか否かについては未だ統一した見解が得られていない. 現状、P-gp の基質認識性を解析可能なツールは P-gp 発現細胞株のみであり、P-gp の基質認識性における種差をより詳細に明らかにするためには、これらの細胞以外の評価系を開発する必要がある.

近年、薬物の体内動態を規定する薬物代謝酵素やトランスポーターを標的とした『ヒト化マウス』の作製が数多く試みられている. ヒト化マウスは、ヒトとげっ歯類の間の種差の問題を克服したモデル動物であり、ヒト *in vivo* における

薬物体内動態の予測に有用なツールである。その有用性から、ABC トランスポーターのサブファミリーである multidrug resistance protein 2 (MRP2) および breast cancer resistance protein (BCRP) については、既にヒト化マウスが樹立されており、薬物動態研究および創薬への利用が期待されている (42, 43)。同様に、P-gp についても、Sadiq ら (44) により、P-gp ヒト化マウスの作製を試みたことが報告されている。しかし、Sadiq らが作製した P-gp ヒト化マウスは、BBB におけるヒト P-gp の発現が極めて低く、マウス内在性の P-gp のノックアウトも不十分であった。また、作製した P-gp ヒト化マウスにおける P-gp 基質の中枢移行性は P-gp ノックアウトマウスとほぼ同等であり、導入したヒト P-gp が機能していないことも示されており、Sadiq ら自身は、作製した P-gp ヒト化マウスを “insufficient humanized mice” と結論付けている。一方で、Sadiq らの報告以外に、P-gp ヒト化マウスの樹立を試みた報告は存在しない。すなわち、機能的なヒト P-gp を発現した P-gp ヒト化マウスは、未だ樹立されていない。

我々は、染色体工学技術により、マウス人工染色体 (mouse artificial chromosome, MAC) ベクターを用いて P-gp ヒト化マウス (human MDR1-MAC マウス, 以下 hMDR1-MAC マウス) を作製した。MAC ベクターは、プラスミドやウイルスを用いた従来法に比較して、様々な利点を有する遺伝子導入法である (45, 46)。例えば、MAC ベクターは宿主染色体に挿入されず、独立して保持されることから、宿主遺伝子を破壊することなく遺伝子導入が可能である。また、MAC ベクターに搭載する遺伝子サイズには制限がなく、発現制御領域や非翻訳領域も搭載可能である。さらに、MAC ベクターは一定のコピー数で安定に保持されるといった性質を有していることから、導入遺伝子の過剰発現および発現消失が起きにくいという特徴を持つ。本研究では、この MAC ベクターを用いて作製した hMDR1-MAC マウスについて、各組織における hMDR1 mRNA およびヒト P-gp タンパクの発現を評価した。続いて、hMDR1-MAC マウスの BBB および腸管に発現するヒト P-gp の機能を解析することにより、ヒト *in vivo* における P-gp 基質の体内動態予測モデルおよび P-gp を介した薬物間相互作用予測モデルとしての hMDR1-MAC マウスの有用性を検討した。

1.2 実験材料および実験方法

1.2.1 P-gp ヒト化マウスの作製

P-gp ヒト化マウスの作製には, *hMDR1* 遺伝子の翻訳領域, 非翻訳領域および発現制御領域を含む全 440 kb を MAC ベクターに挿入した hMDR1-MAC ベクターを用いた. 作製した hMDR1-MAC ベクターをマウス embryonic stem (ES) 細胞に導入し, hMDR1-MAC マウスを保持した ES 細胞を ICR マウスに導入することにより, hMDR1-MAC ベクターを保持した trans-chromosomal (Tc) マウスを作製した. その後, Tc マウスとマウス内在性の P-gp をノックアウトした *Mdr1a/1b*-knockout (*Mdr1a/1b*-KO) マウスを交配させることにより, P-gp ヒト化動物 hMDR1-MAC/*Mdr1a/1b*-KO マウス (以下 hMDR1-MAC マウス) を作製した (47).

野生型 (ICR, wild-type, WT), *Mdr1a/1b*-KO および hMDR1-MAC マウスは, 9-12 週齢の雄を使用した. 本実験は千葉大学および鳥取大学の動物実験委員会において承認され, 実験動物の取り扱いガイドラインに従っておこなわれた.

1.2.2 Reverse Transcription PCR 法

hMDR1-MAC マウスの臓器からの total RNA の抽出は, ISOGEN II (ニッポンジーン, 東京) を用いてプロトコル通りにおこなった. 抽出時に混入したゲノム DNA は, recombinant RNase-free DNase I (Roche, Basel, Switzerland) 処理により除去した. Total RNA におけるゲノム DNA の混入の有無はマウス glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のゲノム領域に特異的なプライマー [forward, 5'-CACAACCTGCTGTTTCTGCTGCCA-3'; reverse, 5'-CTTGCCCTTCCAGATTGCCCTAC-3' (ユーロフィンジェノミクス, 東京)] および Emerald Amp MAX PCR Master Mix (タカラバイオ, 滋賀) を用い, annealing 温度を 59°C, サイクル数を 40 サイクルとした PCR により確認した. Total RNA からの first strand cDNA の合成は, High-Capacity cDNA Reverse Transcription (RT) Kits (Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO, USA) および付属の random hexamer primer を用いてプロトコル通りにおこなった. 得られた first strand cDNA は超純水を用いて 20 ng/μL に希釈した. この cDNA 希釈液をテンプレートとし, hMDR1 およびマウス GAPDH mRNA を検出した. hMDR1 mRNA の検出は, hMDR1 に特異的なプローブ (TaqMan Gene Expression Assays, Thermo Fisher Scientific, Hs00184500_m1) および THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡, 大阪) を用いてプロトコル通りにおこなった. マウス GAPDH mRNA の検出は, マウス GAPDH に特異的なプライマー (forward, 5'-AAGCCCATCACCATCTTCCAGG-3'; reverse, 5'-GGTTCACACCCATCACAAACAT-3') および Emerald Amp MAX PCR Master

Mix を用い、annealing 温度を 60°C に設定しておこなった。各遺伝子および臓器における PCR のサイクル数は Table 1 に示した条件を用いた。PCR 後の反応液は、MDR1 mRNA についてはエチジウムブロマイド含有 3.5%アガロース SFR (Amresco, Solon, OH, USA) ゲル、GAPDH mRNA についてはエチジウムブロマイド含有 3%標準アガロース (日本ジーン) ゲルにて電気泳動をおこなった。目的の増幅産物は LAS-4000 (富士フイルム, 東京) を用いて UV 照射により検出した。

1.2.3 脳毛細血管および小腸上皮細胞の細胞膜画分におけるタンパク発現量の測定

1.2.3.1 脳毛細血管の調製

WT, *Mdr1a/1b*-KO および hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管の調製は、Uchida らの方法 (48) を一部改変しておこなった。マウスの凍結脳組織 (n=10/群) を群ごとにプールし、ホモジネートした後、デキストランを用いて遠心した。次いで、210, 85 および 45 μm のナイロンメッシュを用いて精製した後、脳毛細血管を 20 μm のナイロンメッシュで回収した。得られた脳毛細血管画分は、超音波処理により低張性の緩衝液に溶解させた。脳毛細血管画分のタンパク濃度は Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

1.2.3.2 小腸上皮細胞の細胞膜画分の調製

WT, *Mdr1a/1b*-KO および hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞の細胞膜画分の調製は、Akazawa らの報告 (25) を一部改変しておこなった。マウスの十二指腸 (幽門から 5 cm, n=5/群) を摘出し、1 cm 長に切断して切開した後、群ごとにプールした。細胞膜画分のタンパク濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

1.2.3.3 タンパク発現量の測定

標的分子のタンパク発現量は、Uchida ら (48) および Nakamura ら (49) の報告に従い、multiplexed multiple reaction monitoring (MRM) 分析によって定量した。脳毛細血管画分および小腸上皮細胞の細胞膜画分を 12 mM sodium deoxycholate および 12 mM N-lauroylsarcosinate で変成させ、還元およびアルキル化後に lysyl endopeptidase および trypsin で消化した (50)。内部標準として、同様の方法で消化した安定同位体標識ペプチドを添加した。次いで、調製したペプチドを脱塩し、0.1%ギ酸水溶液に溶解して液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) の試料とした。検量線用試料は、各標的分子の非標識ペプチドを単一系列で希釈し、インジェクション量が 0.5-100 fmol となるように調製した。内部標準ペプチドのインジェクション量は 30 fmol とした。

試料の分析には, micro-LC system (SCIEX, Framingham, MA, USA) および QTRAP6500 (SCIEX) を用いた. イオン化モードはエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) とした. カラムは ChromXP C18CL column (Eksigent, Redwood City, CA, USA) を使用した. 各標的分子に対するトランジションの一覧を Table 2 に示した. 得られたデータは MultiQuant3 (SCIEX) を用いて解析し, 内部標準ペプチドに対する測定対象ペプチドのピーク面積比を算出した. 検量線は検量線用試料の各濃度に対するピーク面積比をプロットし, 線形最小二乗法もしくは重み付き最小二乗法により回帰して得た. 定量値は各分子につき 3-4 組のトランジションから得られた値を平均して求めた.

1.2.4 hMDR1-MAC マウスの脳における P-gp の機能解析

1.2.4.1 試薬

Elacridar hydrochloride は AdoQ BioScience (Irvine, CA, USA) より購入した. Indinavir sulfate は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) より購入した. Hydroxyzine hydrochloride は和光純薬工業 (大阪) より購入した. Loperamide hydrochloride, quinidine sulfate, ritonavir および verapamil hydrochloride は東京化成工業 (東京) より購入した. Paclitaxel は KareBay Biochem (Monmouth Junction, NJ, USA) より購入した. Vinblastine sulfate は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した.

1.2.4.2 投与薬液の調製

Paclitaxel および ritonavir の投与薬液は, ethanol:polysorbate 80 (1:1, v/v) 溶液にそれぞれ 6 および 3 mg/mL となるように調製したものを -20°C で保管し, 投与直前 (投与前 4 時間以内) に生理食塩水でそれぞれ最終濃度 1.5 および 0.75 mg/mL となるように希釈したものを使用した. Elacridar 投与薬液は, 2% polysorbate 80 含有 1% hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC, 信越化学工業, 東京) 水溶液:超純水 (1:1, v/v) 溶液に 5 mg/mL となるように調製したものを使用した. その他の薬物については生理食塩水を用いて投与薬液を調製し, それぞれの最終濃度は 0.5 mg/mL (hydroxyzine hydrochloride および indinavir sulfate), 0.2 mg/mL (loperamide hydrochloride), 1 mg/mL (quinidine sulfate), 0.1 mg/mL (verapamil hydrochloride) もしくは 0.4 mg/mL (vinblastine sulfate) とした.

1.2.4.3 P-gp 基質の尾静脈内投与および検体の採取

WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウス (n=3-6/time point) に hydroxyzine hydrochloride (5 mg/kg), indinavir sulfate (5 mg/kg), loperamide hydrochloride (2 mg/kg), paclitaxel (10 mg/kg), quinidine sulfate (10 mg/kg), ritonavir (5 mg/kg), verapamil hydrochloride (1 mg/kg) もしくは vinblastine sulfate (4 mg/kg) を尾静脈内投与した. 各薬物の薬液量は, paclitaxel および ritonavir については

6.7 mL/kg (マウス体重), その他の薬物については 10 mL/kg (マウス体重) とした. 各薬物の尾静脈内投与から 0.5 から 4 時間後にマウスを頸椎脱臼し, 腹部大静脈から採血をおこなった後, 全脳を摘出した. 採取した血液は 10,000 g, 4°C で 10 分間遠心し, 得られた上清を血漿とした. 全脳は重量を測定し, 4 倍量 (w/v) の超純水を加えてホモジネートすることにより脳ホモジネートを調製した. 血漿および脳ホモジネートは -80°C で保存した.

1.2.4.4 P-gp 阻害剤および P-gp 基質の投与と検体の採取

hMDR1-MAC マウス (n=4) に elacridar (50 mg/kg) を経口投与した. Vehicle 群 (n=4) の hMDR1-MAC マウスには 2% polysorbate 80 含有 1% HPMC 水溶液 : 超純水 (1:1, v/v) 溶液を投与した. Elacridar および溶媒の薬液量は 10 mL/kg (マウス体重) とした. Elacridar もしくは溶媒の投与 4 時間後に, paclitaxel を 1.2.4.3 と同様の方法で尾静脈内投与した. さらに, Paclitaxel の投与 4 時間後に 1.2.4.3 と同様の方法で採血および全脳摘出をおこない, 血漿および脳ホモジネートを調製した.

1.2.5 hMDR1-MAC マウスの腸管における P-gp の機能解析

1.2.5.1 試薬

Paclitaxel は 1.2.4.1 と同じものを用いた.

1.2.5.2 投与薬液の調製

Paclitaxel の投与薬液は, ethanol:polysorbate 80 (1:1, v/v) 溶液に 6 mg/mL とするよう調製したものを -20°C で保管し, 投与直前 (投与前 4 時間以内) に生理食塩水で最終濃度 1 mg/mL となるように希釈したものを使用した.

1.2.5.3 Paclitaxel の経口投与および検体の採取

WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウス (n=5-6/群) に paclitaxel (10 mg/kg) を経口投与した. 薬液量は 10 mL/kg (マウス体重) とした. また, 投与前 2 時間は絶食とした. Paclitaxel の経口投与から 15, 30 分, 1, 2, 4 および 8 時間後に, マウスの眼窩静脈叢より 50 μ L ずつ経時的に採血をおこなった. 採取した血液は 10,000 g, 4°C で 10 分間遠心し, 得られた上清を血漿とした. 血漿は -80°C で保存した.

1.2.6 血漿および脳における薬物濃度の測定

測定試料は, 以下に記載するように血漿および脳ホモジネートを液-液抽出法もしくは除タンパク法で処理した後に, Table 3 に示した内部標準物質を添加して調製した. 測定試料を LC-MS/MS で分析することにより, 血漿および脳における各薬物濃度を定量した. 検量線用試料は, サンプルのかわりに未処置のマ

ウス血漿もしくは脳ホモジネートを用い、各薬物を定量範囲内で添加した以外は、測定試料と同様の処理により調製した。

1.2.6.1 測定試料の調製

1.2.6.1.1 Paclitaxel

Paclitaxel の尾静脈内投与から 4 時間後もしくは経口投与後に採取したサンプルについては、液-液抽出法によって測定試料を調製した。ガラス試験管に血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL を添加した。次いで、未処置のブタ血清もしくは未処置のマウス脳ホモジネート 80 μL 、メタノール 20 μL 、内部標準溶液 20 μL および t-butyl methyl ether 1 mL を添加し、10 分間激しく振盪した後、1,710 g、4°C で 10 分間遠心した。得られた上層 800 μL を新たなガラス試験管に移し、減圧下で蒸発濃縮した後、200 μL の 60%メタノールにより再溶解させた。再溶解液の全量を 0.45 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) フィルターでろ過し、得られたろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

Paclitaxel の尾静脈内投与から 0.5, 1 および 2 時間後に採取したサンプルについては、除タンパク法によって測定試料を調製した。1.5 mL ポリプロピレンチューブに内部標準溶液 20 μL を加え、減圧下で蒸発乾固させた後、アセトニトリル 200 μL によって再溶解させた。次いで、血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL を添加し、3 分間激しく攪拌した後、20,400 g、4°C で 5 分間遠心した。得られた上清 180 μL に超純水 60 μL を添加した後、全量を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、得られたろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.1.2 Hydroxyzine

1.5 mL ポリプロピレンチューブに内部標準溶液 20 μL を添加した。次いで、血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL および 0.1%ギ酸アセトニトリル 200 μL を添加し、激しく攪拌した後、20,400 g、4°C で 10 分間遠心して除タンパクした。得られた上清 160 μL に超純水 40 μL を添加した後、全量を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、得られたろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.1.3 Indinavir および Loperamide

1.5 mL ポリプロピレンチューブに内部標準溶液 20 μL を添加した。次いで、血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL および 0.1%ギ酸アセトニトリル 200 μL を添加し、激しく攪拌した後、20,400 g、4°C で 10 分間遠心して除タンパクした。得られた上清 180 μL に超純水 60 μL を添加した後、全量を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、得られたろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.1.4 Quinidine

1.5 mL ポリプロピレンチューブに血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL を添加した。次いで、内部標準物質を含む 0.1%ギ酸水溶液 : 0.1%ギ酸アセトニトリル (1:2, v/v) を 180 μL 添加し、激しく攪拌した後、20,400 g、4°C で 10 分間遠心し

で除タンパクした。得られた上清を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、ろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.1.5 Ritonavir および Vinblastine

1.5 mL ポリプロピレンチューブに血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL を添加した。次いで、内部標準物質を含む 5 mM 酢酸アンモニウム含有 0.1% ギ酸水溶液 : 0.1% ギ酸アセトニトリル (1:2, v/v) を 180 μL 添加し、激しく攪拌した後、20,400 g, 4°C で 10 分間遠心して除タンパクした。得られた上清を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、ろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.1.6 Verapamil

1.5 mL ポリプロピレンチューブに内部標準溶液 20 μL を添加した。次いで、血漿もしくは脳ホモジネート 20 μL および 0.1% ギ酸アセトニトリル 200 μL を添加し、激しく攪拌した後、20,400 g, 4°C で 10 分間遠心して除タンパクした。得られた上清 150 μL に超純水 50 μL を添加した後、全量を 0.45 μm PTFE フィルターでろ過し、得られたろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。

1.2.6.2 LC-MS/MS による分析

Quinidine, ritonavir および vinblastine の分析は LC-20AD Prominence HPLC ポンプ (島津製作所, 京都), SIL-20AC HT オートサンプラー (島津製作所) および QTRAP4500 (SCIEX) を用いておこなった。その他の薬物の分析は LaChrom ULTRA L-2160U UPLC ポンプ (日立, 東京), LaChrom Elite L-2200 オートサンプラー (日立) および amaZon SL (Bruker Daltonics K.K., Billerica, MA, USA) を用いておこなった。いずれの薬物についても、イオン化モードは ESI positive とし、MRM モードで測定をおこなった。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-MS-II Packed Column 2.0 \times 150 mm, 5 μm (ナカライテスク, 京都), COSMOSIL 3C₁₈-MS-II Packed Column 2.0 \times 50 mm, 3 μm (ナカライテスク) および TSKgel ODS-100Z 2.0 \times 150 mm, 5 μm (東ソー, 京都) を用いた。各薬物に対する詳細な LC-MS/MS 条件は Table 3 に示した。得られたデータは MultiQuant (SCIEX) もしくは QuantAnalysis (Bruker Daltonics K.K.) を用いて解析し、内部標準物質に対する測定化合物のピーク面積比を算出した。検量線は検量線用試料の各濃度に対するピーク面積比をプロットし、線形最小二乗法もしくは重み付き最小二乗法により回帰して得た。

1.2.7 データ解析

濃度時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve, AUC) は台形法により算出した。各薬物の $K_{p,brain}$ および $K_{p,brain}$ ratio は、それぞれ下記の式 [1] および [2] に従って算出した。

$$K_{p,brain} = \frac{AUC_{brain (0-2 hr)}}{AUC_{plasma (0-2 hr)}} \quad [1]$$

$$K_{p,brain} \text{ ratio} = \frac{K_{p,brain} \text{ in Mdr1a/1b-KO mice}}{K_{p,brain} \text{ in WT or hMDR1-MAC mice}} \quad [2]$$

P-gp transport activity per molecule は、Uchida らの報告 (40) に従い、下記の式 [3] により算出した。

$$\begin{aligned} \text{P-gp transport activity per molecule} = \\ \frac{K_{p,brain} \text{ ratio} - 1}{\text{P-gp protein expression levels}} \\ \text{in brain capillaries of WT and hMDR1-MAC mice} \end{aligned} \quad [3]$$

1.2.8 統計解析

データは平均±標準偏差もしくは標準誤差として示した。統計解析には Excel 統計ソフト Statcel 3 (オーエムエス出版, 東京) を用い、Scheffe's F-test による多重比較検定もしくは Student's *t*-test による 2 群比較検定をおこなった。いずれの検定においても、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

Table 1. PCR cycle numbers for RT-PCR

Tissue	hMDR1 (Cycles)	Mouse GAPDH (Cycles)
Brain	40	28
Intestine	38	30
Liver	38	30
Kidney	40	28
Spleen	40	30
Adrenal gland	36	30
Testis	38	28
Stomach	40	28
Thymus	40	28
Heart	40	26

Table 2. MRM transitions used for multiplexed MRM analysis for determination of protein expression levels

