

創薬の効率化を目指した
ヒト P-gp 基質性評価改善に関する研究

2020 年 1 月

宮本 れい

創薬の効率化を目指した
ヒト P-gp 基質性評価改善に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生命産業科学専攻
博士(生物科学)学位論文

宮本 れい

目次

略語.....	i
序論.....	1
第一章 LLC-PK1 細胞を用いた 96-well ヒト P-gp 基質性評価法の構築	
第一節 背景.....	10
第二節 実験材料および実験方法.....	12
第三節 結果.....	18
第四節 考察.....	20
第二章 LLC-PK1 細胞に発現する内在性 Bcrp のヒト P-gp 基質性評価への影響	
第一節 背景.....	37
第二節 実験材料および実験方法.....	39
第三節 結果.....	45
第四節 考察.....	47
総括.....	57
参考文献.....	62
謝辞.....	76
発表論文目録.....	78

略語

ASBT	Apical sodium dependent bile acid transporter
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSEP	Bile salt export pump
CV	Coefficient of variation
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Efflux ratio
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IC ₅₀	Half-maximal inhibitory concentration
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MCT	Monocarboxylic acid transporter
MRM	Multiple reaction monitoring
MRP	Multidrug resistance protein
NER	Net efflux ratio
NTCP	Taurocholate co-transporting polypeptide
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide

OCT	Organic cation transporter
OCTN	Carnitine/organic cation transporter
OST	Organic solute transporter
P-gp	P-glycoprotein
P_{app}	Apparent permeability coefficient
PEPT	Peptide transporter
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SD	Standard deviation
URAT	Urate transporter

序論

製薬企業の創薬研究では、標的の探索、化合物ライブラリーからヒット化合物の選択、ヒット化合物からリード化合物の創製、リード化合物の最適化、開発候補品の選択を経て、ヒト臨床試験が開始される。ヒト臨床試験では開発候補品のヒトでの有効性および安全性を確認するが、そのためには創薬段階の評価からヒトの有効性および安全性を適切に予測することが大変重要である。薬物は投与された後、体内で吸収され、組織に分布し、代謝され、排泄されるという過程をたどる。創薬段階における薬物動態評価はヒト由来の生体試料や実験動物を用いた評価により、ヒトにおける薬物の吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態を予測している。よってヒト臨床試験においてより安全で十分な薬効を発揮する医薬品開発のためには、ヒトでの薬物動態を正確に予測する薬物動態評価が不可欠となってくる。

薬物動態特性の悪さが原因で開発中止となる医薬品は 1993 年では 40%であったが、その後、創薬段階における薬物動態評価が充実した結果、2000 年には 10%以下となり(Kola and Landis, 2004)、創薬段階における薬物動態評価の有用性が示された。よって、製薬会社では更に創薬の成功確率を上げるため、創薬段階における薬物動態評価の改善を進め、更なるヒト体内動態予測精度の向上を目指している。

ATP binding cassette トランスポーターの一種である P-glycoprotein (P-gp) は Figure 1 に示すように様々な組織(小腸、脳、肝臓、腎臓)に発現し、多くの薬物の吸収、分布、排泄に関与しており、トランスポーターの中で最もよく研究されている (Giacomini et al., 2010)。また臨床現場において患者は複数の医