Protein	Amino acid sequence	Unlabeled peptide (m/z)				Labeled peptide (m/z)					
		Q1	Q3-1	Q3-2	Q3-3	Q3-4	Q1	Q3-1	Q3-2	Q3-3	Q3-4
Human MDR1 & Mouse Mdr1a	NTTGALTTR	467.8	377.2	490.3	618.4	719.4	471.3	377.2	497.3	625.4	726.4
Human MDR1	FYDPLAGK	455.7	275.2	311.1	485.3	600.3	457.7	279.2	311.1	489.3	604.3
Mouse Mdr1a	ATVSASHIIR	352.2	173.1	348.7	392.2	441.8	354.5	173.1	352.2	395.7	445.3
Mouse Mdr1b	EAVDEDVPLVSFWR	831.4	659.3	904.5	1003.6	1118.6	836.4	659.3	758.3	914.5	1128.6
Mrp4	APVLFFDR	482.8	268.2	584.3	697.4	796.4	486.3	268.2	584.3	704.4	803.5
Bcrp	SSLLDVLAAAR	522.8	430.3	529.3	644.4	757.5	526.3	437.3	536.4	651.4	764.5
Villin-1	YNDEPVQIR	567.3	393.1	612.4	741.4	856.5	572.3	393.1	622.4	751.4	866.5
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	VDNSSLTGESEPOTR	810.4	717.3	903.4	903.4	1004.5	813.4	723.4	909.4	1010.5	1123.6

Table 3. Conditions used for LC-MS/MS analysis of compounds

Target	Internal standard		Column		Flow rate (mL/min)	Injection volume (μ L)	Mobile phases		Gradient condition Time (min); B concentration%
	Compound	MRM transition	Compound	MRM transition			No.	Temp ($^{\circ}$ C)	
Hydroxyzine	m/z 375.2 \rightarrow 200.9	m/z 268.0 \rightarrow 116.0	Metoprolol	m/z 268.0 \rightarrow 116.0	1	30	0.25	10	0-2; 5 \rightarrow 6-14.5; 95 \rightarrow 15; 5
Indinavir	m/z 614.3 \rightarrow 465.3	m/z 455.2 \rightarrow 164.9	Verapamil	m/z 455.2 \rightarrow 164.9	2	30	0.20	10	0-2; 10 \rightarrow 7; 95 \rightarrow 11.1-15; 10
Loperamide	m/z 477.2 \rightarrow 266.0	m/z 376.1 \rightarrow 164.9	Haloperidol	m/z 376.1 \rightarrow 164.9	2	30	0.20	10	0-2; 15 \rightarrow 7; 95 \rightarrow 11.1-15; 15
Paclitaxel	m/z 876.4 \rightarrow 308.0	m/z 830.4 \rightarrow 549.2	Docetaxel	m/z 830.4 \rightarrow 549.2	2	30	0.20	20 or 30	0-2; 70 \rightarrow 9; 90 \rightarrow 11.6-15; 70
Quinidine	m/z 325.2 \rightarrow 160.1	m/z 455.2 \rightarrow 165.1	Verapamil	m/z 455.2 \rightarrow 165.1	3	40	0.60	3	0-1.2; 5 \rightarrow 2; 90 \rightarrow 3.71-5; 5
Ritonavir	m/z 721.3 \rightarrow 268.1	m/z 614.4 \rightarrow 465.2	Indinavir	m/z 614.4 \rightarrow 465.2	3	40	0.60	3	0-1; 20 \rightarrow 1.9; 90 \rightarrow 3.41-4.7; 20
Verapamil	m/z 455.2 \rightarrow 164.9	m/z 614.3 \rightarrow 465.3	Indinavir	m/z 614.3 \rightarrow 465.3	2	30	0.30	10	0-2; 15 \rightarrow 6; 95 \rightarrow 8.01-9; 15
Vinblastine	m/z 406.3 \rightarrow 376.2	m/z 455.2 \rightarrow 165.1	Verapamil	m/z 455.2 \rightarrow 165.1	3	40	0.60	5	0-0.5; 15 \rightarrow 2; 90 \rightarrow 3.71-5; 15

The column consisted of either a COSMOSIL 5C₁₈-MS-II Packed Column 2.0 \times 150 mm, 5 μ m (Column 1), a TSKgel ODS-100Z 2.0 \times 150 mm, 5 μ m (Column 2) or a COSMOSIL 3C₁₈-MS-II Packed Column 2.0 \times 50 mm, 3 μ m (Column 3). Mobile phases consisted of 0.1% formic acid in water (Mobile phase 1), 0.1% formic acid in water with 5 mM ammonium acetate (Mobile phase 2), 0.1% formic acid in acetonitrile (Mobile phase 3) and methanol (Mobile phase 4).

1.3 結果

1.3.1 hMDR1-MAC マウスの各臓器における hMDR1 mRNA の発現

hMDR1-MAC マウスにおける hMDR1 mRNA の発現を明らかにするため、RT-PCR による mRNA 発現解析をおこなった。解析対象臓器は、ヒトにおいて hMDR1 mRNA の発現が報告されている脳、腸管、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、胃、胸腺および心臓とした (51)。hMDR1-MAC マウスにおいては、検討した全ての臓器について hMDR1 mRNA の発現が認められた (Fig. 1)。一方、Mdr1a/1b-KO マウスにおいては、いずれの臓器においても hMDR1 mRNA の発現は認められなかった (data not shown)。

1.3.2 hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管におけるヒト P-gp タンパクの発現

hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管におけるヒト P-gp タンパクの発現を明らかにするため、WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスから脳毛細血管を単離し、LC-MS/MS によるタンパク発現量の解析をおこなった。P-gp タンパク発現量の解析は、ヒト MDR1, マウス Mdr1a および Mdr1b にそれぞれ特異的もしくはヒト MDR1 およびマウス Mdr1a に共通するペプチド配列を標的とした (Table 2)。WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスから単離した脳毛細血管画分のタンパク回収量は、それぞれ 149, 230 および 204 μg であった。脳毛細血管画分の純度および均一性を示す膜タンパク質マーカー $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ の発現量は (39, 40), WT マウスに比較して hMDR1-MAC マウスで 1.7 倍高値を示した (Table 4)。また、P-gp と同様に BBB に発現する ABC トランスポーターである Mrp4 および Bcrp の発現量についても、WT マウスに比較して hMDR1-MAC マウスで 1.6 倍高値を示した (Table 4)。これらのことから、脳毛細血管画分の純度および均一性は WT と hMDR1-MAC マウスの間で異なっており、hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管画分は、WT マウスに比較して純度および均一性が高いと考えられた。

Table 4 に示したように、hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管画分においては、ヒト MDR1 に特異的なペプチドが検出されたのに対し、マウス Mdr1a および Mdr1b に特異的なペプチドは検出されなかった。一方、WT マウスの脳毛細血管画分においては、マウス Mdr1a に特異的なペプチドが検出されたのに対し、ヒト MDR1 およびマウス Mdr1b に特異的なペプチドは検出されなかった。Mdr1a/1b-KO マウスにおいては、ヒト MDR1, マウス Mdr1a および Mdr1b のいずれのペプチドも検出されなかった。さらに、ヒト MDR1 およびマウス Mdr1a に共通するペプチド配列を標的として解析したところ、hMDR1-MAC マウスの

脳毛細血管における P-gp タンパク発現量は、WT マウスと比較して有意に低値を示した (0.43 倍, 2.21 vs 5.15 fmol/ μ g protein).

1.3.3 hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分におけるヒト P-gp タンパクの発現

hMDR1-MAC マウスの腸管におけるヒト P-gp タンパクの発現を明らかにするため、WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスから小腸上皮細胞膜画分を単離し、1.3.2 と同様に LC-MS/MS によるタンパク発現量の解析をおこなった。WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスから単離した小腸上皮細胞膜画分のタンパク回収量は、それぞれ 760, 941 および 679 μ g であった。小腸上皮細胞膜画分の純度および均一性を示す膜タンパク質マーカー Na⁺/K⁺-ATPase の発現量について (25), WT と hMDR1-MAC マウスの間で有意な差は認められなかった (Table 5)。このことから、小腸上皮細胞膜画分の純度および均一性は両マウス間で同等であると考えられた。

Table 5 に示したように、hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分においては、ヒト MDR1 に特異的なペプチドが検出されたのに対し、マウス Mdr1a および Mdr1b に特異的なペプチドは検出されなかった。一方、WT マウスの小腸上皮細胞膜画分においては、マウス Mdr1a に特異的なペプチドが検出されたのに対し、ヒト MDR1 およびマウス Mdr1b に特異的なペプチドは検出されなかった。Mdr1a/1b-KO マウスにおいては、ヒト MDR1, マウス Mdr1a および Mdr1b のいずれのペプチドも検出されなかった。さらに、ヒト MDR1 およびマウス Mdr1a に共通するペプチド配列を標的として解析したところ、hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分における P-gp タンパク発現量は、WT マウスと比較して有意に低値を示した (0.03 倍, 0.70 vs 22.86 fmol/ μ g of protein)。

1.3.4 hMDR1-MAC マウスの脳におけるヒト P-gp の機能

1.3.4.1 Paclitaxel の中枢移行性

hMDR1-MAC マウスの脳に発現することが示されたヒト P-gp タンパクの機能を明らかにするため、WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスに P-gp 基質である paclitaxel を尾静脈内投与し、投与 4 時間後の脳内および血漿中 paclitaxel 濃度から脳-血漿濃度比を算出することにより、各マウスにおける paclitaxel の中枢移行性を解析した。Paclitaxel は、P-gp の機能欠損により中枢移行が大きく増加することが報告されている代表的な P-gp 基質である (39, 52)。Mdr1a/1b-KO マウスにおける paclitaxel の脳内濃度は、WT および hMDR1-MAC マウスに対して有意に高値を示し、それぞれ 8.5 および 11.6 倍であった (Fig. 2A)。一方、paclitaxel の血漿中濃度については、WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-

MAC マウスの間で有意な差異は認められなかった (Fig. 2B). Mdr1a/1b-KO マウスにおける paclitaxel の脳-血漿濃度比は, WT および hMDR1-MAC マウスに対して有意に高値を示し, それぞれ 4.3 および 6.1 倍であった (Fig. 2C).

1.3.4.2 Paclitaxel の中枢移行に対する P-gp 阻害剤の影響

hMDR1-MAC マウスにおける paclitaxel の中枢移行抑制が導入したヒト P-gp によるものか否かを明らかにするため, hMDR1-MAC マウスに P-gp 阻害剤を前処置し, paclitaxel の中枢移行に対する P-gp 阻害剤の影響を検討した. P-gp 阻害剤には, WT マウスにおける paclitaxel の中枢移行を亢進させるが, Mdr1a/1b-KO マウスにおける paclitaxel の中枢移行は亢進させないことが報告されている elacridar を用いた (53, 54). hMDR1-MAC マウスにおいて, paclitaxel の脳内濃度は elacridar の前処置により 5.4 倍に増加したのに対し (Fig. 3A), paclitaxel の血漿中濃度については, elacridar の前処置による有意な変化は認められなかった (Fig. 3B). Paclitaxel の脳-血漿濃度比は, elacridar の前処置により 3.5 倍に増加した (Fig. 3C).

1.3.4.3 Hydroxyzine の中枢移行性

WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスに P-gp 非基質を尾静脈内投与し, その中枢移行性を解析した. P-gp 非基質には, P-gp を機能欠損しても中枢移行性の変化が認められず, かつ BBB を通過することが知られている hydroxyzine を用いた (41, 55). その結果, hydroxyzine の投与 1 時間後において, 脳内濃度, 血漿中濃度および脳-血漿濃度比のいずれについても, WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスの間で有意な差異は認められなかった (Figs. 4A-C).

1.3.5 hMDR1-MAC マウスの腸管におけるヒト P-gp の機能

hMDR1-MAC マウスの腸管に発現するヒト P-gp タンパクの機能を明らかにするため, P-gp の機能欠損により経口バイオアベイラビリティが大きく増加することが知られている paclitaxel (56-58) を WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスに経口投与し, 各マウスにおける paclitaxel の血中濃度推移を解析した. WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスにおける paclitaxel 経口投与 15, 30 分, 1, 2, 4 および 8 時間後の血中濃度推移を Fig. 5A に示した. Mdr1a/1b-KO マウスにおける paclitaxel の血漿中濃度は, WT マウスの paclitaxel 血漿中濃度と比較して全ての時間で高値を示した. hMDR1-MAC マウスにおける paclitaxel の血漿中濃度は, Mdr1a/1b-KO マウスとほぼ同じ推移を示したが, 投与 15, 30 分および 1 時間後における paclitaxel 血漿中濃度は, hMDR1-MAC マウスが Mdr1a/1b-KO マウスに比較して低値を示す傾向が認められた. Paclitaxel 経口投与 8 時間後までの AUC を求めたところ, Mdr1a/1b-KO マウスにおける値

は WT マウスにおける値に比較して有意に高値を示した (Fig. 5B). 一方, Mdr1a/1b-KO と hMDR1-MAC マウスの間で, paclitaxel の AUC 値に差異は認められなかった (Fig. 5B).

Paclitaxel 経口投与 1 時間後までの paclitaxel 血漿中濃度について, hMDR1-MAC マウスでは Mdr1a/1b-KO マウスに比較して低値を示す傾向が認められたことから (Fig. 5A), paclitaxel の吸収過程における P-gp の機能を解析するため, 各マウスにおける paclitaxel 経口投与 5 分後の門脈血漿中濃度を測定した. Mdr1a/1b-KO マウスにおける paclitaxel の門脈血漿中濃度は, WT マウスに比較して高値を示す傾向が認められたものの, 両マウスの間には有意な差異は認められなかった (Fig. 6). また, Mdr1a/1b-KO と hMDR1-MAC マウスの間においても, paclitaxel の門脈血漿中濃度に有意な差異は認められなかった (Fig. 6).

1.3.6 WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスにおける 7 種の P-gp 基質の中枢移行性の比較

WT, Mdr1a/1b-KO および hMDR1-MAC マウスに paclitaxel を含む 7 種類の P-gp 基質を尾静脈内投与し, 投与 0.5, 1 および 2 時間後の脳内および血漿中薬物濃度から脳-血漿濃度比および $K_{p,brain}$ を算出することにより, 各マウスにおける P-gp 基質の中枢移行性を比較した. P-gp の基質には, paclitaxel に加えて, 同じく P-gp の機能欠損により中枢移行が大きく増加することが報告されている indinavir, loperamide, quinidine, ritonavir, verapamil および vinblastine を用いた (17, 26, 41, 59-64). Fig. 7 および Table 6 に示したように, 検討した全ての薬物について, Mdr1a/1b-KO マウスにおける脳内濃度は WT および hMDR1-MAC マウスに対して高値を示した. 一方, 血漿中濃度については, loperamide, paclitaxel, ritonavir および vinblastine のいくつかの点を除いて, 各マウスの間で有意な差異は認められなかった (Fig. 7 および Table 6). Mdr1a/1b-KO マウスにおける各薬物の脳-血漿濃度比は, ritonavir の投与 1 時間後を除いて, 薬物および投与後の時間経過にかかわらず全ての点で WT および hMDR1-MAC マウスに対して有意に高値を示した (Fig. 7 および Table 6). さらに, Mdr1a/1b-KO マウスにおける各薬物の $K_{p,brain}$ 値は, WT および hMDR1-MAC マウスに対して高値を示した (Table 7). また, いずれの薬物についても, hMDR1-MAC マウスにおける $K_{p,brain}$ 値は WT マウスに対して高値を示す傾向が認められた (Table 7).

1.3.7 WT および hMDR1-MAC マウスにおける 7 種の P-gp 基質の基質認識性の比較

WT と hMDR1-MAC マウスの間で各薬物の $K_{p,brain}$ 値に差異が認められたことから (Table 7), P-gp の基質認識性を示す P-gp transport activity per molecule を算

出し、WT と hMDR1-MAC マウスの間で P-gp の基質認識性を比較した。WT および hMDR1-MAC マウスにおける各薬物の P-gp transport activity per molecule を Fig. 8 に示した。WT における P-gp transport activity per molecule は、loperamide, indinavir, ritonavir, verapamil, quinidine, paclitaxel, vinblastine の順に高い値を示した。一方、hMDR1-MAC マウスにおける P-gp transport activity per molecule は、indinavir, loperamide, paclitaxel, ritonavir, verapamil, quinidine, vinblastine の順に高い値を示し、WT とは異なる結果であった。WT マウスにおける各薬物の P-gp transport activity per molecule は、hMDR1-MAC マウスに対して 0.85 から 3.6 倍の値を示した (indinavir, 0.85 倍; paclitaxel, 1.0 倍; vinblastine, 1.2 倍; quinidine, 1.6 倍; verapamil, 1.9 倍; ritonavir, 2.5 倍; loperamide, 3.6 倍)。

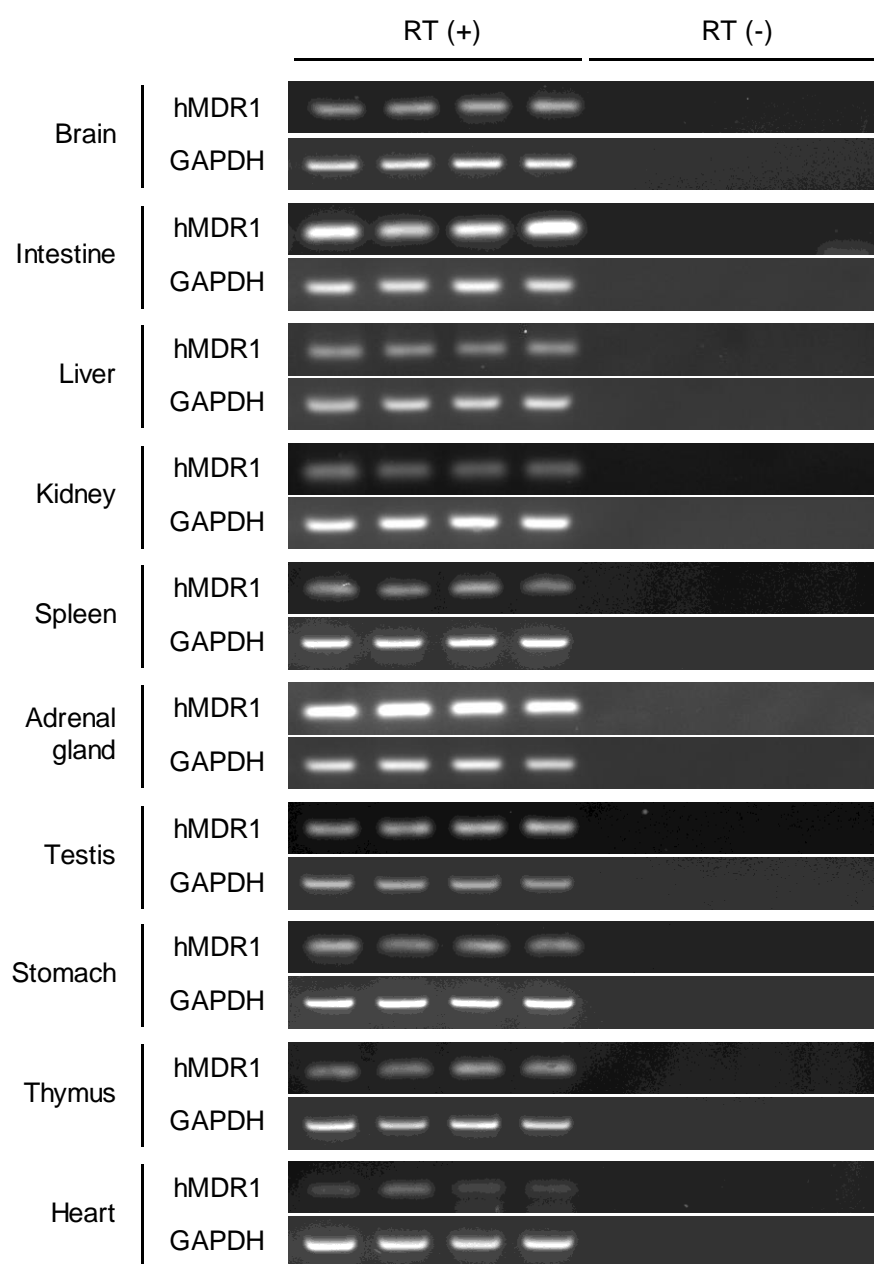


Fig. 1. Expression of hMDR1 mRNA in various tissues of hMDR1-MAC mice. RT-PCR analysis was performed for detection of hMDR1 mRNA in various tissues of hMDR1-MAC mice. Each lane represents samples from an individual mouse. Expression of mouse GAPDH was used as an internal control.