薬品を同時に処方されることが多く、それら薬物間に相互作用があった場合、重篤な副作用や治療効果の減弱につながり、患者の不利益となるため、医薬品開発時における薬物の P-gp 基質性に関する情報は、薬物の適正な使用において有用な情報となる。よって開発候補品のヒト P-gp 基質性を調べることは重要とされ、2017 年に米国の Food and Drug Administration (FDA) から“In Vitro Metabolism- and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies”が、2018 年に厚生労働省から「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」が発行され、これら規制当局のガイドラインにはヒト P-gp 基質性評価の必要性、評価法および基質性判断基準について記載されている (Figures 2, 3)。規制当局のガイドラインに記載されているヒト P-gp 基質性評価法では、ヒト P-gp が発現し、ヒト P-gp 基質化合物の輸送能が確認された細胞を用いた経細胞輸送評価法が推奨されており、この評価法はヒト P-gp が薬物の体内動態に与える影響の予測において、現段階で最も信頼性の高い *in vitro* 評価法であることが報告されている (Yamazaki et al., 2001; Mahar Doan et al., 2002; Ohe et al., 2003; Feng et al., 2008; Hsiao et al., 2008; Sugimoto et al., 2011a; Sugimoto et al., 2013; Poirier et al., 2014a; Feng et al., 2018)。細胞としてはイヌ腎臓由来の MDCKII 細胞またはブタ腎臓由来の LLC-PK1 細胞を親株に用いたヒト P-gp 安定発現細胞株が一般的に広く使用されている。また規制当局のガイドラインに記載されているヒト P-gp 基質性の判断基準では、P-gp 基質性の指標は Net Efflux Ratio (NER) の値により判断されている。NER \geq 2 の場合は「ヒト P-gp 基質の可能性あり」と判断され、ヒト P-gp 基質性

確認のための追加の評価が必要となる。NER<2 の場合は「弱いヒト P-gp の基質またはヒト P-gp 基質ではない」と判断され、それ以降の追加評価は必要とされていない。よって創薬段階のスクリーニング評価ではヒト P-gp 基質性判断のクライテリアを NER:2 とし、NER \geq 2 を P-gp 基質、NER<2 を P-gp 非基質と判断している。しかし、ヒト P-gp 基質性評価に用いられる細胞には内在性トランスポーターが発現しており、ヒト P-gp 基質性評価結果に影響を与えることが複数報告されている。例えば MDCKII 細胞は内在性イヌ P-gp、イヌ Mrp2、イヌ PepT1、イヌ PepT2 が発現しており、これらトランスポーターがヒト P-gp 基質性判断を過小評価するとの報告がある (Goh et al., 2002; Giri et al., 2009; Kuteykin-Teplyakov et al., 2010; Di et al., 2011; Mease et al., 2012; Li et al., 2013; Wang et al., 2013)。特にイヌ P-gp はヒト P-gp 基質性評価への影響が大きく、このイヌ P-gp の影響を最小限にするため、flow cytometry によるイヌ P-gp 発現量の低い MDCKII 細胞の選択や、zinc-finger nucleases、CRISPR-Cas9 などの遺伝子編集技術を用いてイヌ P-gp 遺伝子を knock out した MDCKII 細胞を作製し、ヒト P-gp 基質性評価の親株に使用したとの報告がある (Di et al., 2011; Gartzke and Fricker, 2014; Gartzke et al., 2015; Karlgren et al., 2017)。一方、LLC-PK1 細胞では内在性ブタ P-gp、ブタ Mrp2 の発現は確認されているが、これらトランスポーターはヒト P-gp 基質性評価への影響が小さいことが報告されている (Goh et al., 2002; Kuteykin-Teplyakov et al., 2010)。

よってヒト P-gp 基質性評価には LLC-PK1 細胞の方がより適した親株細胞と考えられた。また細胞を用いたヒト P-gp 基質性評価は煩雑な手順が含まれるため、12-well plate や 24-well plate を用いて実施されることが多くスループットが低いため、創薬段階早期のスクリーニング評価に向けて評価法のハイスループット化が必要であった。

以上のことにより、本研究では LLC-PK1 細胞を親株として選択し、第一章で高質かつハイスループットな評価法構築を目的とし、96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価法の構築を行った。また ATP binding cassette トランスポーターの一種である Breast cancer resistance protein (BCRP) は P-gp と同様に規制当局のガイドラインにその基質性評価の重要性が記載されている(Figure 3)。一方で、LLC-PK1 細胞における内在性ブタ Bcrp の発現について調べた報告はまだなく、もし LLC-PK1 細胞においてブタ Bcrp が発現し、輸送活性が高い場合、ヒト P-gp 基質性評価へ影響する可能性が考えられた。よって第二章では LLC-PK1 細胞に発現する内在性ブタ Bcrp の機能およびヒト P-gp 基質性評価への影響について調べた。