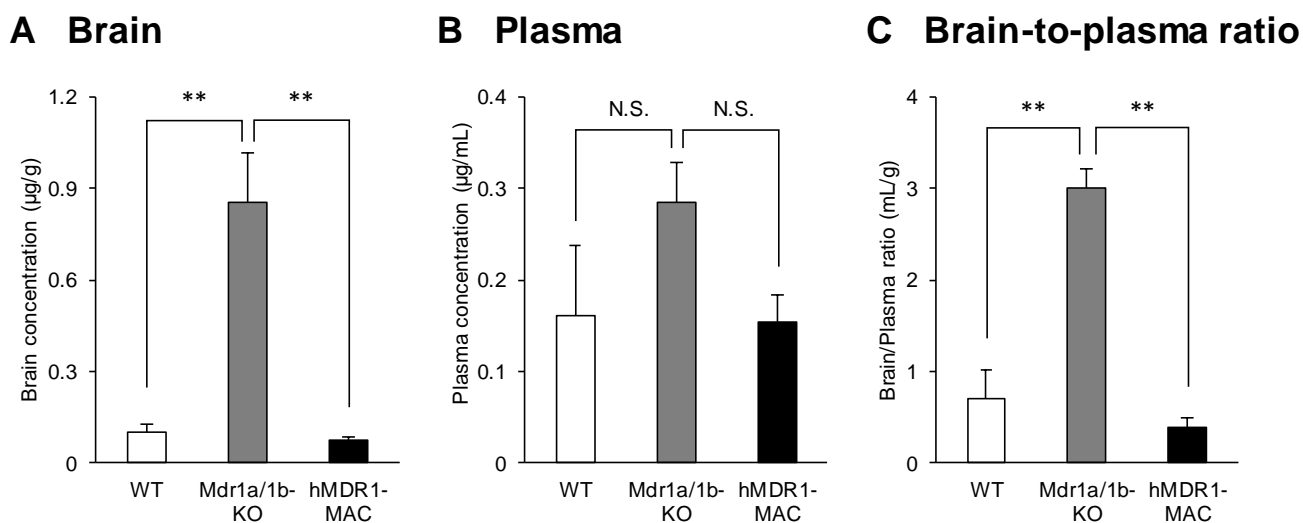


Fig. 2. Brain penetration of paclitaxel in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice. Brain concentrations (A), plasma concentrations (B) and brain-to-plasma ratios (C) of paclitaxel. Mice (n=3-4/group) were administered paclitaxel (10 mg/kg, i.v.) through the tail vein. Brains and plasma were collected at 4 hr after paclitaxel administration. Concentrations of paclitaxel in brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Data are shown as means \pm S.D. of three or four mice. ** $p < 0.01$ compared with Mdr1a/1b-KO mice. N.S., not significant.

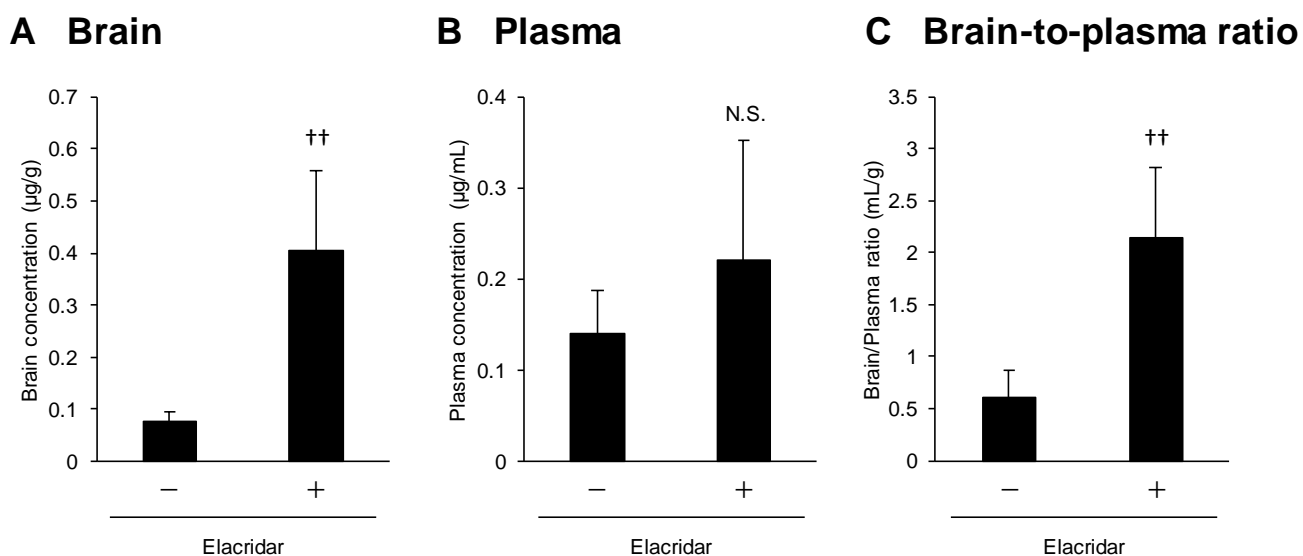


Fig. 3. Effect of elacridar on brain penetration of paclitaxel in hMDR1-MAC mice. Brain concentrations (A), plasma concentrations (B) and brain-to-plasma ratios (C) of paclitaxel. Mice (n=4/group) were administered a solvent (vehicle) or elacridar (50 mg/kg, p.o.). At 4 hr after administration of vehicle or elacridar, mice were administered paclitaxel (10 mg/kg, i.v.) through the tail vein. Brains and plasma were collected at 4 hr after paclitaxel administration. Concentrations of paclitaxel in brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Data are shown as means \pm S.D. of four mice. †† $p < 0.01$ compared with vehicle-treated mice. N.S., not significant.

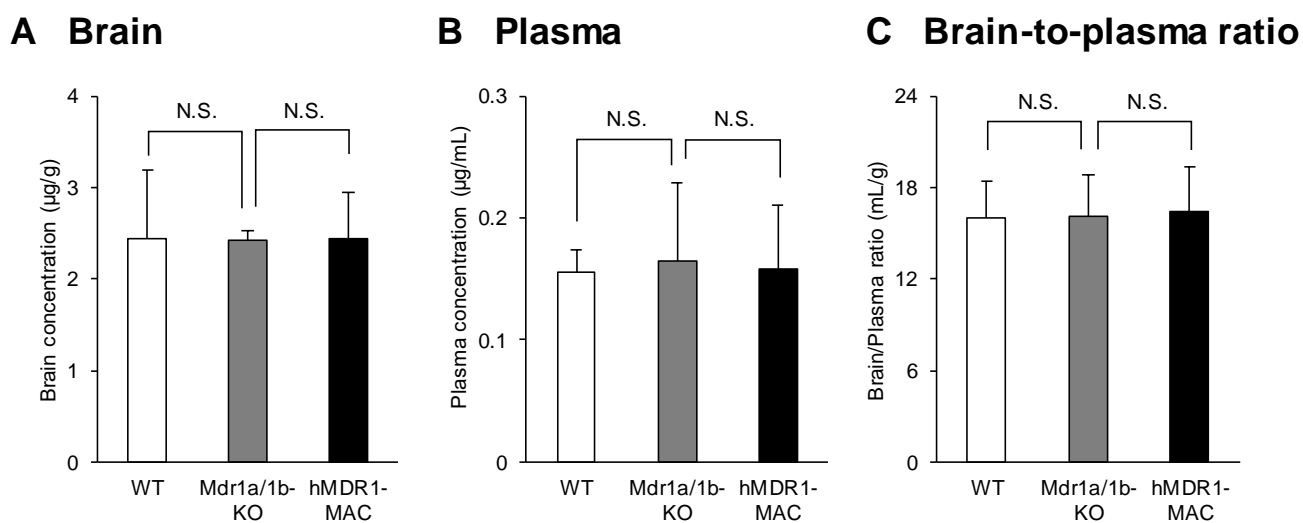


Fig. 4. Brain penetration of hydroxyzine in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice. Brain concentrations (A), plasma concentrations (B) and brain-to-plasma ratios (C) of hydroxyzine. Mice (n=3/group) were administered hydroxyzine hydrochloride (5 mg/kg, i.v.) through the tail vein. Brains and plasma were collected at 1 hr after hydroxyzine administration. Concentrations of hydroxyzine in brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Data are shown as means \pm S.D. of three mice. N.S., not significant.

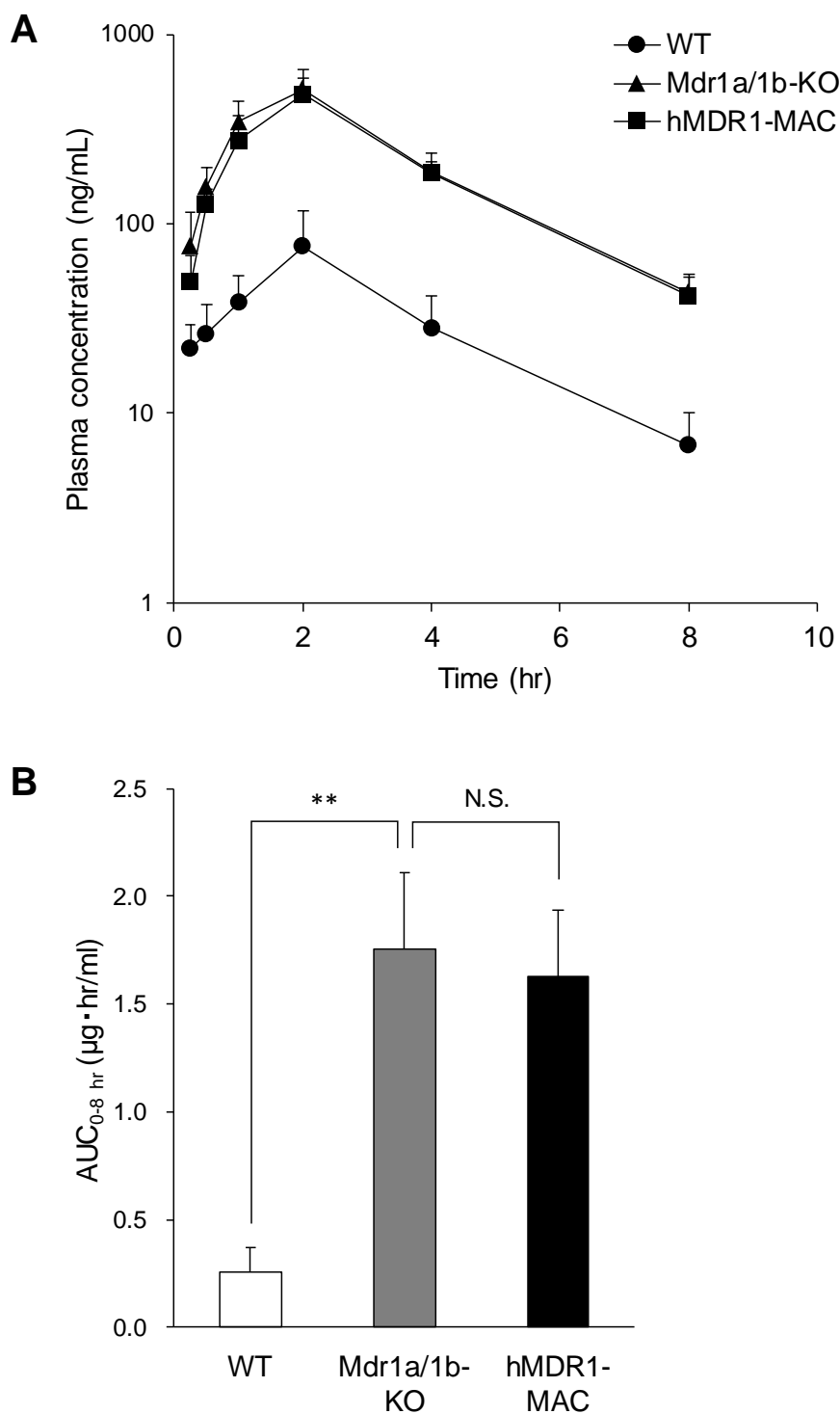


Fig. 5. Intestinal absorption of paclitaxel in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice. Plasma concentration-time curves (A) and AUC_{0-8 hr} (B) of paclitaxel. Mice (n=5/group) were administered paclitaxel (10 mg/kg, p.o.). Plasma were collected at 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 hr after paclitaxel administration. Concentration of paclitaxel in plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. The AUC_{0-8 hr} of paclitaxel were calculated using trapezoidal rule. Data are shown as means ± S.D. of five mice. ***p* < 0.01 compared with Mdr1a/1b-KO mice. N.S., not significant.

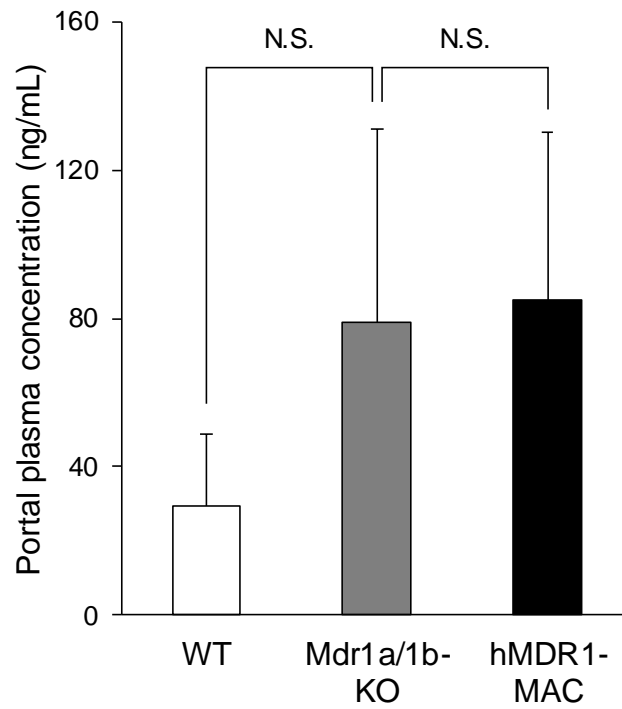


Fig. 6. Portal plasma concentration of paclitaxel at 5 min after oral administration of paclitaxel to WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice. Mice (n=6/group) were administered paclitaxel (10 mg/kg, p.o.). Portal plasma were collected at 5 min after paclitaxel administration. Concentrations of paclitaxel in portal plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Data are shown as means \pm S.D. of six mice. N.S., not significant.

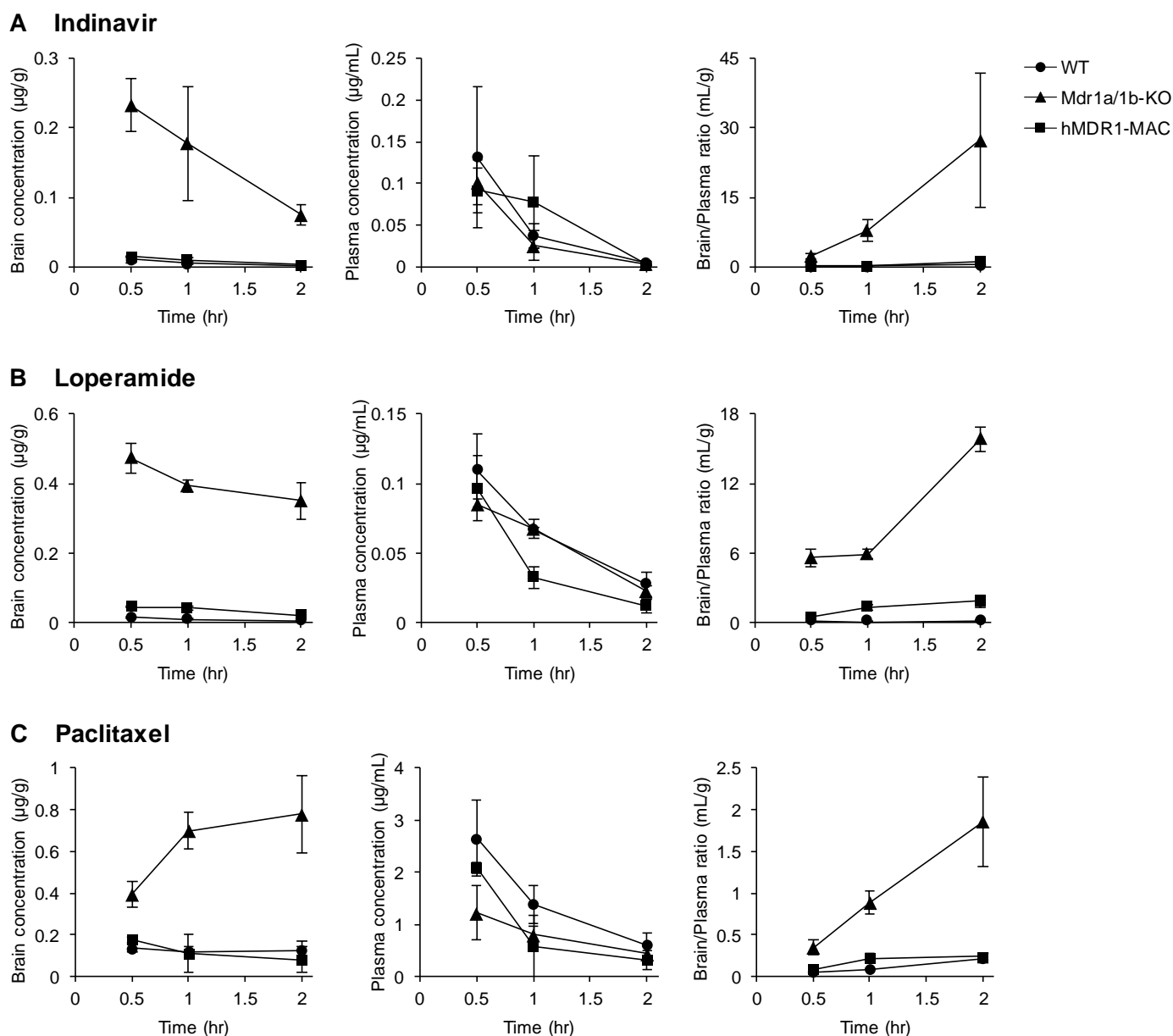
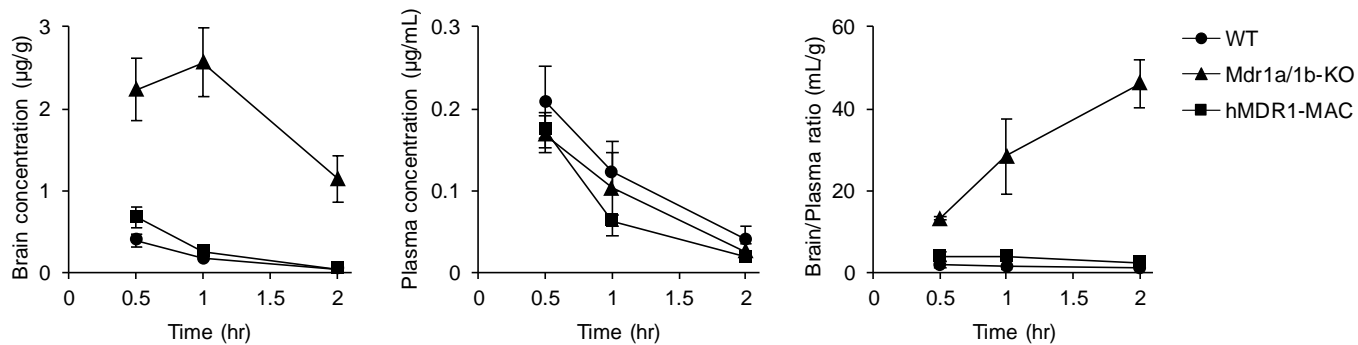
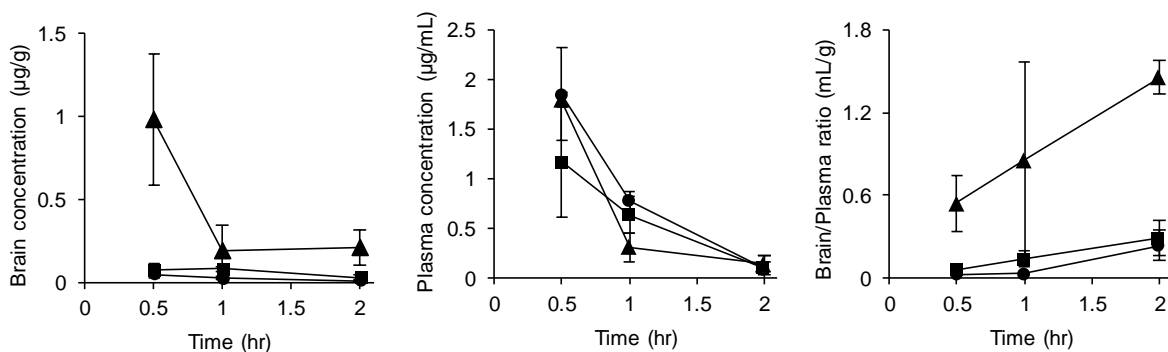


Fig. 7. Time profiles of brain and plasma concentrations and brain-to-plasma concentration ratios for seven P-gp substrates in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice. Mice (n=3-6/time point) were intravenously administered indinavir sulfate (5 mg/kg, A), loperamide hydrochloride (2 mg/kg, B), paclitaxel (10 mg/kg, C), quinidine sulfate (10 mg/kg, D), ritonavir (5 mg/kg, E), verapamil hydrochloride (1 mg/kg, F) or vinblastine sulfate (4 mg/kg, G) through the tail vein. Brains and plasma were collected at 0.5, 1 and 2 hr after the administration of each drug. Concentrations of drugs in brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Brain concentrations (left panels), plasma concentrations (middle panels) and brain-to-plasma ratios (right panels) of P-gp substrates. Data are shown as means \pm S.D. of three-six mice.