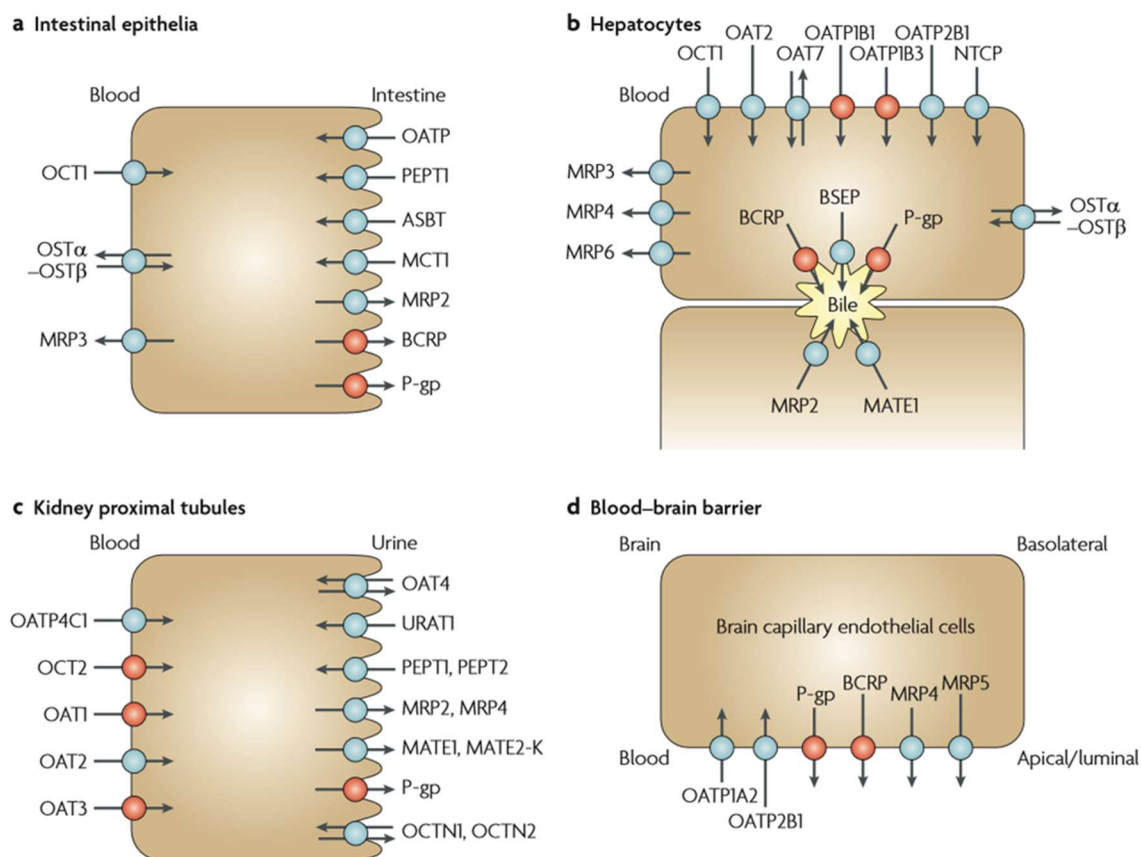


Figure 1. Selected human transport proteins for drugs and endogenous substances (Giacomini et al., 2010). a: Intestinal epithelia; b: Hepatocytes; c: Kidney proximal tubules; d: Blood-brain barrier; ASBT: apical sodium/bile acid co-transporter; BCRP: breast cancer resistance protein; BSEP: bile-salt export pump; MATE: multidrug and toxin extrusion protein; MCT: Monocarboxylic acid transporter; MRP: multidrug resistance protein; NTCP: taurocholate co-transporting polypeptide; OAT: organic anion transporter; OATP: organic anion transporting polypeptide; OCT: organic cation transporter; OCTN: organic cation/carnitine transporter; OST: organic solute transporter; PEPT: peptide transporter; P-gp: P-glycoprotein; URAT: urate transporter.

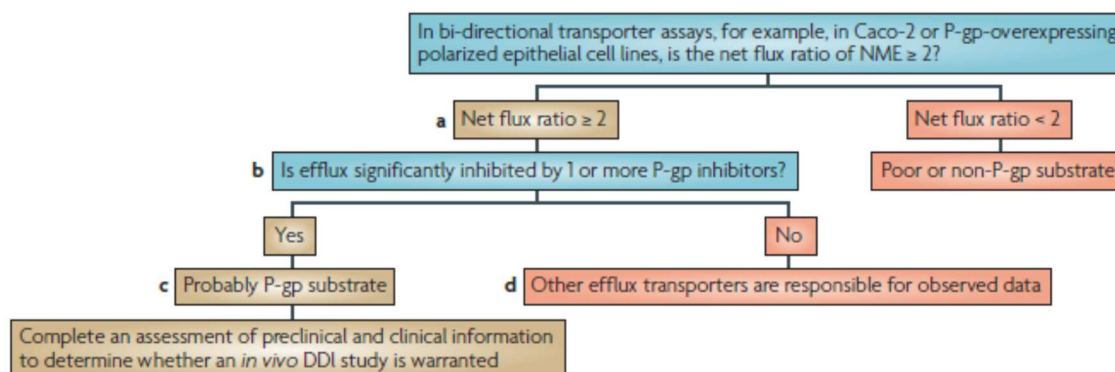
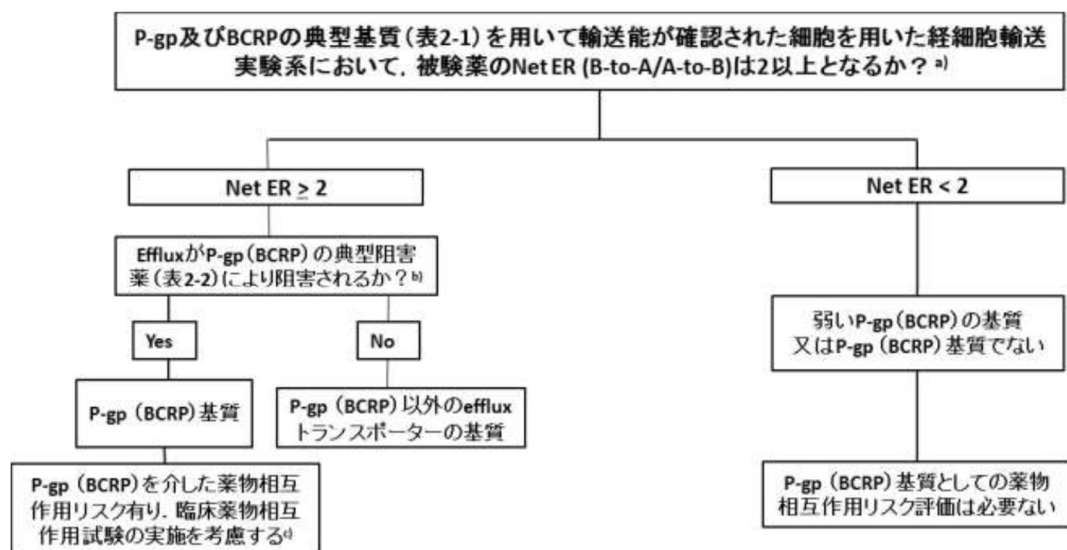


Figure 2. This figure shows a decision tree for P-gp and a similar tree could be used for BCRP (Giacomini et al., 2010). a: A new molecular entity is considered to be a potential P-gp (or BCRP) substrate if the efflux ratio - basal to apical (B to A) to apical to basal (A to B) - is ≥ 2 in an epithelial cell system that expresses one or both transporters. b: Reduction of the flux ratio by the P-gp (or BCRP) inhibitors should be greater than 50%. c: If *in vitro* experiments suggest that the new molecular entity is a P-gp (and/or BCRP) substrate, preclinical and clinical information should be assessed to determine whether a clinical *in vivo* DDI study is warranted. d: If the flux ratio is not reduced by P-gp (or BCRP) inhibitors, then other efflux transporters may be responsible for the observed net flux.