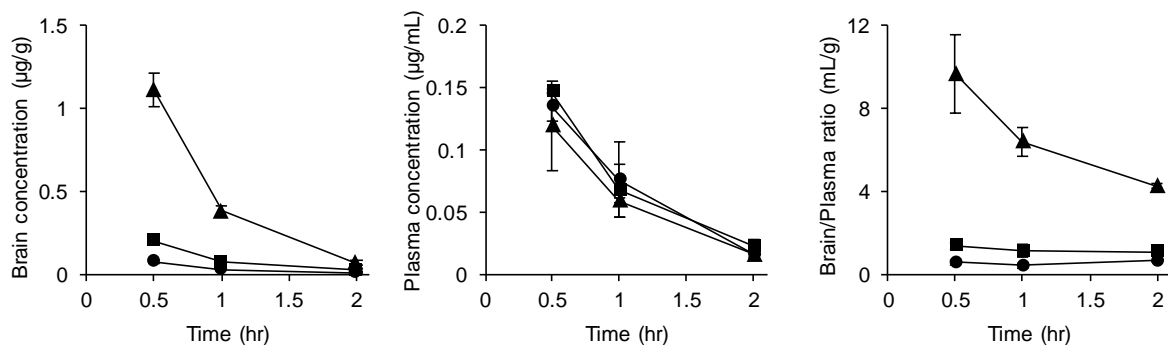
D Quinidine



E Ritonavir



F Verapamil



G Vinblastine

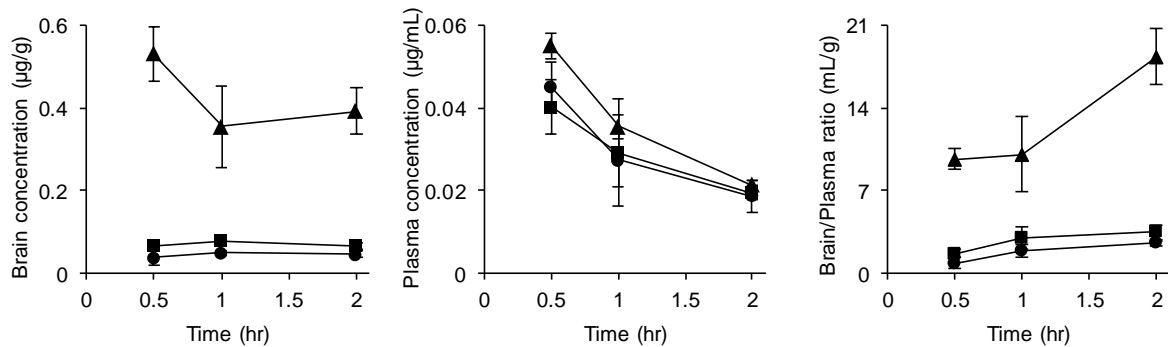


Fig. 7 (Continued).

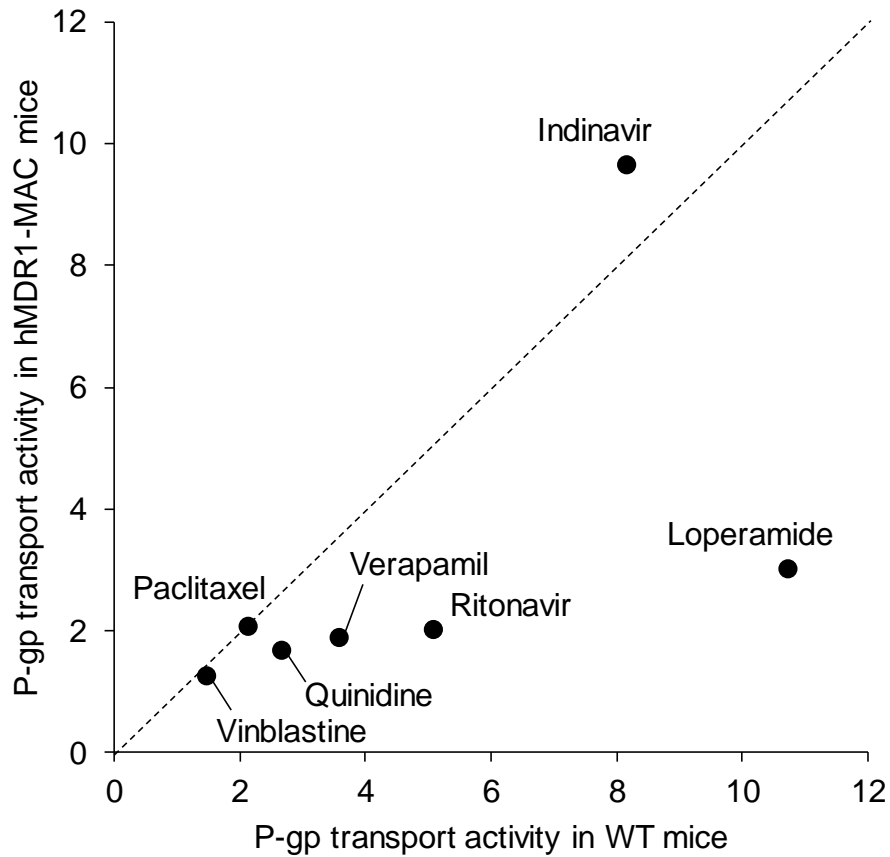


Fig. 8. Comparison of transport activity per P-gp molecule of seven P-gp substrates between WT and hMDR1-MAC mice. The transport activity per P-gp molecule was calculated as $[(K_{p,brain} \text{ ratio}) - 1] / [P\text{-gp protein expression levels in brain capillary of WT or hMDR1-MAC mice}]$. The data for P-gp protein expression levels and $K_{p,brain}$ ratio were taken from Tables 4 and 7. The solid line passing through the origin represents the line of identity.

Table 4. Protein expression levels of membrane proteins in isolated brain capillary fraction of WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice

Brain capillary fractions were prepared from pooled frozen brains of WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice (10 mice/group), and the protein expression levels were quantified by LC-MS/MS. The protein expression levels in four sets of transitions in one pooled sample from 10 mice were used to calculate the average (mean) and variability (S.E.M.), which are shown as means \pm S.E.M.

Molecular names	Protein expression level (fmol/ μ g protein)		
	WT	Mdr1a/1b-KO	hMDR1-MAC
Human MDR1 & Mouse Mdr1a ^a	5.15 \pm 0.62	ULQ (< 0.10)	2.21 \pm 0.19**
Human MDR1 ^b	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)	2.77 \pm 0.05
Mouse Mdr1a ^c	4.30 \pm 0.21	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)
Mouse Mdr1b	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)
Mrp4	0.54 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.89 \pm 0.02**
Bcrp	2.24 \pm 0.09	2.61 \pm 0.12	3.61 \pm 0.15**
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	66.75 \pm 3.41	153.18 \pm 6.63**	116.43 \pm 3.09**

ULQ, under the limit of quantification; peak area ratio was lower than the lowest point of the standard curve (0.5 fmol/5 μ g protein).

^a measured by using a peptide probe set common for human MDR1 and mouse Mdr1a.

^b measured by using a peptide probe set specific for human MDR1.

^c measured by using a peptide probe set specific for mouse Mdr1a.

** p < 0.01, significantly different from the protein expression amounts in brain capillaries isolated from WT mice.

Table 5. Protein expression levels of membrane proteins in the plasma membrane fraction of intestinal epithelial cells isolated from WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice

The plasma membrane fractions of intestinal epithelial cells were isolated from pooled small intestines of WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice (5 mice/group), and the protein expression levels were quantified by LC-MS/MS. The protein expression levels in four sets of transitions in three biological replicates were used to calculate the average (mean) and variability (S.E.M.), which are shown as means \pm S.E.M.

Molecular names	Protein expression level (fmol/ μ g protein)		
	WT	Mdr1a/1b-KO	hMDR1-MAC
Human MDR1 & Mouse Mdr1a ^a	4.57 \pm 0.14	ULQ (< 0.10)	0.13 \pm 0.02 ^{d**}
Human MDR1 ^b	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)	0.17 \pm 0.02 ^d
Mouse Mdr1a ^c	2.95 \pm 0.06	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)
Mouse Mdr1b	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)	ULQ (< 0.10)
Mrp4	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.01
Bcrp	7.37 \pm 0.18	7.79 \pm 0.18	7.13 \pm 0.43
Villin-1	18.29 \pm 0.34	12.52 \pm 0.19 ^{**}	20.47 \pm 0.40 ^{**}
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	264.16 \pm 12.14	210.85 \pm 9.14 ^{**}	245.93 \pm 10.60

ULQ, under the limit of quantification; peak area ratio was lower than the lowest point of the standard curve (0.5 fmol/5 μ g protein).

^a measured by using a peptide probe set common for human MDR1 and mouse Mdr1a.

^b measured by using a peptide probe set specific for human MDR1.

^c measured by using a peptide probe set specific for mouse Mdr1a.

^d the value was determined from 2-3 transitions, and the reliability was lower than that of other values.

^{**} $p < 0.01$, significantly different from the protein expression amounts in the plasma membrane fraction of intestinal epithelial cells isolated from WT mice.

Table 6. Time profiles of brain and plasma concentrations and brain-to-plasma concentration ratios for seven P-gp substrates in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice

Mice (n=3-6/time point) were intravenously administered indinavir sulfate (5 mg/kg), loperamide hydrochloride (2 mg/kg), 10 mg/kg paclitaxel (2 mg/kg), quinidine sulfate (10 mg/kg), ritonavir (5 mg/kg), verapamil hydrochloride (1 mg/kg) or vinblastine sulfate (4 mg/kg) through the tail vein. Brains and plasma were collected at 0.5, 1 and 2 hr after the administration of each drug. Concentrations of drugs in the brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Brain concentrations (ng/g), plasma concentrations (ng/mL) and brain-to-plasma ratios (mL/g) are shown as means \pm S.D. of three-six mice.

Substrate	WT	Mdr1a/1b-KO	hMDR1-MAC
Indinavir			
0.5 hr			
Brain	10.9 \pm 5.1**	233 \pm 38	14.6 \pm 0.9**
Plasma	132 \pm 85	101 \pm 27	91.7 \pm 26.9
Brain-to-plasma ratio	0.0904 \pm 0.0283**	2.37 \pm 0.51	0.169 \pm 0.052**
1 hr			
Brain	5.45 \pm 1.71*	178 \pm 82	9.86 \pm 4.44*
Plasma	37.5 \pm 14.7	25.6 \pm 18.4	78.2 \pm 55.0
Brain-to-plasma ratio	0.158 \pm 0.060**	7.94 \pm 2.38	0.182 \pm 0.120**
2 hr			
Brain	2.14 \pm 1.17**	74.9 \pm 15.0	3.50 \pm 1.66**
Plasma	4.82 \pm 2.08	3.32 \pm 1.65	2.96 \pm 0.60
Brain-to-plasma ratio	0.449 \pm 0.154*	27.4 \pm 14.5	1.15 \pm 0.33*
Loperamide			
0.5 hr			
Brain	15.5 \pm 0.9**	474 \pm 43	44.6 \pm 2.3**
Plasma	110 \pm 26	84.7 \pm 3.9	96.5 \pm 23.5
Brain-to-plasma ratio	0.147 \pm 0.039**	5.62 \pm 0.75	0.479 \pm 0.107**
1 hr			
Brain	9.42 \pm 2.34**	395 \pm 18	42.0 \pm 6.0**
Plasma	66.9 \pm 1.3	67.4 \pm 7.0	32.7 \pm 7.9**
Brain-to-plasma ratio	0.141 \pm 0.034**	5.88 \pm 0.41	1.31 \pm 0.20**
2 hr			
Brain	4.85 \pm 1.44**	350 \pm 53	20.3 \pm 2.9**
Plasma	27.5 \pm 8.7	22.3 \pm 4.7	11.9 \pm 4.8
Brain-to-plasma ratio	0.179 \pm 0.027**	15.8 \pm 1.1	1.83 \pm 0.55**

Paclitaxel			
0.5 hr			
Brain	134 ± 20**	396 ± 63	176 ± 15**
Plasma	2650 ± 730*	1220 ± 510	2080 ± 100
Brain-to-plasma ratio	0.0518 ± 0.0080**	0.349 ± 0.094	0.0843 ± 0.0053**
1 hr			
Brain	118 ± 25**	697 ± 88	109 ± 91**
Plasma	1380 ± 350	800 ± 152	576 ± 598
Brain-to-plasma ratio	0.0858 ± 0.0041**	0.884 ± 0.139	0.215 ± 0.060**
2 hr			
Brain	125 ± 42**	780 ± 186	80.1 ± 60.5**
Plasma	600 ± 235	441 ± 138	316 ± 184
Brain-to-plasma ratio	0.219 ± 0.059**	1.86 ± 0.53	0.237 ± 0.044**
Quinidine			
0.5 hr			
Brain	395 ± 75**	2230 ± 380	678 ± 133**
Plasma	208 ± 44	168 ± 22	174 ± 21
Brain-to-plasma ratio	1.97 ± 0.62**	13.2 ± 0.5	3.95 ± 1.00**
1 hr			
Brain	170 ± 16**	2560 ± 420	258 ± 26**
Plasma	123 ± 23	103 ± 57	63.4 ± 7.3
Brain-to-plasma ratio	1.44 ± 0.44**	28.3 ± 9.3	4.08 ± 0.34**
2 hr			
Brain	42.6 ± 6.9**	1150 ± 280	44.6 ± 0.7**
Plasma	40.3 ± 15.8	25.6 ± 9.4	19.3 ± 4.6
Brain-to-plasma ratio	1.12 ± 0.25**	46.2 ± 5.9	2.42 ± 0.69**
Ritonavir			
0.5 hr			
Brain	47.6 ± 8.4**	980 ± 397	73.9 ± 43.8**
Plasma	1850 ± 470	1800 ± 80	1170 ± 560
Brain-to-plasma ratio	0.0264 ± 0.0054**	0.541 ± 0.200	0.0626 ± 0.0287**
1 hr			
Brain	26.8 ± 1.9	192 ± 154	81.3 ± 15.3
Plasma	777 ± 92**	313 ± 145	636 ± 187*
Brain-to-plasma ratio	0.0351 ± 0.0069	0.858 ± 0.713	0.139 ± 0.059
2 hr			
Brain	11.5 ± 2.9**	212 ± 106	27.8 ± 15.6**
Plasma	97.7 ± 135.0	147 ± 74	104 ± 66

Brain-to-plasma ratio	0.239 ± 0.114**	1.45 ± 0.12	0.290 ± 0.127**
Verapamil			
0.5 hr			
Brain	74.6 ± 11.5**	1110 ± 100	201 ± 15**
Plasma	135 ± 12	119 ± 36	147 ± 2
Brain-to-plasma ratio	0.559 ± 0.128**	9.70 ± 1.91	1.37 ± 0.12**
1 hr			
Brain	30.0 ± 4.1**	380 ± 31	72.2 ± 5.5**
Plasma	76.0 ± 30.4	59.4 ± 2.2	67.7 ± 21.4
Brain-to-plasma ratio	0.421 ± 0.104**	6.41 ± 0.71	1.13 ± 0.30**
2 hr			
Brain	10.2 ± 1.34**	68.5 ± 16.3	24.1 ± 7.4**
Plasma	16.1 ± 2.8	16.2 ± 4.2	22.7 ± 5.8
Brain-to-plasma ratio	0.639 ± 0.030**	4.23 ± 0.11	1.07 ± 0.20**
Vinblastine			
0.5 hr			
Brain	38.2 ± 17.4**	531 ± 66	66.4 ± 6.6**
Plasma	45.0 ± 6.0	55.0 ± 3.0	40.2 ± 6.6*
Brain-to-plasma ratio	0.879 ± 0.482**	9.65 ± 0.85	1.68 ± 0.32**
1 hr			
Brain	48.9 ± 4.4**	354 ± 99	79.5 ± 5.7**
Plasma	27.4 ± 6.5	35.5 ± 2.8	29.2 ± 12.9
Brain-to-plasma ratio	1.87 ± 0.56**	10.1 ± 3.2	3.00 ± 0.95*
2 hr			
Brain	46.9 ± 8.3**	391 ± 56	67.0 ± 7.4**
Plasma	18.7 ± 4.0	21.4 ± 1.1	19.5 ± 1.7
Brain-to-plasma ratio	2.53 ± 0.21**	18.3 ± 2.4	3.47 ± 0.58**

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with Mdr1a/1b-KO mice.

Table 7. AUC_{plasma} (0-2 hr), AUC_{brain} (0-2 hr), K_{p,brain} and K_{p,brain} ratios of seven P-gp substrates in WT, Mdr1a/1b-KO and hMDR1-MAC mice

AUC_{plasma} (0-2 hr) and AUC_{brain} (0-2 hr) were calculated using the trapezoidal rule and are shown in ng/mL·hr and ng/g·hr, respectively. K_{p,brain} represents the ratio of AUC_{brain} (0-2 hr) to AUC_{plasma} (0-2 hr) and is shown in mL/g of the brain. K_{p,brain} ratio was determined as (K_{p,brain} in Mdr1a/1b-KO mice) / (K_{p,brain} in WT or hMDR1-MAC mice).