- a) P-gp や BCRP のような排出トランスポーターを介した輸送を評価する際には、薬物の頂端膜側 (A) から基底膜側 (B) への透過性を、反対方向 (B から A) の透過性と比較し、B から A への透過性と A から B への透過性の比から Efflux ratio (= B to A/A to B ratio、ER) を算出する。発現細胞株を用いる場合は原則として、非発現細胞の ER を用いて補正し、Net ER (= (発現細胞の ER) / (非発現細胞の ER)) を算出する。P-gp 等トランスポーター遺伝子の発現細胞株等を用いる場合は、典型基質の Net ER (Caco-2 細胞の場合は、典型基質の ER) を指標に輸送能を確認する。使用する細胞系でのこれまでの経験から NetER が 2 という値では結果を判断できないと考えられる場合は、2 以外の NetER のカットオフ値か、又は陽性対照との相対比を使用してもよい。その場合は、陽性対照の検討結果に基づき、適切な値を設定する。
- b) NetER が 1 付近になる、又は明らかに低下する。
- c) P-gp は消化管吸収や尿細管分泌、中枢移行性に関与することから、消化管アベイラビリティ (Fa Fg)、尿細管分泌の有無、中枢毒性の懸念等を考慮し、臨床薬物相互作用試験の必要性を判断する。例えば、Fa Fg >80% であれば、消化管の P-gp 阻害のみによつては、1.25 倍以上の AUC 上昇は起こらないと考えられる。なお、BCRP 基質の場合は、*in vivo* での機能低下を示唆する、日本人で比較的頻度の高い変異 (c.421C > A) があり、基質の薬物動態の個人差の原因となり得ることから、本決定樹を用いて *in vitro* 試験で基質となるか否かを検討しておくことが推奨される。試験方法は P-gp 基質試験に準じる。但し、BCRP 基質の場合、*in vivo* で使用可能な典型阻害薬を用いた臨床薬物相互作用試験を計画することは現時点で困難であることから、当面は、BCRP の基質であることを情報提供するのみにとどめる。

Figure 3. 被験薬が P-gp 及び BCRP の基質となる可能性の検討 (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, 厚生労働省)

第一章

LLC-PK1 細胞を用いた

96-well ヒト P-gp 基質性評価法の構築

第一節 背景

細胞を用いたヒト P-gp 基質性評価は煩雑な実験手順を含む細胞実験のため 12-well plate や 24-well plate を用いて実施されることが多い。また、全ての実験工程を手動で実施するため、習熟した実験手技が必要とされ、スループットの低い評価法であった。特に複雑な手順となっているのが、細胞を transport buffer で洗浄・置換するステップである。P-gp 基質性評価を実施する際、transport assay 用 plate に細胞を播種し一定期間培養後、評価当日に plate の各 well を transport buffer により洗浄・置換を実施する。その際、細胞の単層膜を形成しているタイトジャンクションを破壊しない様に各 well を優しく洗浄・置換しなければならない。また、各 well を細胞培養用の培地から transport buffer へ置換する際、transport buffer により 2 回洗浄後に置換を行う。よって計 3 回洗浄作業 (well に入っている溶液を吸引し、新たな溶液を分注する) を実施するが、習熟した実験手技を必要とし、時間がかかる操作であった。

本章では評価法のハイスループット化を目指し、各 well の溶液の交換を自動的に実施できる microplate washer を用いた 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価法の構築を行った。また構築した評価法にて Figure 4 に示す様々な特性を持つ計 9 化合物を評価し、24-well plate にて実施した評価結果と比較し、本評価法の validation を実施した。

更に開発候補品のヒト P-gp に関する薬物間相互作用を知るためには開発候補品のヒト P-gp 阻害能を評価することも重要であり、規制当局ガイドラインにもヒト P-gp 阻害性評価の必要性について記載されている。よって本章で構築し

たヒト P-gp 基質性評価法がヒト P-gp 阻害性評価に使用可能か確認するため、典型的 P-gp 基質である digoxin、既知 P-gp 阻害剤として elacridar、quinidine、verapamil、ketoconazole (Figure 5) を用いて阻害性評価についての validation を実施した。

第二節 実験材料および実験方法

1) 実験材料

LLC-PK1 細胞は ATCC (Manassas, VA, USA) から購入した。LLC-PK1-P-gp 細胞は LLC-PK1 細胞にヒト *MDR1* cDNA をトランスフェクションして樹立した細胞である (Tanigawara et al., 1992; Ueda et al., 1992)。LLC-PK1-P-gp 細胞(LLC-GA5-CoL150) は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研バイオリソース研究センターから提供して頂いた。Medium 199 (Cat No: 11150)、ペニシリン-ストレプトマイシン (Cat No: 15070)、FBS (Cat No: 10099141)、0.05% トリプシン-EDTA (Cat No: 25300)、HBSS (Cat No: 14025)、1 M HEPES (Cat No: 15630) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。BD Falcon 24-well (Cat No: 351181) および 96-well Multiwell Insert Systems (Cat No: 351131) は Corning Life Sciences (Lowell, MA, USA) から購入した。Verapamil (Cat No: V4629)、quinidine (Cat No: Q3625)、loperamide (Cat No: L4762)、digoxin (Cat No: D6003)、risperidone (Cat No: R3030)、propranolol (Cat No: P0884)、caffeine (Cat No: C1778)、ketoconazole (Cat No: K1003) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。アセトニトリル (Cat No: 015-08633)、colchicine (Cat No: 035-03853)、fexofenadine (Cat No: F322470)、atenolol (Cat No: 015-26051) は和光純薬 (大阪、日本) から購入した。Elacridar (Cat No: 489000) は Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada) から購入した。

Microplate washer (HydroSpeed™) は TECAN (Mannedorf, Switzerland) から購入した。

2) 細胞培養

LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞は 10% FBS、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む Medium 199 培地中で plastic culture dishes を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて培養した。LLC-PK1-P-gp 細胞の培地には Colchicine (150 ng/mL) を添加した。細胞は 60-80%コンフルエンスに達した時点で 0.05% トリプシン-EDTA を用いて 2-3 日おきに継代培養した。

3) 24-well および 96-well Multiwell Insert Systems における細胞播種および評価条件

24-well および 96-well plate の細胞播種数および評価条件を Table 1 に示した。各細胞を Multiwell Insert Systems に播種後、37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて培養した。細胞播種後は 2-3 日おきに新鮮な培地に置換し、24-well plate は播種 8 日後、96-well plate は播種 5 日後に経細胞輸送評価を実施した。

4) ヒト P-gp 基質性評価

既知の P-gp 基質および P-gp 非基質化合物の中から様々な膜透過性を示す 9 化合物を選択し評価に使用した (Table 2)。評価を開始する1時間前に各 well を 37°C の transport buffer により 2 回洗浄後、置換し 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて pre-incubation を実施した。Transport buffer は 1 M HEPES を HBSS にて希釈し、25 mM HEPES/HBSS を調製し、1 M NaOH により pH 7.4 に調整したものを使用した。24-well plate は手動で、96-well plate は microplate washer を使用し transport buffer による洗浄・置換を実施した。96-well plate の microplate washer による洗浄・置換の際、細胞の単層膜を形成しているタイトジャンクションを破壊しない様に microplate washer のニードルの吸引の高さ、吸引速度、分注の高さ、分注速度を適切に設定した。評価化合物を含んだ transport buffer を donor 側へ、評価化合物を含まない transport buffer を receiver 側へ置換し、donor 側から 0 時間のサンプル採取 (24-well plate: 100 μ L, 96-well plate: 30 μ L) 後、Multiwell Insert Systems を 37°C、5% CO₂ の条件下にて CO₂ インキュベーターにて静置し、評価を開始した。3 時間 incubation 後に receiver からサンプル採取した (24-well plate: 100 μ L, 96-well plate: 30 μ L)。