Substrate	WT	Mdr1a/1b-KO	hMDR1-MAC
Indinavir			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	188	141	224
AUC _{brain} (0-2 hr)	10.6	287	16.4
K _{p,brain}	0.0562	2.03	0.0735
K _{p,brain} ratio	36.2		27.7
Loperamide			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	162	141	119
AUC _{brain} (0-2 hr)	17.2	708	64.0
K _{p,brain}	0.107	5.03	0.539
K _{p,brain} ratio	47.2		9.33
Paclitaxel			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	3660	1840	2330
AUC _{brain} (0-2 hr)	218	1110	210
K _{p,brain}	0.0594	0.603	0.0900
K _{p,brain} ratio	10.2		6.70
Quinidine			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	307	258	223
AUC _{brain} (0-2 hr)	346	3610	555
K _{p,brain}	1.13	14.0	2.49
K _{p,brain} ratio	12.4		5.63
Ritonavir			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	2860	1860	1840
AUC _{brain} (0-2 hr)	49.7	740	112
K _{p,brain}	0.0174	0.397	0.0608
K _{p,brain} ratio	22.9		6.53
Verapamil			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	206	169	199

AUC _{brain} (0-2 hr)	64.9	876	167
K _{p,brain}	0.315	5.17	0.838
K _{p,brain} ratio	16.4		6.16
Vinblastine			
AUC _{plasma} (0-2 hr)	66.0	82.5	64.0
AUC _{brain} (0-2 hr)	79.2	727	126
K _{p,brain}	1.20	8.81	1.97
K _{p,brain} ratio	7.34		4.47

1.4 考察

第1章では、人工染色体 MAC ベクターを用いて、P-gp ヒト化マウス『hMDR1-MAC マウス』を作製した。MAC ベクターを用いることにより、宿主遺伝子を破壊することなく遺伝子導入をおこなうことが可能である。また、MAC ベクターは発現制御領域や非翻訳領域も搭載可能であり、一定のコピー数で安定に保持される性質を有することから、従来の遺伝子導入方法に比較して、より生理的条件下に近い遺伝子発現を再現できる (45, 46)。MAC ベクターのこれらの利点を活かし、hMDR1-MAC マウスでは、マウス内在性の遺伝子を破壊することなく、*hMDR1* 遺伝子の翻訳領域、非翻訳領域および発現制御領域を含む全 440 kb を導入している。Sadiq らは、*hMDR1* 遺伝子のノックインを試みているが、*hMDR1* 遺伝子の翻訳領域のみをコードしたプラスミドベクターを用いており、*hMDR1* 遺伝子の全長をヒト化したものではない (44)。したがって、本研究で樹立した hMDR1-MAC マウスは、*hMDR1* 遺伝子の非翻訳領域および発現制御領域を含む遺伝子全長のヒト化をおこなった初めての P-gp ヒト化マウスであると言える。

hMDR1-MAC マウスの各臓器において hMDR1 mRNA の発現が認められた (Fig. 1)。また、hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管には、マウス P-gp ではなくヒト P-gp タンパクの発現が認められたことから (Table 4)、hMDR1-MAC マウスに発現する P-gp は確かにヒト化されていることが示唆された。さらに、7 種類の P-gp 基質の中枢移行性を解析した結果、hMDR1-MAC マウスにおける各基質の脳-血漿濃度比は *Mdr1a/1b*-KO マウスに比較して有意に低値を示し (Figs. 2 および 7, Tables 6 および 7)、hMDR1-MAC マウスでは P-gp 基質となる薬物の中枢移行が抑制されることが示された。また、hMDR1-MAC マウスにおける paclitaxel の脳-血漿濃度比は、P-gp 阻害剤である elacridar の前処置により有意に増加したことから (Fig. 3)、hMDR1-MAC マウスにおける P-gp 基質の中枢移行抑制は、hMDR1-MAC ベクターにより導入されたヒト P-gp の機能によることが示唆された。一方、P-gp 非基質である hydroxyzine の中枢移行性については、WT, *Mdr1a/1b*-KO および hMDR1-MAC マウスの間で差異は認められなかった (Fig. 4)。これらのことから、hMDR1-MAC マウスの BBB には機能的なヒト P-gp が発現し、P-gp 基質の中枢移行を抑制していると考えられた。Sadiq らが作製した P-gp ヒト化マウスでは、BBB において機能的な P-gp の発現が認められず、また、マウス *Mdr1a* 遺伝子由来の P-gp タンパクが残存していることも示されている (44)。したがって、hMDR1-MAC マウスは、マウス内在性の P-gp を完全に欠損し、機能的なヒト P-gp を発現した初めての P-gp ヒト化マウスであるといえる。また、hMDR1-MAC マウスにおいて、P-gp 阻害剤による P-gp 基質の中枢移

行の増加が認められたことから (Fig. 3), 本マウスは中枢における P-gp の阻害を介した薬物間相互作用予測モデルとして有用であることが示唆された. 新薬開発の初期スクリーニングで実施される *in vitro* 実験において, 候補化合物が P-gp 阻害作用を示す場合にも, その IC₅₀ 値は臨床でのタンパク非結合形血中濃度よりもはるかに高い値を示すことが多いことから, 臨床では脳における P-gp の阻害はあまり考慮しなくてよいとされている (65). しかし, 臨床において, 脳 P-gp の阻害を介した薬物間相互作用が惹起される例も示されている (66-70). 薬物の中枢移行制御における P-gp 阻害の重要性についてはさらなる研究が必要であると考えられ, hMDR1-MAC マウスはその一助となることが期待される.

hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管におけるヒト P-gp タンパクの発現量は, WT マウスにおけるマウス P-gp タンパクの発現量と比較して有意に低値を示した (Table 4, 2.21 vs. 5.15 fmol/μg protein). この差異は, ヒトとマウスの脳毛細血管における P-gp タンパク発現量の差異とよく一致していたことから (21), hMDR1-MAC マウスはヒトにおける P-gp の発現特性を反映したモデル動物である可能性が示された. 一方, 膜タンパク質マーカーである Na⁺/K⁺-ATPase および ABC トランスポーターである Mrp4 および Bcrp の発現量は, WT マウスと比較して hMDR1-MAC マウスで高値を示したことから (Table 4), 今回調製した試料では, 両マウスの間で脳毛細血管画分の純度および均一性に差異があると考えられた. 脳毛細血管画分の純度および均一性が同等の試料で比較できれば, WT と hMDR1-MAC マウスの間での P-gp 発現量の差異はさらに大きくなると考えられる.

過去の報告において, ヒトの脳毛細血管における P-gp タンパク発現量の値は 6.06 および 3.98 fmol/μg of protein であることが示されている (21, 71). 今回の研究において定量した hMDR1-MAC マウスの脳毛細血管における P-gp タンパク発現量は 2.21 fmol/μg of protein であった (Table 4). これらの値は, LC-MS/MS による絶対定量法によって得られたものである. 本研究と過去の報告の間で脳毛細血管の純度と均一性が異なっているため, 単純に値を比較することはできないものの, どちらも絶対定量によって得られた値であることから, 脳毛細血管における P-gp タンパク質の発現は, ヒトと hMDR1-MAC マウスの間で少なくともオーダーレベルで同等であると考えられた.

hMDR1-MAC マウスにおける 7 種の P-gp 基質の K_{p,brain} は, いずれの薬物についても WT マウスに対して高値を示した (Table 7). このことは, P-gp 基質の中枢移行性が, WT マウスと比較して hMDR1-MAC マウスで高いことを示唆している. 放射性同位体でラベルした P-gp 基質を用いた試験により, P-gp 基質の中枢移行性はラットと比較してヒトおよびサルで高いことが報告されている (20). すなわち, WT と hMDR1-MAC マウスの間で認められた P-gp 基質の中枢移行性

の差異は、げっ歯類と霊長類の間の差異と一致する傾向が認められた。これらのことから、hMDR1-MAC マウスは、ヒト *in vivo* における P-gp 基質の薬物中枢移行性予測に有用なモデル動物である可能性が示された。

これまでに報告された P-gp 発現細胞株を用いた *in vitro* 試験系のデータでは、P-gp の基質認識性に種差があるか否かについて未だ統一した見解が得られていない (22, 26-28, 41)。そこで、P-gp 基質の $K_{p,brain}$ および脳毛細血管における P-gp タンパク発現量の値を用いて P-gp transport activity per molecule を算出し、WT および hMDR1-MAC マウスにおける P-gp の基質認識性を比較した (Fig. 8)。Paclitaxel および vinblastine は、WT および hMDR1-MAC マウスでほぼ同等の P-gp transport activity per molecule を示した。一方で、loperamide および ritonavir のように、hMDR1-MAC マウスに対して WT マウスで 2 倍以上の P-gp transport activity per molecule を示す薬物も存在した。これらのことから、ヒトとマウスの間で P-gp の基質認識性に差異があるとする報告と同様に (26-28)、WT および hMDR1-MAC マウスの間で P-gp の基質認識性に差異があることが示唆され、hMDR1-MAC マウスは P-gp の基質認識性に関するヒトとマウスの間の種差を明らかにするための *in vivo* モデルとしても有用である可能性が示された。P-gp 基質の中枢移行性は、P-gp の発現量および基質認識性のみならず、P-gp 以外のトランスポーター、薬物による P-gp の発現誘導、血漿および脳におけるタンパク結合率など、多くの要因によって制御される。P-gp の基質認識性の種差をより正確に解析するためには、WT および hMDR1-MAC マウスにおける P-gp 基質の中枢移行性に P-gp 以外の因子が与える影響について考慮する必要があると考えられる。

P-gp は、脳以外にも様々な組織に発現することが知られている。中でも、腸管の P-gp は、薬物の腸管吸収を抑制し、P-gp 基質のバイオアベイラビリティを規定することから、薬物の体内動態を評価するにあたって重要であるとされている (5-8)。そこで、hMDR1-MAC マウスの腸管の P-gp についても、その発現および機能解析をおこなった。hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分には、マウス P-gp ではなくヒト P-gp タンパクの発現が認められたことから (Table 5)、hMDR1-MAC マウスに発現する P-gp は確かにヒト化されていると考えられた。一方で、hMDR1-MAC マウスの小腸上皮細胞膜画分におけるヒト P-gp タンパクの発現量は、WT におけるマウス P-gp タンパクの発現量に比較して著しく低値を示した (Table 5, 0.13 vs. 4.57 fmol/ μ g protein)。経口投与した paclitaxel の AUC は、WT マウスでは Mdr1a/1b-KO マウスに対して有意に低値を示したのに対し、hMDR1-MAC と Mdr1a/1b-KO マウスの間で有意な差異は認められなかった (Fig. 5B)。また、経口投与 5 分後の paclitaxel の門脈血漿中濃度についても、WT マウスでは Mdr1a/1b-KO マウスに対して低値を示す傾向が認められたのに対し、

hMDR1-MAC マウスでは *Mdr1a/1b*-KO マウスとほぼ同等の値を示した (Fig. 6). これらのことから, hMDR1-MAC マウスの腸管における P-gp の発現量は, P-gp 基質の腸管吸収を抑制するには不十分であることが示唆された. hMDR1-MAC マウスの腸管において, P-gp タンパク発現量が低値を示す理由は明らかではない. しかし, hMDR1-MAC ベクターには核内受容体 PXR の応答配列が含まれており (29), マウス PXR のリガンドである pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) を hMDR1-MAC マウスに投与すると腸管の hMDR1 mRNA 発現量が増加することから (data not shown), hMDR1-MAC マウスの腸管において, 少なくとも PXR による *hMDR1* 遺伝子の発現制御は機能していると考えられる. 近年の研究により, マウスに与える食餌により P-gp の発現が変動することや, 種特異的な microRNA が遺伝子発現の種差に関与することが示唆されている (72, 73). これらの機構が hMDR1-MAC マウスの腸管 P-gp の発現に影響をおよぼしている可能性もある. 今後, hMDR1-MAC マウスの腸管においてヒト P-gp が低発現を示す原因を明らかにし, その発現を増加させることができれば, hMDR1-MAC マウスの有用性はさらに向上するものと期待される.

また, P-gp は, 肝臓, 腎臓および精巣にも発現し, 薬物の胆汁排泄および尿中排泄の促進, 精巣移行の抑制作用を担うことが明らかとなっている (5-8, 74). hMDR1-MAC マウスのこれらの組織においても hMDR1 mRNA の発現が認められたが (Fig. 1), タンパク発現および機能の解析には至っていない. hMDR1-MAC マウスの肝臓, 腎臓および精巣におけるヒト P-gp の発現および機能についても, 今後さらなる研究が必要である.

hMDR1 遺伝子には多数の一塩基多型 (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) が同定されている. これまでに, *hMDR1* 遺伝子の SNPs が P-gp の発現および機能, 薬物応答性および疾患感受性などの表現型に与える影響について多くの研究がなされてきた. しかし, *hMDR1* 遺伝子の SNPs の役割について, 未だ統一した知見は得られていない (8, 75, 76). *hMDR1* 遺伝子の SNPs の中でも, 特にタンパク翻訳領域に存在する 3 つの SNPs [rs1128503 (1236T > C, Gly412Gly), rs2032582 (2677T > G/A, Ser893Ala/Thr) および rs1045642 (3435T > C, Ile1145Ile)] については, 薬物の体内動態および疾患に与える影響について数多くの検討がなされているが, 明確な結論は得られていない. 本研究において, hMDR1-MAC ベクターに搭載した *hMDR1* 遺伝子におけるこれら 3 カ所の塩基配列は, いずれも野生型 (1236T/2677T/3435T) であった (data not shown). 最近, 香月らのグループは, cytochrome P450 (CYP) 3A5 遺伝子に SNPs を有する CYP3A ヒト化マウスを作製し, CYP3A5 の発現に対する SNPs の影響を *in vivo* で再現することに成功した (77, 78). CYP3A ヒト化マウスと同様に, *hMDR1* 遺伝子に SNPs を有す

る hMDR1-MAC マウスを作製することができれば、BBB におけるヒト P-gp の発現および機能に対する SNPs の影響を解明できると期待される。

P-gp 以外のトランスポーターおよび薬物代謝酵素についても、ヒトとマウスの間でその発現および機能に種差があることが示されている (22,79)。したがって、ヒト *in vivo* における薬物の体内動態を正確に予測するためには、P-gp のみをヒト化した hMDR1-MAC マウスの有用性は限定的である。一方で、搭載する遺伝子サイズに制限がないという MAC ベクターの特徴を利用することにより、この課題を解決できる可能性がある。すなわち、MAC ベクターに複数のトランスポーターおよび薬物代謝酵素の遺伝子を導入し、多くの因子を同時にヒト化することにより、ヒトとマウス間の種差の克服を目指すものである。ヒト *in vivo* における薬物の体内動態を正確に予測するためには、MAC ベクターおよび染色体工学技術を活用し、ヒト化マウスをさらに改良していく必要がある。

以上より、本章で作製した P-gp ヒト化マウス『hMDR1-MAC マウス』は、脳において機能的なヒト P-gp を発現する初めての P-gp ヒト化動物であり、ヒトとマウス間の P-gp の種差を克服したモデル動物であることが示された。また、hMDR1-MAC マウスは、P-gp 基質の中枢移行性の予測、P-gp 阻害による薬物間相互作用の予測および P-gp の種差の解明に有用である可能性が示された。

第 2 章

In vivo における P-gp の発現誘導

2.1 序文

PXR リガンドによる PXR の活性化は、MDR1 遺伝子の転写活性化を介して P-gp の発現を誘導する (10, 29). P-gp の発現誘導により P-gp 基質の体内動態が変化し、臨床的に重要な薬物間相互作用が惹起される例も報告されていることから (10, 30), PXR リガンドによる P-gp の発現誘導について明らかにすることは、ヒト *in vivo* における薬物の体内動態を予測する際に重要であると考えられている.

PXR リガンドの投与により、ヒトおよびげっ歯類の腸、肝臓および脳に発現する P-gp が *in vivo* で誘導されるか否かについては、これまでにいくつかの検討がなされてきた (30-38, 80-84). 特に小腸については、ヒトおよびげっ歯類を用いた複数の報告により、PXR リガンドの投与によって P-gp の発現誘導が惹起されることが明らかとなっている (30-38). また、ヒト *in vivo* において、PXR リガンドである rifampicin の経口投与により十二指腸の P-gp 発現が誘導され、P-gp 基質である digoxin の AUC およびバイオアベイラビリティが低下することも示されている (30). 一方、肝臓および脳については、P-gp の発現に対する PXR リガンド投与の影響をヒト *in vivo* において検討した報告は存在しない. ヒト PXR のトランスジェニックマウスに rifampicin を投与することで、肝臓および脳毛細血管の P-gp タンパクが増加することが示されているものの (81), 生理的条件下で発現する PXR の活性化により、肝臓および脳の P-gp の発現が誘導されるか否かは明らかでない. また、マウスおよびラットにおいては、PXR リガンドの投与により、肝臓および脳の P-gp 発現は誘導されるとする報告もある一方 (33, 80, 82), 誘導は認められないとする報告も存在し (33, 37, 80-84), 肝臓および脳における P-gp の発現が PXR リガンドの投与により誘導されるか否かについて統一した見解は得られていない. これらの報告で使用された PCN の投与量は、10 から 200 mg/kg と報告によって異なっていることから、PCN による P-gp の発現誘導作用に一致した知見が得られていない原因の一つとして、PCN 投与量の差異が考えられる. さらに、腸管において、P-gp は小腸だけでなく大腸においてもその発現が認められることが知られているが (37, 83, 85), PXR リガンドにより大腸の P-gp が発現誘導されるか否かについても、未だ明らかとなっていない.

そこで本研究では、マウスに PCN を投与し、PCN 投与がマウス腸管、肝臓および脳の Mdr1a/1b mRNA および P-gp タンパクの発現量におよぼす影響を解析した. PCN は、げっ歯類の PXR に対する代表的な PXR リガンドとして、多くの報告で用いられている薬物である (33-35, 37, 80, 82-84). 本研究では、PCN の用量を 100 もしくは 200 mg/kg に設定し、PXR の活性化に十分な用量の PCN を投与した際、各組織における P-gp の発現が誘導されるか否かを検討した. また、PCN の投与により、大脳皮質の P-gp タンパクの発現が誘導されることが示され

たことから、脳において P-gp の誘導を介した薬物間相互作用が惹起されるか否かについても検討をおこなった。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 試薬

PCN は Cayman Chemical より購入した。コーン油は和光純薬工業より購入した。Verapamil hydrochloride は 1.2.4.1 と同じものを用いた。その他の試薬については、市販のものを使用した。

2.2.2 実験動物

野生型マウス (C57BL/6, 8 週齢, 雄) は日本エスエルシー (静岡) より購入した。hMDR1-MAC マウス (14 週齢, 雄) は 1.2.1 で作製したものを用いた。本実験は千葉大学の動物実験委員会において承認され、実験動物の取り扱いガイドラインに従っておこなわれた。

2.2.3 誘導剤の投与

PCN 投与薬液はコーン油に 10 もしくは 20 mg/mL となるように懸濁したものを用いた。野生型マウス (n=4-5/群) に PCN (100 もしくは 200 mg/kg/day) もしくは vehicle としてコーン油を 1 日 1 回, 4 日間腹腔内投与した。薬液量は 10 mL/kg (マウス体重) とした。

2.2.4 臓器の摘出

PCN もしくはコーン油の最終投与から 24 時間後にマウスを頸椎脱臼し、腸管、肝臓および脳を摘出した。PCN もしくはコーン油の最終投与から臓器の摘出までの 24 時間は絶食とした。腸管は、胃の直下から肛門直前までの全長を摘出し、全長を計測した後に 5 等分した (segment 1-5, S1-5)。いずれのマウスにおいても、十二指腸および盲腸はそれぞれ S1 および S4 に含まれていた。すなわち、S1-3 および S4 の盲腸までは小腸、S4 の盲腸以下および S5 は大腸であると考えられた。5 等分したそれぞれのフラグメントのうち、各フラグメントの右端 3-4 mm を切除して total RNA の抽出に供した。また、S1, S3 および S5 のうち残った部分は、直ちに腸管上皮細胞の調製に供した。脳は摘出後、大脳縦裂に沿って中央から 2 分割し、得られた半球のうち一方を全脳とした。もう一方の半球は大脳皮質のみを分離した。各個体の臓器は、群ごとにプールし、液体窒素で凍結した後に -80°C で保存した。

2.2.5 mRNA 発現量の測定

各臓器からの cDNA の調製は、1.2.2 と同様の方法でおこなった。得られた

cDNA は超純水を用いて 20 ng/μL に希釈した。Mdr1a/1b mRNA 発現量は real-time PCR により測定した。cDNA 希釈液 (20 ng/μL) をテンプレートとし、Eco Real-time PCR System (Illumina, 東京) を用いて増幅産物の検出をおこなった。Mdr1a/1b mRNA の検出は, TaqMan Gene Expression Assays (Mdr1a, Mm00440761_m1; Mdr1b, Mm00440376_m1) および EagleTaq Master Mix with ROX (Roche) を用いてプロトコル通りおこなった。Mdr1a/1b の mRNA 発現量は, Mouse GAPD Endogenous Control (Thermo Fisher Scientific) をプローブとして GAPDH を測定した値により補正した。

PCN の効果のポジティブコントロールとして, PXR の標的遺伝子であり, PCN の投与により小腸および肝臓における発現量が増加することが明らかとなっている CYP3A11 (33, 86, 87) の発現量を測定した。PCN の投与により, 小腸および肝臓における CYP3A11 の mRNA 発現量は 4.2 から 15.9 倍に増加したことから (data not shown), 今回の PCN 投与条件において小腸および肝臓の PXR は活性化したと考えられた。

2.2.6 粗膜画分の調製およびタンパク発現量の測定

2.2.6.1 各組織における粗膜画分の調製

腸管, 肝臓および脳の各組織から, 以下の通り粗膜画分を調製した。各粗膜画分におけるタンパク濃度は DC protein assay kit を用いて測定した。

2.2.6.1.1 腸管上皮細胞粗膜画分の調製

S1, S3 および S5 からの腸管上皮細胞の単離は, Kazuki らの方法 (88) を一部改変しておこなった。各腸管フラグメントは, 切除後直ちに氷冷したステンレストレーに静置し, 氷冷した phosphate buffered saline (PBS) を用いて洗浄した。洗浄後, 各フラグメントを 1.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 3 U/mL ヘパリン, 0.5 mM dithiothreitol および 1% protease inhibitor cocktail (PIC, ナカライテスク) を含む氷冷 PBS (pH 7.2) 中に 20 分間浸した。次いで, カバーガラスを用いて腸管上皮細胞を剥ぎ取り, 2,000 g, 4°C で 10 分間遠心することにより, 沈殿として腸管上皮細胞を得た。各個体から単離した腸管上皮細胞は, 群ごとにプールし, 液体窒素で凍結した後に -80°C で保存した。