5) ヒト P-gp 阻害性評価

評価化合物のヒト P-gp 阻害能を評価するため、digoxin を基質とした LLC-PK1-P-gp 細胞における阻害性評価を実施した。評価を開始する1時間前に、4) P-gp 基質性評価に記載した方法で pre-incubation を実施した。評価化合物を含んだ transport buffer を apical 側へ、評価化合物および 1 μ M digoxin を含む transport buffer を basal 側へ置換し、basal 側から 0 時間のサンプル採取 (24-well plate: 100 μ L, 96-well plate: 30 μ L) 後、Multiwell Insert Systems を 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて静置し、評価を開始した。3 時間 incubation 後に apical 側からサンプルを採取した (24-well plate: 100 μ L, 96-well plate: 30 μ L)。

6) 評価化合物の濃度測定

P-gp 基質性評価および P-gp 阻害性評価で採取したサンプルをアセトニトリル (24-well plate: 100 μ L, 96-well plate: 170 μ L) と混合し、4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS にて分析した。LC-MS/MS は ACQUITY UPLC® (Waters、MA、USA) と API4000 (AB Sciex、CA、USA) を組み合わせて使用した。分析サンプルは、ACQUITY UPLC® BEH C18 VanGuard Pre-column 1.7 μ m、2.1×5 mm および ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μ m、2.1×30 mm (Waters、MA、USA) を使用して、流速 0.5 mL/min、カラム温度 50°C でカラム分離した。移動相 B 液の初期濃度は 5% で、この条件を 0.2 分間維持した後、次の 0.3 分間で移動相 B を 90% まで直線的に増加

させ、0.5 分間保持し、その後、移動相 B を 5%に戻し、平衡化のために 0.5 分間保持した。MS/MS 分析は MRM 条件でイオン検出し、各化合物の LC-MS/MS 条件は Table 3 に示した。

7) Data 解析

P_{app} 、ER、NER は下記の計算式 (1-3) を用いて算出した。

$$P_{app} = \frac{R \times V_R}{Area \times D_0 \times Time} \quad (1)$$

$$ER = \frac{P_{app, B \text{ to } A}}{P_{app, A \text{ to } B}} \quad (2)$$

$$NER = \frac{ER_{P-gp}}{ER_{WT}} \quad (3)$$

R は receiver 側の incubation 終了時の濃度 (μM)、 V_R は receiver 側の容量 (mL)、Area は Multiwell Insert Systems の membrane area (cm^2)、 D_0 は donor 側の incubation 開始時の濃度 (μM)、Time は incubation 時間 (sec) である。

阻害能は下記の計算式 (4) を用いて算出した。

$$\text{Digoxin } P_{\text{app, B to A}} (\% \text{ of control}) = \frac{P_{\text{app}} - P_{\text{app, min}}}{P_{\text{app, max}} - P_{\text{app, min}}} \quad (4)$$

$P_{\text{app, max}}$ は阻害剤非添加時の digoxin の $P_{\text{app, B to A}}$ 、 $P_{\text{app, min}}$ は 最高濃度の
阻害剤添加時の digoxin の $P_{\text{app, B to A}}$ 、 P_{app} は各阻害剤濃度の digoxin の
 $P_{\text{app, B to A}}$ である。評価化合物の IC_{50} は GraphPad Prism version 5.00 for
Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて算出した。