腸管上皮細胞における粗膜画分の調製は, Chow らの方法 (89) を一部改変しておこなった。50-100 mg の腸管フラグメントから得られた凍結腸管上皮細胞を 1 mL の 1% PIC 含有 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) でホモジナイズした後, 10 秒間超音波処理をおこなった。次いで, ホモジネートを 1,000 g, 4°C で 10 分間遠心し, 得られた上清を 21,000 g, 4°C で 1 時間超遠心した。超遠心後に得られた沈殿を 1%PIC 含有 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で再懸濁し, 腸管上皮細胞粗膜画分とした。

2.2.6.1.2 肝臓粗膜画分の調製

肝臓における粗膜画分の調製は、Chow らの方法 (89) を一部改変しておこなった。肝重量を測定し、6 倍量 (w/v) の crude membrane homogenizing buffer (250 mM スクロース, 10 mM HEPES, 10 mM Tris-base および 1% PIC 含有, pH 7.4) でホモジナイズした後, 10 秒間超音波処理をおこなった。次いで, ホモジネートを 10,500 g, 4°C で 10 分間遠心し, 得られた上清を 33,000 g, 4°C で 1 時間超遠心した。超遠心後に得られた沈殿を resuspension buffer (50 mM マンニトール, 20 mM HEPES, 20 mM Tris-base および 1% PIC 含有, pH 7.4) で再懸濁し, 肝臓粗膜画分とした。

2.2.6.1.3 脳粗膜画分の調製

脳における粗膜画分の調製は、Durk らの方法 (90) を一部改変しておこなった。脳重量を測定し, 5 倍量 (w/v) の crude membrane homogenizing buffer でホモジナイズした後, 10 秒間超音波処理をおこなった。次いで, ホモジネートを 3,000 g, 4°C で 10 分間遠心し, 得られた上清を 33,000 g, 4°C で 10 分間超遠心した。超遠心後に得られた沈殿を resuspension buffer で再懸濁し, 脳粗膜画分とした。

2.2.6.2 タンパク発現量の測定

各組織の粗膜画分における P-gp タンパク発現量は, Western blotting により解析した。粗膜画分における内部標準として, Na^+/K^+ -ATPase のタンパク発現量を解析した。各組織の粗膜画分 (20 μg protein/lane) を 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲルを用いて分離した後, タンク式ブロッキング装置を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。転写後の PVDF メンブレンは, 5% スキムミルクを加えた 0.05% polysorbate 20 含有 PBS を用いて, 室温で 1 時間振盪しブロッキングした。1 次抗体は monoclonal anti-P-gp mouse antibody (ALX-801-002-C100, Enzo Life Sciences, New York, NY, USA) もしくは monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase mouse antibody (Sigma-Aldrich) を Can Get Signal Solution 1 (東洋紡) で 1,000 倍に希釈したものを用い, それぞれ 4°C でオーバーナイトもしくは室温で 1 時間振盪した。2 次抗体は peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse IgG, Abcam, Cambridge, UK) を Can Get Signal Solution 1 (東洋紡) で 5,000 倍に希釈したものを用い, 室温で 1 時間振盪した。検出には ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Menlo Park, CA, USA), ImmunoStar LD (和光) および LAS-4000 (富士フイルム) を使用した。

2.2.7 誘導剤投与による薬物間相互作用の解析

2.2.7.1 誘導剤および P-gp 基質の投与

hMDR1-MAC マウス (n=2-4/time point) に PCN (200 mg/kg/day) もしくは vehicle としてコーン油を 1 日 1 回, 4 日間腹腔内投与した。投与薬液および薬液

量は 2.2.3 と同様の条件を用いた。

PCN もしくはコーン油の最終投与から 16 時間後に, verapamil hydrochloride (2 mg/kg) を尾静脈内投与した。投与薬液および薬液量は 1.2.4.2 および 1.2.4.3 と同様の条件を用いた。また, PCN もしくはコーン油の最終投与から P-gp 基質 verapamil の投与までの約 16 時間は絶食とした。Verapamil の尾静脈内投与から 0.5, 1 および 2 時間後にマウスを頸椎脱臼し, 1.2.4.3 と同様の方法で血漿および脳ホモジネートを調製した。

2.2.7.2 測定試料の調製

1.5 mL ポリプロピレンチューブに血漿もしくは脳ホモジネート 40 μ L を添加した。次いで, 内部標準物質 ritonavir を含む 0.1%ギ酸水溶液 : 0.1%ギ酸アセトニトリル (3:2, v/v) を 360 μ L 添加し, 激しく攪拌した後, 20,400 g, 4°C で 15 分間遠心して除タンパクした。得られた上清を 0.45 μ m PTFE フィルターでろ過し, ろ液を LC-MS/MS 測定試料とした。検量線用試料は, サンプルのかわりに未処置のマウス血漿もしくは脳ホモジネートを用い, 各薬物を定量範囲内で添加した以外は, 測定試料と同様の処理により調製した。

2.2.7.3 LC-MS/MS による分析

2.2.7.2 で調製した測定試料を LC-MS/MS を用いて分析することにより, 血漿および脳における verapamil 濃度を定量した。分析には LC-20AD Prominence HPLC ポンプ, SIL-20ACHT オートサンプラーおよび QTRAP4500 を用いた。イオン化モードは ESI positive とし, MRM モードで測定をおこなった。カラムは COSMOSIL 3C₁₈-MS-II Packed Column 2.0 \times 50 mm, 3 μ m を使用した。カラムオーブンの温度は 40°C, 流速は 0.6 mL/分とした。移動相は溶離液 A (0.1%ギ酸水溶液) と溶離液 B (0.1%ギ酸アセトニトリル) の混合溶媒を用いた。グラジエント条件は 0~1 分を 20%溶離液 B, 1~1.9 分を 20~90%溶離液 B の直線グラジエント, 1.9~4.9 分を 90%溶離液 B, 4.91~6.2 分を 20%溶離液 B とした。注入量は 3 μ L とし, 化合物の検出および定量は, verapamil について m/z 455.2 \rightarrow m/z 165.1 を, 内部標準物質である ritonavir について m/z 721.3 \rightarrow m/z 268.1 をモニターすることによりおこなった。

得られたデータは MultiQuant を用いて解析し, 内部標準物質に対する測定化合物のピーク面積比を算出した。検量線は検量線用試料の各濃度に対するピーク面積比をプロットし, 重み付き最小二乗法により回帰して得た。

2.2.8 統計解析

データは平均 \pm 標準偏差として示した。統計解析は 1.2.8 と同様の方法でおこなった。

2.3 結果

2.3.1 腸管の Mdr1a/1b mRNA および P-gp タンパク発現量に対する PCN 投与の影響

Fig. 9A に、各群のマウスの腸管における Mdr1a mRNA の発現量を示した。S1, S2, S3, S4 および S5 の各フラグメントにおける Mdr1a mRNA の発現量は、100 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 群に対していずれも有意に高値を示し、その誘導倍率は順に 1.9, 2.1, 2.7, 2.8 および 3.3 倍であった。同様に、200 mg/kg の PCN 投与群も vehicle 群に対して有意に高い Mdr1a mRNA 発現量を示し、その誘導倍率は順に 2.4, 2.3, 2.6, 2.8 および 4.1 倍であった。Fig. 9B に示したように、各フラグメントにおける Mdr1b mRNA の発現量も、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 群に対して有意に高値を示した。100 mg/kg の PCN 投与による誘導倍率は S1, S2, S3, S4 および S5 の順に 1.4, 1.2, 3.6, 1.9 および 1.5 倍、200 mg/kg の PCN 投与による誘導倍率は 1.6, 2.1, 2.4, 3.5 および 1.8 倍であった。

Fig. 10 に、各群のマウスの腸管における P-gp タンパクの発現量を示した。各フラグメントにおける P-gp タンパクの発現量は、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 群に比較して有意に高値を示した。100 mg/kg の PCN 投与による誘導倍率は S1, S3 および S5 の順に 2.3, 3.7 および 7.3 倍、200 mg/kg の PCN 投与による誘導倍率は 1.7, 3.7 および 4.2 倍であった。

PCN 投与による Mdr1a mRNA および P-gp タンパクの発現量の誘導倍率は、腸管上部に比較して腸管下部で高値を示す傾向が認められた。

2.3.2 肝臓の Mdr1a/1b mRNA および P-gp タンパク発現量に対する PCN 投与の影響

Figs. 11A および 11B に、各群のマウスの肝臓における Mdr1a および Mdr1b mRNA の発現量を示した。Mdr1a mRNA の発現量は、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対してそれぞれ 5.0 および 5.2 倍と有意に高値を示した。また、Mdr1b mRNA の発現量も、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対してそれぞれ 1.4 および 1.2 倍と有意に高値を示した。一方、Fig. 12 に示したように、肝臓における P-gp タンパクの発現量については vehicle 投与群と PCN 投与群の間で有意な差異は認められなかった。

2.3.3 脳の Mdr1a/1b mRNA および P-gp タンパク発現量に対する PCN 投与の影響

Fig. 13A に、各群のマウスの脳における Mdr1a mRNA の発現量を示した。大脳皮質における Mdr1a mRNA の発現量は、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対してそれぞれ 1.2 および 1.7 倍と有意に高値を示した。全脳における Mdr1a mRNA の発現量も、200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対して 1.2 倍と有意に高値を示したが、100 mg/kg の PCN 投与群では、vehicle 投与群との間に有意な差異は認められなかった。

Fig. 13B に、各群のマウスの脳における Mdr1b mRNA の発現量を示した。大脳皮質における Mdr1b mRNA の発現量は、100 および 200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対して 1.4 および 1.2 倍と有意に高値を示した。一方、全脳における Mdr1b mRNA の発現量は、200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対して 1.4 倍と有意に高値を示したものの、100 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群との間に有意な差異は認められなかった。

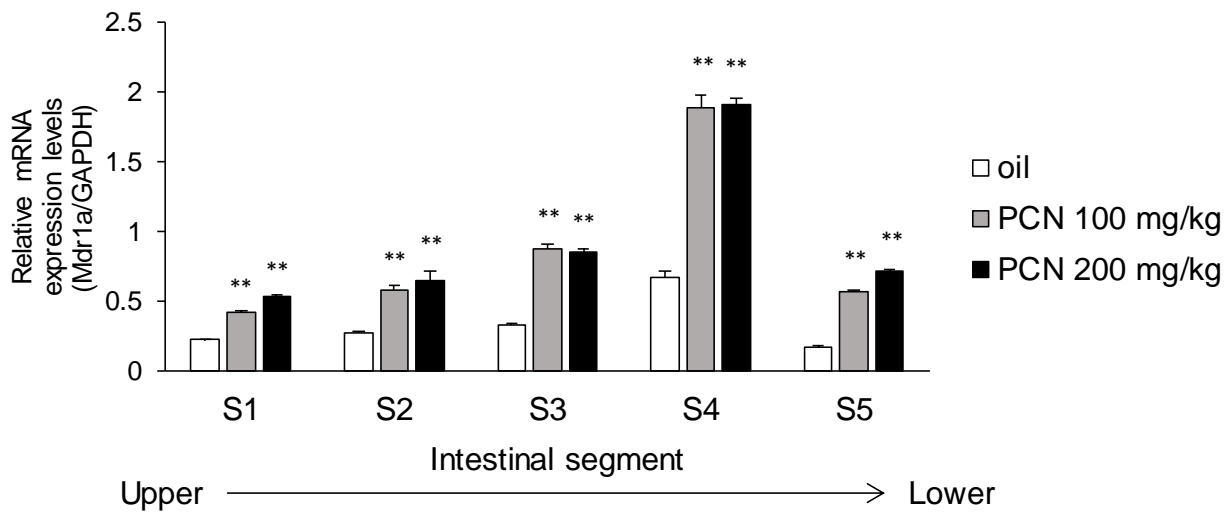
Fig. 14 に、各群のマウスの脳における P-gp タンパクの発現量を示した。大脳皮質における P-gp タンパクの発現量は、200 mg/kg の PCN 投与群では vehicle 投与群に対して 2.0 倍と有意に高値を示した。一方、100 mg/kg の PCN 投与群と vehicle 投与群との間で、大脳皮質における P-gp タンパクの発現量に有意な差異は認められなかった。また、全脳における P-gp タンパクの発現量については、PCN 投与量によらず vehicle 投与群と PCN 投与群の間に有意な差異は認められなかった。

2.3.4 Verapamil の中枢移行に対する PCN 投与の影響

WT マウスにおいて、200 mg/kg の PCN 投与により、大脳皮質における P-gp タンパク発現量が増加することが示された (Fig. 14)。そこで、同量の PCN 投与により P-gp 基質である verapamil の中枢移行性が影響を受けるか否かを hMDR1-MAC マウスを用いて検討した。

Fig. 15A に示したように、投与 0.5 時間後の verapamil の脳内濃度は、vehicle 投与群に対して PCN 投与群で有意に低値を示した。また、投与 1 および 2 時間後においても、verapamil の脳内濃度は vehicle 投与群に対して PCN 投与群で低値を示す傾向が認められた。一方、verapamil の血漿中濃度は、vehicle 投与群に対して PCN 投与群で低値を示す傾向が認められたものの、いずれの点においても、vehicle 投与群と PCN 投与群の間に有意な差異は認められなかった (Fig. 15B)。さらに、投与 0.5 時間後の verapamil の脳-血漿濃度比は、vehicle 投与群に対して PCN 投与群で有意に低値を示した (Fig. 15C)。また、投与 1 および 2 時間後においても、verapamil の脳-血漿濃度比は vehicle 投与群に対して PCN 投与群で低値を示す傾向が認められた (Fig. 15C)。

A Mdr1a



B Mdr1b

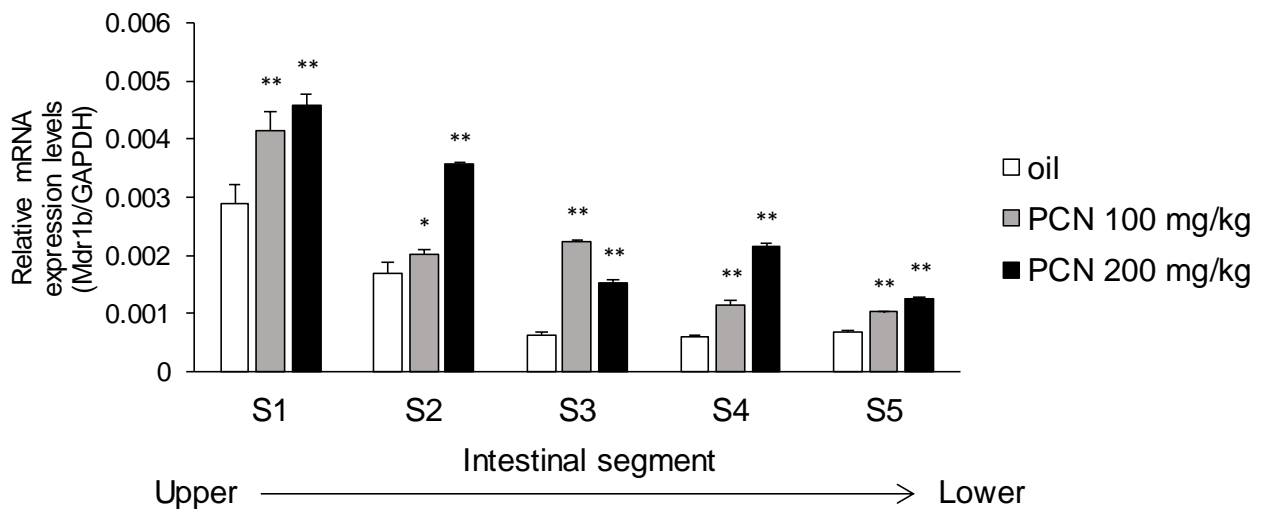


Fig. 9. Effect of PCN on the expression of Mdr1a/1b mRNA in the intestine of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The intestine of each mouse was collected at 24 h after the final administration and divided into five segments of equal lengths (S1-5) as described in Materials and Methods. The expression levels of Mdr1a (A) and Mdr1b (B) mRNA in the intestine were determined by real-time PCR and normalized by those of GAPDH. Data are shown as means \pm S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated mice.

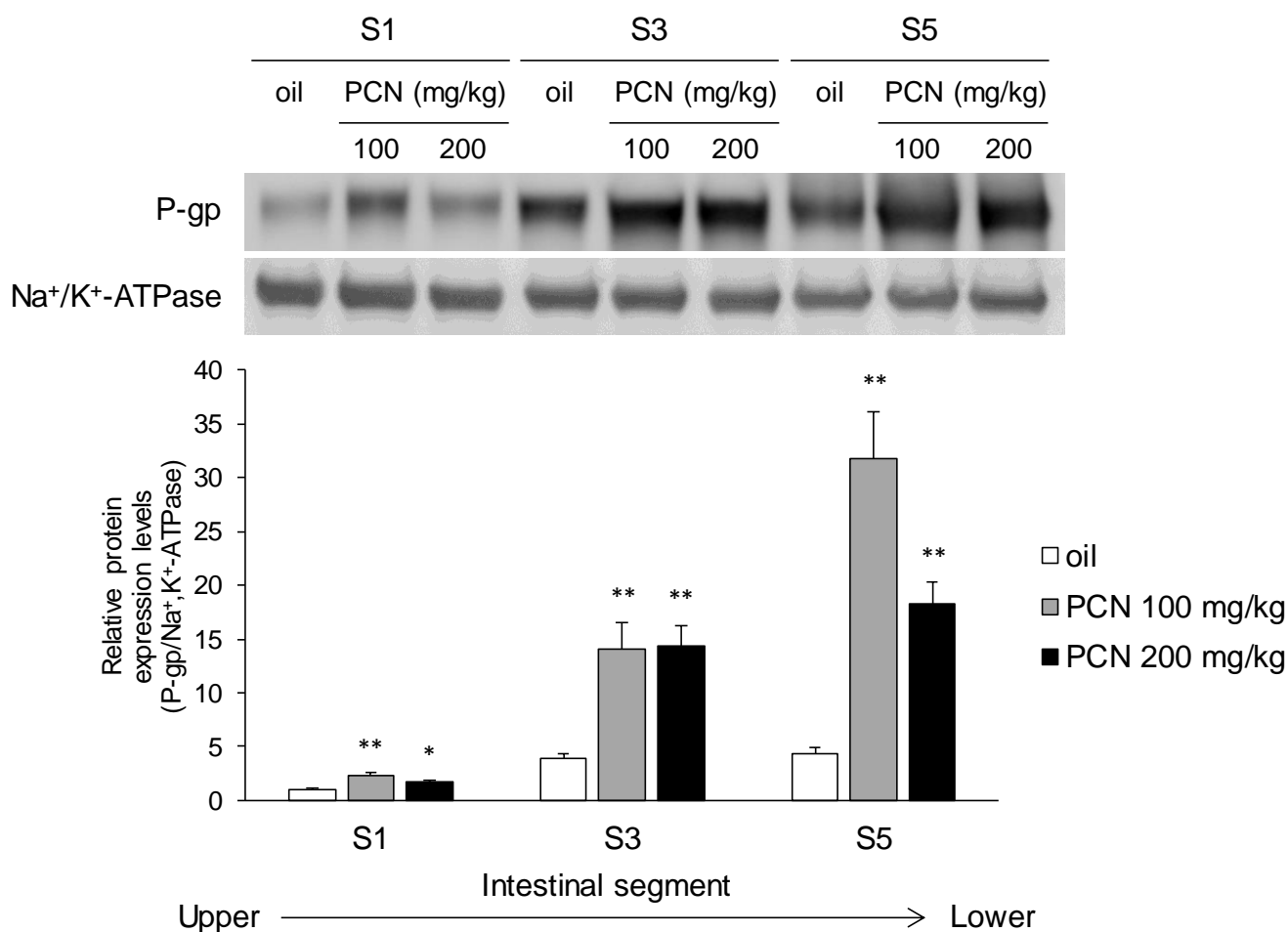


Fig. 10. Effect of PCN on the expression of P-gp protein in the intestine of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The intestine of each mouse was collected at 24 h after the final administration and divided into five segments of equal lengths (S1-5) as described in Materials and Methods. The crude membrane fractions prepared from S1, S3 and S5 were subjected to Western blot analysis using an anti-P-gp antibody. The expression levels of P-gp protein were normalized by those of Na⁺/K⁺-ATPase. Data are shown as means ± S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared with vehicle-treated mice.

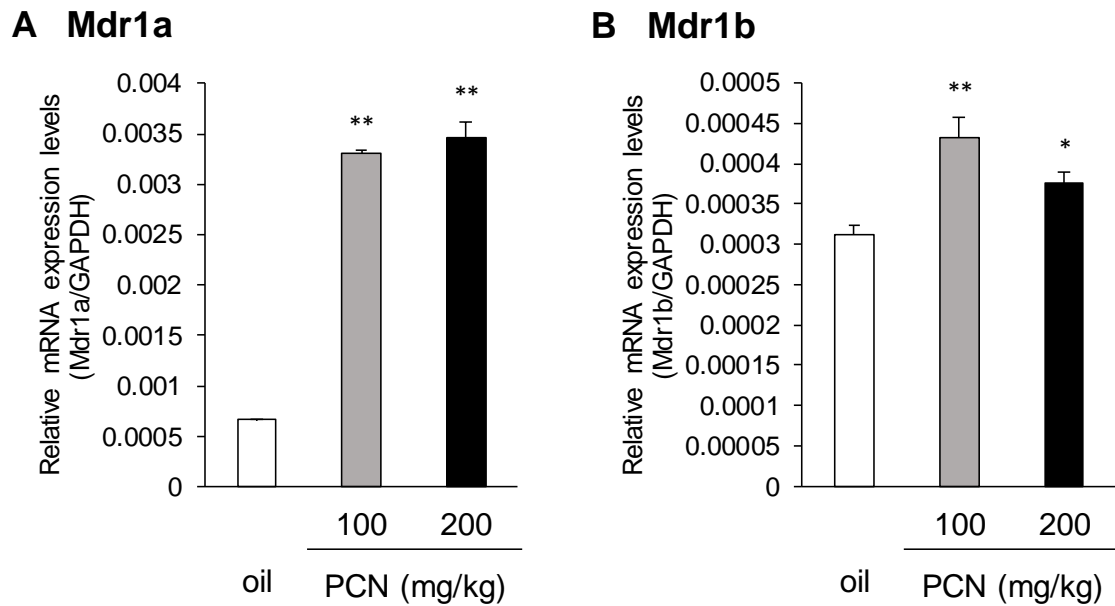


Fig. 11. Effect of PCN on the expression of Mdr1a/1b mRNA in the liver of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The tissues were collected at 24 h after the final administration. The expression levels of Mdr1a (A) and Mdr1b (B) mRNA in the liver were determined by real-time PCR and normalized by those of GAPDH. Data are shown as means \pm S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated mice.

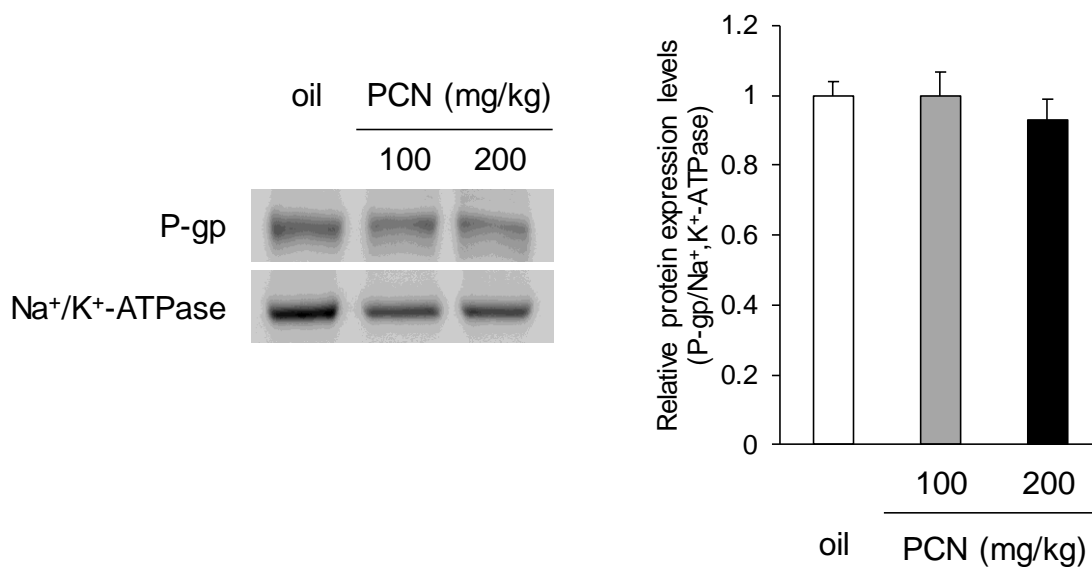


Fig. 12. Effect of PCN on the expression of P-gp protein in the liver of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The tissues were collected at 24 h after the final administration. The crude membrane fraction prepared from the liver was subjected to Western blot analysis using an anti-P-gp antibody. The expression levels of P-gp protein were normalized by those of Na⁺/K⁺-ATPase. Data are shown as means \pm S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate.

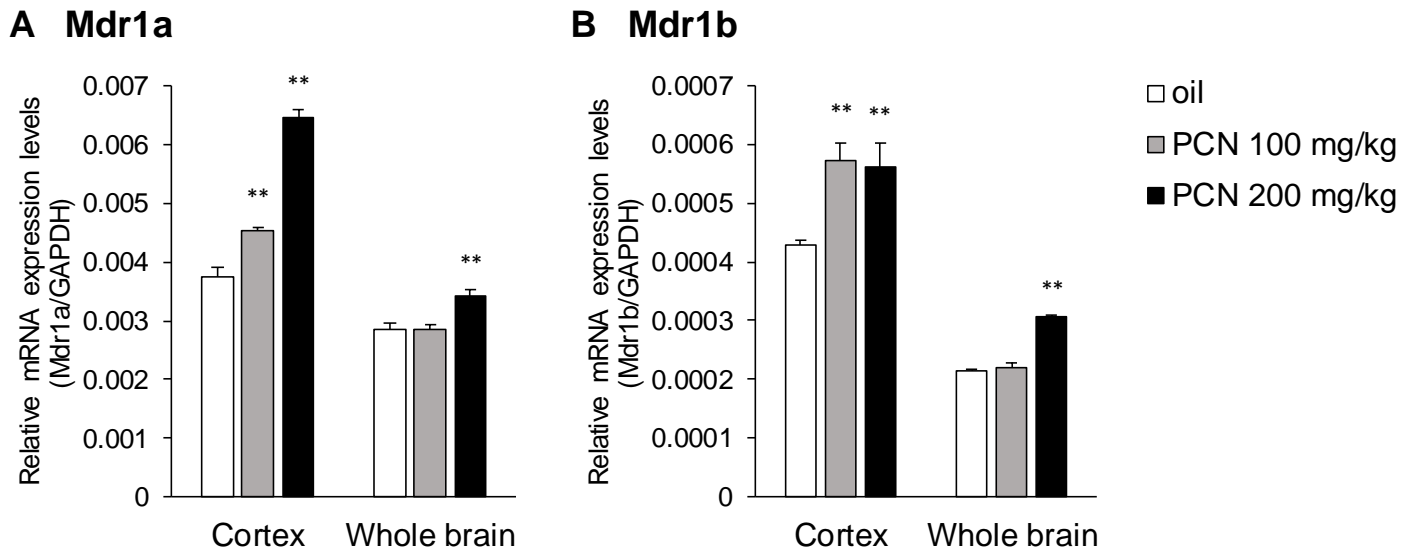


Fig. 13. Effect of PCN on the expression of Mdr1a/1b mRNA in the brain of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The tissues were collected at 24 h after the final administration. The expression levels of Mdr1a (A) and Mdr1b (B) mRNA in the cortex and whole brain were determined by real-time PCR and normalized by those of GAPDH. Data are shown as means \pm S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate. ** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated mice.

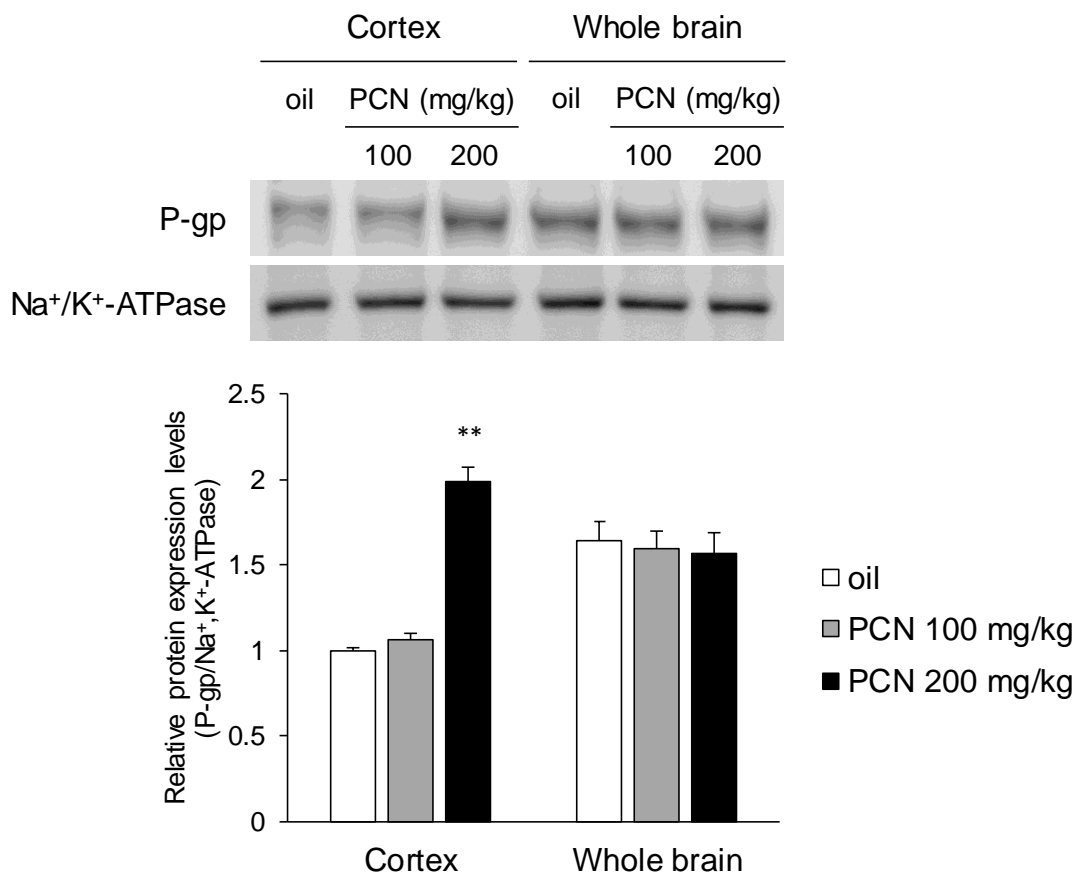


Fig. 14. Effect of PCN on the expression of P-gp protein in the brain of WT mice. Mice were intraperitoneally treated with corn oil (vehicle control) or PCN (100 or 200 mg/kg/day) for 4 days. The tissues were collected at 24 h after the final administration. Crude membrane fractions prepared from the cortex and whole brain were subjected to Western blot analysis using an anti-P-gp antibody. The expression levels of P-gp protein were normalized by those of Na⁺/K⁺-ATPase. Data are shown as means \pm S.D. of three different determinations, each undertaken in duplicate. ** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated mice.

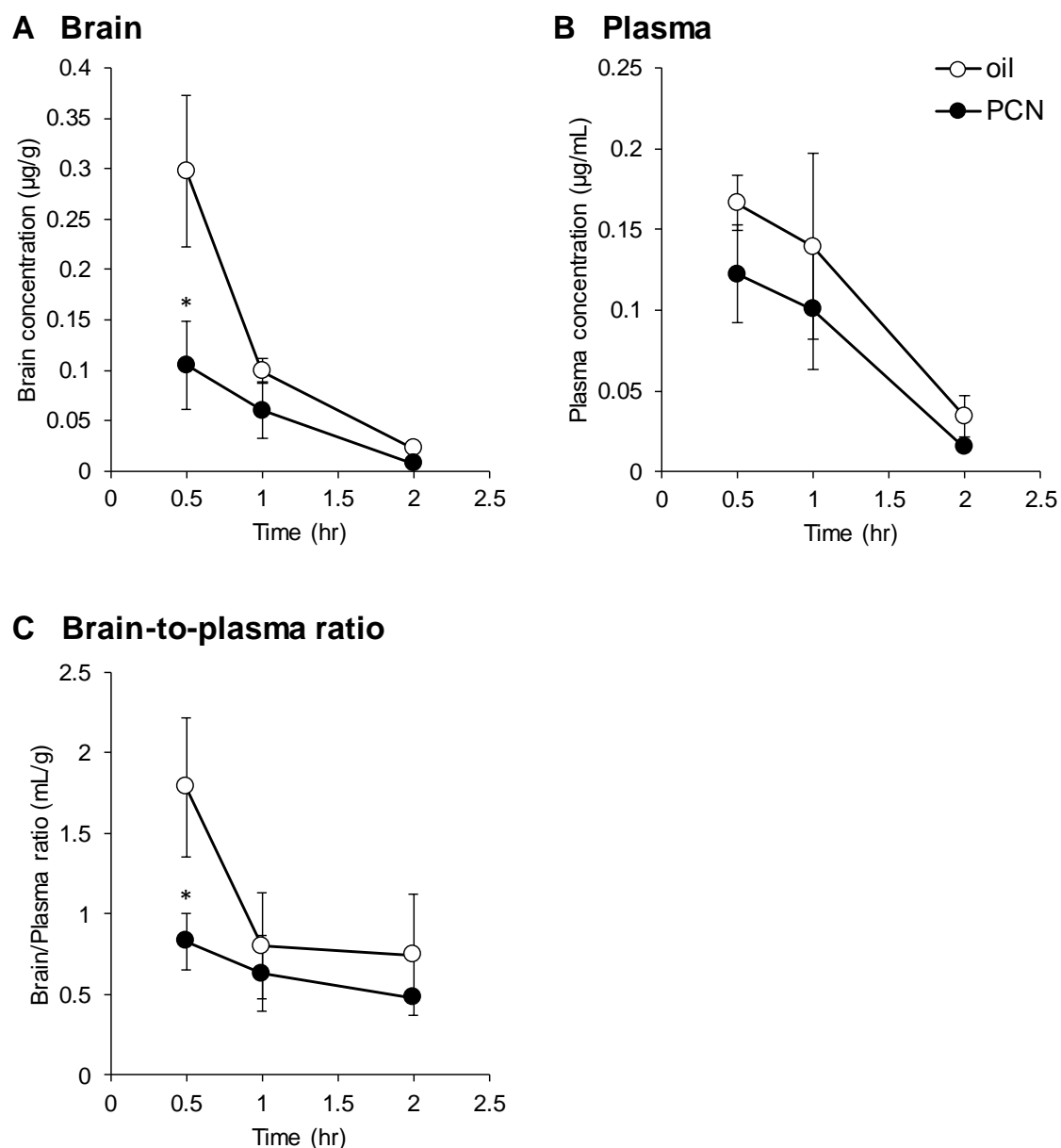


Fig. 15. Effect of PCN on brain penetration of verapamil in hMDR1-MAC mice. Effect of PCN on time profiles of brain (A) and plasma (B) concentrations and brain-to-plasma concentration ratios (C) of verapamil. hMDR1-MAC mice (n=2-4/time point) were intraperitoneally pre-treated with corn oil (vehicle control) or PCN (200 mg/kg/day) for 4 days, and intravenously administered verapamil hydrochloride (2 mg/kg) through the tail vein at 24 h after the final treatment with corn oil or PCN. Brains and plasma were collected at 0.5, 1 and 2 hr after the administration of verapamil. Concentrations of verapamil in brains and plasma were determined by LC-MS/MS, each performed in duplicate. Data are shown as means \pm S.D. of three-six mice. * $p < 0.05$ compared with vehicle-treated mice.

2.4 考察

第2章では、腸管、肝臓および脳の *Mdr1a/1b* mRNA および P-gp タンパクの発現量に対する PCN 投与の影響を検討した。100 もしくは 200 mg/kg の PCN の投与により、*Mdr1a/1b* mRNA の発現量は検討した全ての組織において増加した (Table 8)。よって、200 mg/kg の PCN は、PXR を活性化し、マウス *Mdr1a/1b* 遺伝子の転写を活性化するにあたって十分な用量であると考えられた。一方、200 mg/kg の PCN の投与により、腸管および脳における P-gp タンパク発現量は有意に増加したのに対し、肝臓においては有意な変化は認められなかった (Table 8)。これらのことから、P-gp タンパクの発現に対する PCN の効果は組織によって異なることが示唆された。

小腸 (S1-4) における *Mdr1a/1b* mRNA および P-gp タンパクの発現量は、PCN の投与により、全てのフラグメントにおいて増加することが示された (Figs. 9 および 10)。過去の報告において、マウス、ラットおよびヒトの小腸における P-gp の発現は PXR リガンドの投与によって誘導されることが示されていることから (30-38)、PXR リガンドによる小腸 P-gp の誘導は、げっ歯類およびヒトの双方で認められる共通の現象であると考えられた。また、大腸 (S5) においても、PCN の投与により、*Mdr1a/1b* mRNA および P-gp タンパクの双方の発現量が増加することが示された (Figs. 9 および 10)。これまでに、大腸の P-gp 発現に対する PXR リガンドの効果について明らかにした報告は存在しないことから、本研究は PCN が大腸の P-gp 発現を誘導し得ることを示した初めての報告であると考えられる。PXR リガンドの投与による大腸 P-gp の発現誘導が、どのような生理学的意義を持つかについては未だ明らかでない。しかし、PXR リガンドによる大腸 P-gp の発現誘導は、薬物動態学的に重要な意味を持つと考えられる。例えば、薬物の直腸投与は、初回通過効果を回避し、薬物を速やかに全身循環に到達させる方法として、小児や消化管の運動障害を呈する患者に多用されている。すなわち、PXR リガンドによる大腸 P-gp の発現誘導は、直腸投与された P-gp 基質を糞便中に排泄し、P-gp 基質のバイオアベイラビリティを低下させることが予想される。大腸において、このような薬物間相互作用が実際に起こり得るかについてはさらなる研究が必要であるものの、PXR リガンドによる大腸 P-gp の発現誘導は、大腸において吸収される P-gp 基質の体内動態に影響を与える可能性が高いと考えられる。

腸管において、PXR mRNA の発現は全てのフラグメントで認められた (data not shown)。したがって、小腸および大腸の双方において、PXR は PCN による P-gp の誘導に寄与すると考えられた。一方で、PCN 投与による *Mdr1a* mRNA お

よび P-gp タンパクの発現量の誘導倍率は、腸管上部に比較して腸管下部で高値を示す傾向が認められた (Figs. 9A および 10). 腸管の部位によって異なる誘導倍率が認められたことについて、その詳細なメカニズムは明らかではないが、*Mdr1a/1b* 遺伝子の発現は PXR 以外の様々な因子によっても制御されていると考えられることから、PXR 以外の因子の差異により、PXR リガンドによる P-gp の誘導倍率に部位差が認められたのかもしれない。

過去の報告において、PXR リガンドの投与により、ラット、マウスおよびヒト PXR トランスジェニックマウスの肝臓における *Mdr1a/1b* mRNA もしくは P-gp タンパクの発現が誘導されることが示されている (33, 80-82). 一方で、PXR リガンドを投与しても、肝臓の *Mdr1a/1b* mRNA もしくは P-gp タンパクの発現量は変動しないとする報告もある (37, 83, 84). しかし、肝臓における P-gp の発現に対して PXR リガンドの投与が与える影響について、*Mdr1a/1b* mRNA および P-gp タンパクの双方への影響を同時に検討した報告は存在しない. そこで本研究では、PCN の投与が肝臓の P-gp 発現へ与える影響について、*Mdr1a/1b* mRNA および P-gp タンパクの双方への効果を検討した. PCN の投与により、肝臓における *Mdr1a/1b* mRNA の発現量は有意に増加した (Fig. 11). このことから、腸管と同様に、十分量の PCN は肝臓においても *Mdr1a/1b* 遺伝子の転写活性化を惹起することが示唆された. 一方で、肝臓の P-gp タンパクについては、PCN の投与による有意な発現量の変化は認められなかった (Fig. 12). この結果は、マウスに PCN を投与した時に P-gp タンパクの発現量が変動しなかったという報告と一致する (84). これらのことから、PCN は P-gp の翻訳もしくは転写後調節のプロセスに何らかの影響を与えることにより、肝臓における P-gp タンパクの発現を抑制する可能性が示された. PCN が P-gp タンパク発現の制御におよぼす影響およびその詳細なメカニズムについては、今後さらなる研究をおこなう必要があると考えられる.

PXR リガンドの投与により脳のパグが誘導されるか否かを検討したところ、PCN の投与により、全脳における *Mdr1a/1b* mRNA の発現は誘導されるが、全脳における P-gp タンパクの発現は誘導されないことが示された (Figs. 13 および 14). この結果は、既報の知見とよく一致していた (37, 84). 一方、大脳皮質においては、PCN の投与による P-gp タンパクの誘導が認められたことに加え (Fig. 14), *Mdr1a/1b* mRNA の誘導倍率は全脳に対して高値を示した (Fig. 13). これらのことから、PCN は脳において *Mdr1a/1b* 遺伝子の転写活性化を惹起するものの、P-gp タンパクの誘導は大脳皮質においてのみ検出可能であることが示唆された. この原因として、脳毛細血管の密度が、白質に比較して灰白質 (すなわち大脳皮質) で高いことが関係しているかもしれない (91). 過去の報告において、ラットおよびヒト PXR トランスジェニックマウスに PCN もしくは rifampicin を

それぞれ投与すると、脳毛細血管における P-gp タンパク発現が誘導されることが示されている (80, 81). さらに、PXR およびグルココルチコイド受容体のリガンドである dexamethasone による P-gp タンパクの誘導は、脳毛細血管では認められるが、全脳ホモジネート画分では認められないことも示されている (92). これらの知見を考え合わせると、PXR リガンドによる脳 P-gp の誘導は、脳毛細血管特異的に惹起される可能性が考えられる. P-gp は脳毛細血管以外にも、脳の様々な部位に発現することから (90, 93), 全脳においては、脳毛細血管以外の部位に発現する P-gp によって脳毛細血管特異的な P-gp の誘導がマスクされることにより、大脳皮質に比較して P-gp の誘導の検出が困難である可能性が考えられた.

WT マウスを用いた検討において、PXR リガンドの投与により脳毛細血管における P-gp の発現が誘導される可能性が示されたことから、PXR リガンド投与が P-gp 基質の中枢移行に影響を与えるか否かを明らかにするため、hMDR1-MAC マウスに PCN もしくは vehicle としてコーン油を前処置し、verapamil の中枢移行性を解析した. hMDR1-MAC マウスにおける verapamil の脳-血漿濃度比は、PCN の前処置により低下した (Fig. 15). すなわち、verapamil の中枢移行は、PCN の前処置により抑制されることが示唆された. この結果から、WT マウスに発現するマウス P-gp と同様に、hMDR1-MAC マウスの BBB に発現するヒト P-gp も PXR リガンドにより誘導される可能性が示された. また、脳においてもヒト P-gp の発現誘導を介した薬物間相互作用が起こり得ることが示唆された. これらのことから、hMDR1-MAC マウスは P-gp 基質の中枢移行制御機構の解明および P-gp 発現誘導による薬物間相互作用の予測に有用であると考えられた.

以上より、第 2 章では、PCN の投与により、Mdr1a/1b mRNA の発現が腸管、肝臓および脳で誘導されることが示された. 一方、P-gp タンパクの発現に対する PCN の効果は臓器によって異なることが示唆された. 腸管の P-gp については、PXR リガンドの投与により、小腸だけでなく大腸の P-gp が発現誘導されることが示された. また、脳の P-gp については、PXR リガンドの投与により、大脳皮質選択的に誘導される可能性が示された. さらに、PXR リガンドの投与によって BBB における P-gp の発現が誘導され、P-gp の発現誘導を介した薬物間相互作用が惹起される可能性が示された. これらの知見は、PXR リガンドによる P-gp の発現誘導を介した薬物間相互作用の予測および解明の一助となることが期待される.

Table 8. Effect of PCN on the expression of Mdr1a/1b mRNA and P-gp protein in the intestine, liver and brain of mice

Tissue		Mdr1a/1b mRNA		P-gp protein	
		PCN100	PCN200	PCN100	PCN200
Intestine	Small intestine	↑	↑	↑	↑
	Large intestine	↑	↑	↑	↑
Liver		↑	↑	↔	↔
Brain	Cortex	↑	↑	↔	↑
	Whole brain	↔	↑	↔	↔

↑, induction; ↔, no induction

総括

- 1) 本研究で作製した P-gp ヒト化マウス『hMDR1-MAC マウス』は、脳において機能的なヒト P-gp を発現する初めての P-gp ヒト化動物であり、ヒトとマウスの間の P-gp の種差を克服したモデル動物であることが示された。
- 2) hMDR1-MAC マウスは、ヒト *in vivo* における P-gp 基質の中枢移行性の予測、P-gp の阻害および発現誘導を介した薬物間相互作用の予測および P-gp の種差の解明に有用である可能性が示された。
- 3) PXR リガンドの投与により、Mdr1a/1b mRNA の発現は腸管、肝臓および脳で誘導されたのに対し、P-gp タンパクの発現に対する PCN の効果は臓器によって異なることが示された。
- 4) PXR リガンドの投与により、小腸だけでなく大腸の P-gp が発現誘導されることが示された。
- 5) PXR リガンドによる脳 P-gp の誘導は、大脳皮質選択的に認められる可能性が示された。さらに、PXR リガンドの投与によって BBB における P-gp の発現が誘導され、P-gp の発現誘導を介した薬物間相互作用が惹起される可能性が示された。

参考文献

1. Juliano RL, and Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62.
2. Mizuno N, and Sugiyama Y. Drug transporters: their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2002;17(2):93-108.
3. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, and Schellens JH. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*. 2007;12(8):927-41.
4. Zhang L, Strong JM, Qiu W, Lesko LJ, and Huang SM. Scientific perspectives on drug transporters and their role in drug interactions. *Mol Pharm*. 2006;3(1):62-9.
5. Ayrton A, and Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica*. 2001;31(8-9):469-97.
6. Leslie EM, Deeley RG, and Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(3):216-37.
7. Callaghan R, Crowley E, Potter S, and Kerr ID. P-glycoprotein: so many ways to turn it on. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(3):365-78.
8. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(3):152-61.
9. Borst P, and Schinkel AH. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4131-3.
10. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, de Lourdes Bastos M, et al. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*. 2015;149:1-123.
11. Balayssac D, Authier N, Cayre A, and Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug-drug interactions? *Toxicol Lett*. 2005;156(3):319-29.
12. Longley DB, and Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275-92.
13. Food and Drug Administration. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry, Draft Guidance. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. 2017.

14. The International Transporter C. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9:215.
15. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions, CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. European Medicines Agency, London. 2012.
16. 厚生労働省, 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (案). 厚生労働省, 東京. 2017.
17. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994;77(4):491-502.
18. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4028-33.
19. Chu X, Zhang Z, Yabut J, Horwitz S, Levorse J, Li XQ, et al. Characterization of multidrug resistance 1a/P-glycoprotein knockout rats generated by zinc finger nucleases. *Mol Pharmacol*. 2012;81(2):220-7.
20. Syvanen S, Lindhe O, Palner M, Kornum BR, Rahman O, Langstrom B, et al. Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(3):635-43.
21. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*. 2011;117(2):333-45.
22. Chu X, Bleasby K, and Evers R. Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(3):237-52.
23. Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Inoue T, Ohtsuki S, and Terasaki T. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. *J Pharm Sci*. 2013;102(9):3343-55.
24. Harwood MD, Achour B, Russell MR, Carlson GL, Warhurst G, and Rostami-Hodjegan A. Application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of human intestinal transporter proteins absolute abundance using a QconCAT technique. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;110:27-33.
25. Akazawa T, Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, and Terasaki T. Quantitative Targeted Absolute Proteomics of Transporters and Pharmacoproteomics-Based

- Reconstruction of P-Glycoprotein Function in Mouse Small Intestine. *Mol Pharm.* 2016;13(7):2443-56.
26. Yamazaki M, Neway WE, Ohe T, Chen I, Rowe JF, Hochman JH, et al. In vitro substrate identification studies for p-glycoprotein-mediated transport: species difference and predictability of in vivo results. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(3):723-35.
 27. Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S, Ebihara T, et al. Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharm Res.* 2006;23(7):1460-72.
 28. Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaever V, and Loscher W. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology.* 2007;52(2):333-46.
 29. Geick A, Eichelbaum M, and Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem.* 2001;276(18):14581-7.
 30. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 1999;104(2):147-53.
 31. Westphal K, Weinbrenner A, Zschesche M, Franke G, Knoke M, Oertel R, et al. Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(4):345-55.
 32. Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, et al. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):598-604.
 33. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, and Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol.* 2002;62(3):638-46.
 34. Liu S, Tam D, Chen X, and Pang KS. P-glycoprotein and an unstirred water layer barring digoxin absorption in the vascularly perfused rat small intestine preparation: induction studies with pregnenolone-16alpha-carbonitrile. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(9):1468-79.

35. Cheng X, and Klaassen CD. Regulation of mRNA expression of xenobiotic transporters by the pregnane x receptor in mouse liver, kidney, and intestine. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(11):1863-7.
36. Schwarz UI, Hanso H, Oertel R, Miehle S, Kuhlisch E, Glaeser H, et al. Induction of intestinal P-glycoprotein by St John's wort reduces the oral bioavailability of talinolol. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(5):669-78.
37. Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, and Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):203-10.
38. Holmstock N, Gonzalez FJ, Baes M, Annaert P, and Augustijns P. PXR/CYP3A4-humanized mice for studying drug-drug interactions involving intestinal P-glycoprotein. *Mol Pharm.* 2013;10(3):1056-62.
39. Uchida Y, Ohtsuki S, Kamiie J, and Terasaki T. Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of in vivo brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, in vitro intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(2):579-88.
40. Uchida Y, Wakayama K, Ohtsuki S, Chiba M, Ohe T, Ishii Y, et al. Blood-brain barrier pharmacoproteomics-based reconstruction of the in vivo brain distribution of P-glycoprotein substrates in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350(3):578-88.
41. Feng B, Mills JB, Davidson RE, Mireles RJ, Janiszewski JS, Troutman MD, et al. In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(2):268-75.
42. Scheer N, Balimane P, Hayward MD, Buechel S, Kauselmann G, and Wolf CR. Generation and characterization of a novel multidrug resistance protein 2 humanized mouse line. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(11):2212-8.
43. Dallas S, Salphati L, Gomez-Zepeda D, Wanek T, Chen L, Chu X, et al. Generation and Characterization of a Breast Cancer Resistance Protein Humanized Mouse Model. *Mol Pharmacol.* 2016;89(5):492-504.
44. Sadiq MW, Uchida Y, Hoshi Y, Tachikawa M, Terasaki T, and Hammarlund-Udenaes M. Validation of a P-Glycoprotein (P-gp) Humanized Mouse Model by Integrating Selective Absolute Quantification of Human MDR1, Mouse Mdr1a and Mdr1b Protein Expressions with In Vivo Functional Analysis for Blood-Brain Barrier Transport. *PLoS One.* 2015;10(5):e0118638.

45. Oshimura M, Uno N, Kazuki Y, Katoh M, and Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res.* 2015;23(1):111-33.
46. Satoh D, Abe S, Kobayashi K, Nakajima Y, Oshimura M, and Kazuki Y. Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2018.
47. Yamasaki Y, Kobayashi K, Okuya F, Kajitani N, Kazuki K, Abe S, et al. Characterization of P-glycoprotein Humanized Mice Generated by Chromosome Engineering Technology: Its Utility for Prediction of Drug Distribution to the Brain in Humans. *Drug Metab Dispos.* 2018.
48. Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, et al. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):21.
49. Nakamura K, Hirayama-Kurogi M, Ito S, Kuno T, Yoneyama T, Obuchi W, et al. Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: Comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM. *Proteomics.* 2016;16(15-16):2106-17.
50. Masuda T, Tomita M, and Ishihama Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J Proteome Res.* 2008;7(2):731-40.
51. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(2):397-406.
52. Kemper EM, Cleypool C, Boogerd W, Beijnen JH, and van Tellingen O. The influence of the P-glycoprotein inhibitor zosuquidar trihydrochloride (LY335979) on the brain penetration of paclitaxel in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(2):173-8.
53. Hubensack M, Muller C, Hocherl P, Fellner S, Spruss T, Bernhardt G, et al. Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(5):597-607.

54. Kemper EM, van Zandbergen AE, Cleypool C, Mos HA, Boogerd W, Beijnen JH, et al. Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-Glycoprotein. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2849-55.
55. Chen C, Hanson E, Watson JW, and Lee JS. P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(3):312-8.
56. 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.* 2013;132(10):2439-47.
57. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):2031-5.
58. Bardelmeijer HA, Beijnen JH, Brouwer KR, Rosing H, Nooijen WJ, Schellens JH, et al. Increased oral bioavailability of paclitaxel by GF120918 in mice through selective modulation of P-glycoprotein. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11):4416-21.
59. Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest.* 1998;101(2):289-94.
60. Liu X, Ding X, Deshmukh G, Liederer BM, and Hop CE. Use of the cassette-dosing approach to assess brain penetration in drug discovery. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(5):963-9.
61. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, and van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996;97(11):2517-24.
62. Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse E, and Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the impact of active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as a surrogate. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(3):935-44.
63. Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, and Roden DM. Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine [seecomments]. *Circulation.* 1999;99(4):552-7.
64. Hendrikse NH, Schinkel AH, de Vries EG, Fluks E, Van der Graaf WT, Willemsen AT, et al. Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function

- in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *Br J Pharmacol*. 1998;124(7):1413-8.
65. Kalvass JC, Polli JW, Bourdet DL, Feng B, Huang SM, Liu X, et al. Why clinical modulation of efflux transport at the human blood-brain barrier is unlikely: the ITC evidence-based position. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(1):80-94.
 66. Sasongko L, Link JM, Muzi M, Mankoff DA, Yang X, Collier AC, et al. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(6):503-14.
 67. Hsiao P, Sasongko L, Link JM, Mankoff DA, Muzi M, Collier AC, et al. Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;317(2):704-10.
 68. Muzi M, Mankoff DA, Link JM, Shoner S, Collier AC, Sasongko L, et al. Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using ¹¹C-verapamil in the brain: studies of healthy humans. *J Nucl Med*. 2009;50(8):1267-75.
 69. Wagner CC, Bauer M, Karch R, Feurstein T, Kopp S, Chiba P, et al. A pilot study to assess the efficacy of tariquidar to inhibit P-glycoprotein at the human blood-brain barrier with (R)-¹¹C-verapamil and PET. *J Nucl Med*. 2009;50(12):1954-61.
 70. Bauer M, Karch R, Zeitlinger M, Philippe C, Romermann K, Stanek J, et al. Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier: an (R)-[¹¹C]verapamil PET study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(5):743-6.
 71. Shawahna R, Uchida Y, Decleves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm*. 2011;8(4):1332-41.
 72. Renaud HJ, Cui JY, Lu H, and Klaassen CD. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver-insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88584.
 73. Yin S, Fan Y, Zhang H, Zhao Z, Hao Y, Li J, et al. Differential TGFbeta pathway targeting by miR-122 in humans and mice affects liver cancer metastasis. *Nat Commun*. 2016;7:11012.
 74. Mruk DD, Su L, and Cheng CY. Emerging role for drug transporters at the blood-testis barrier. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(2):99-106.

75. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, and Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(3):154-79.
76. Fung KL, Hunt RC, Kimchi-Sarfaty C, and Gottesman MM. *ABC Transporters-40 Years on.* Springer; 2016:105-34.
77. Abe S, Kobayashi K, Oji A, Sakuma T, Kazuki K, Takehara S, et al. Modification of single-nucleotide polymorphism in a fully humanized CYP3A mouse by genome editing technology. *Sci Rep.* 2017;7(1):15189.
78. Uno N, Abe S, Oshimura M, and Kazuki Y. Combinations of chromosome transfer and genome editing for the development of cell/animal models of human disease and humanized animal models. *J Hum Genet.* 2018;63(2):145-56.
79. Martignoni M, Groothuis GM, and de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(6):875-94.
80. Bauer B, Hartz AM, Fricker G, and Miller DS. Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):413-9.
81. Bauer B, Yang X, Hartz AM, Olson ER, Zhao R, Kalvass JC, et al. In vivo activation of human pregnane X receptor tightens the blood-brain barrier to methadone through P-glycoprotein up-regulation. *Mol Pharmacol.* 2006;70(4):1212-9.
82. Wang T, Ma X, Krausz KW, Idle JR, and Gonzalez FJ. Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(2):674-84.
83. Brady JM, Cherrington NJ, Hartley DP, Buist SC, Li N, and Klaassen CD. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(7):838-44.
84. Matheny CJ, Ali RY, Yang X, and Pollack GM. Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(9):1008-14.
85. Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, et al. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol Pharm.* 2007;4(2):252-7.
86. Aleksunes LM, and Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(7):1366-79.

87. Johnson CH, Bonzo JA, Cheng J, Krausz KW, Kang DW, Luecke H, et al. Cytochrome P450 regulation by alpha-tocopherol in Pxr-null and PXR-humanized mice. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(2):406-13.
88. Kazuki Y, Kobayashi K, Aueviriyavit S, Oshima T, Kuroiwa Y, Tsukazaki Y, et al. Trans-chromosomal mice containing a human CYP3A cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans. *Hum Mol Genet.* 2013;22(3):578-92.
89. Chow EC, Maeng HJ, Liu S, Khan AA, Groothuis GM, and Pang KS. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) triggered vitamin D receptor and farnesoid X receptor-like effects in rat intestine and liver in vivo. *Biopharm Drug Dispos.* 2009;30(8):457-75.
90. Durk MR, Han K, Chow EC, Ahrens R, Henderson JT, Fraser PE, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces cerebral amyloid-beta accumulation and improves cognition in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2014;34(21):7091-101.
91. Cavaglia M, Dombrowski SM, Drazba J, VasANJI A, Bokesch PM, and Janigro D. Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Res.* 2001;910(1-2):81-93.
92. Chan GN, Saldivia V, Yang Y, Pang H, de Lannoy I, and Bendayan R. In vivo induction of P-glycoprotein expression at the mouse blood-brain barrier: an intracerebral microdialysis study. *J Neurochem.* 2013;127(3):342-52.
93. Nannelli A, Rossignolo F, Tolando R, Rossato P, Pellegatti M, Longo V, et al. Expression and distribution of CYP3A genes, CYP2B2, and MDR1, MRP1, MRP2, LRP efflux transporters in brain of control and rifampicin-treated pigs. *Mol Cell Biochem.* 2010;337(1-2):133-43.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表による。

- 1) Yamasaki Y, Kobayashi K, Okuya F, Kajitani N, Kazuki K, Abe S, Takehara S, Ito S, Ogata S, Uemura T, Ohtsuki S, Minegishi G, Akita H, Chiba K, Oshimura M, Kazuki Y. Characterization of P-glycoprotein Humanized mice generated by chromosome engineering technology: its utility for prediction of drug distribution to the brain in humans. *Drug Metab Dispos.* 2018;doi:10.1124/dmd.118.081216.
- 2) Yamasaki Y, Kobayashi K, Chiba K. Effect of pregnenolone 16 α -carbonitrile on the expression of P-glycoprotein in the intestine, brain and liver of mice. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(6):972-977.

謝辞

本研究を通じてご指導，ご鞭撻を賜りますとともに論文の御校閲をいただきました，千葉大学名誉教授 千葉 寛 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を通じてご指導，ご鞭撻を賜りますとともに論文の御校閲をいただきました，千葉大学大学院薬学研究院分子薬物治療学講座 (薬物学研究室) 秋田 英万 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し，最後までご指導，ご鞭撻を賜りました，千葉大学大学院薬学研究院分子薬物治療学講座 (薬物学研究室) 小林 カオル 准教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を通じてご指導，ご鞭撻を賜りました，千葉大学大学院医学研究院中核研究部門呼吸・循環治療学研究講座 (薬理学研究室) 降幡 知己 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を通じてご指導，ご鞭撻を賜りました，千葉大学大学院薬学研究院分子薬物治療学講座 (薬物学研究室) 櫻井 遊 特任助教および田中 浩揮 特任助教に厚く御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり，hMDR1-MAC マウスのサンプルを御恵与戴きました鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体機能医工学講座 押村 光雄 名誉教授ならびに香月 康宏 准教授に心より御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり，P-gp タンパク発現解析に御協力戴きました熊本大学大学院生命科学研究部微生物薬学分野 大槻 純男 教授ならびに伊藤 慎悟 助教に謹んで感謝申し上げます。

本研究を通じて，御助言，御協力を戴き，また，温かい励ましを戴きました千葉大学大学院薬学研究院分子薬物治療学講座薬物学研究室 奥谷 風香 学士および稲垣 良亮 学部生に心より感謝いたしますとともに，今後の御活躍をお祈りいたします。

本研究を通じて、終始適切な御助言、御協力を戴きました、千葉大学大学院薬学研究院分子薬物治療学講座薬物学研究室の皆様方に心より感謝いたします。

最後に、あらゆる支援、協力を惜しまず、これまで私を支えてくださいました両親と友人に、心より感謝申し上げます。

主査・副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員によりおこなわれた。

主査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	戸井田 敏彦
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	荒野 泰
副査	千葉大学教授 (薬学研究院)	薬学博士	樋坂 章博