第三節 結果

1) ヒト P-gp 基質性評価

24-well plate における P-gp 基質性評価の結果を Figure 6 および Figure 7 に示した。LLC-PK1-P-gp 細胞において典型的 P-gp 基質である verapamil、quinidine、loperamide、digoxin、risperidone、fexofenadine は、 $P_{app, A \text{ to } B}$ より $P_{app, B \text{ to } A}$ が高い値を示したが、P-gp 非基質である atenolol、propranolol、caffeine は、 $P_{app, A \text{ to } B}$ および $P_{app, B \text{ to } A}$ では同程度の値を示した (Figure 6)。また P-gp 基質化合物の NER は 2~21 を示したが、P-gp 非基質化合物の NER は約 1 を示した (Figure 7)。

96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価の結果を Figure 8 および Figure 9 に示した。LLC-PK1-P-gp 細胞において典型的 P-gp 基質は、 $P_{app, A \text{ to } B}$ より $P_{app, B \text{ to } A}$ が高い値を示し、P-gp 非基質は $P_{app, A \text{ to } B}$ および $P_{app, B \text{ to } A}$ では同程度の値を示した (Figure 8)。また P-gp 基質の NER は 2~21 を示したが、P-gp 非基質の NER は約 1 を示した (Figure 9)。

96-well plate における評価化合物の P_{app} 、ER および NER は 24-well plate と同等であり、P-gp 基質性の指標である NER の 24-well plate と 96-well plate の相関は $r^2 = 0.99$ と高い値を示した (Figure 10)。

2) 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価の再現性

96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価の再現性を positive control: verapamil、negative control: caffeine を用いて調べた。10 試験における両化合物の NER の平均値 \pm 標準偏差 (SD) は verapamil: 3.83 ± 0.27 、caffeine: 0.93 ± 0.07 を示し、CV 値は verapamil: 7%、caffeine: 8%であった (Figure 11)。

3) Digoxin を基質としたヒト P-gp 阻害性評価

典型的 P-gp 基質である digoxin をプローブ基質として、既知の P-gp 阻害剤である verapamil、quinidine、ketoconazole、elacridar を用いて 24-well plate および 96-well plate にてヒト P-gp 阻害性評価を実施した。Digoxin は化学的に安定で細胞を用いた評価における代謝安定性も高く、ヒト P-gp に対する K_m 値が高いため、基質濃度: 0.05 μ M-10 μ M においてヒト P-gp 輸送活性が飽和しないことが報告されている (Keogh and Kunta, 2006)。規制当局のガイドラインでは *in vitro* および *in vivo* においてヒト P-gp 基質性評価におけるプローブ基質としての使用が推奨されており、これまで多くの製薬会社で長く使用されてきた (Bentz et al., 2013; Ellens et al., 2013)。

全ての評価化合物において digoxin の $P_{app, B \text{ to } A}$ は、濃度依存的に減少した (Figure 12)。評価化合物の IC_{50} 値は 0.06~22 μ M の間で、各化合物の 24-well plate と 96-well plate の IC_{50} 値はほぼ同等な値を示した (Table 4)。

第四節 考察

本章ではヒト P-gp 基質性評価のハイスループット化を目指し、ヒト P-gp をトランスフェクションした LLC-PK1-P-gp 細胞を用いた 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価法の構築を行い、様々な特性をもつ化合物 (P-gp 基質、P-gp 非基質、高膜透過性、低膜透過性) を用いて、本評価法の validation を実施した。

各 well の溶液の交換を自動的に実施できる microplate washer を使用することで、細胞洗浄を簡便に短時間で実施できることを可能にした。各 well を細胞培養用の培地から transport buffer へ置換する際、24-well plate では手動にてこの洗浄工程を行うが、1 plate 実施するのに 240 秒要し、24-well plate を 4 plate (96 well 分) 実施するのに 960 秒要する。しかし、microplate washer を使用して 96-well plate を 1 plate (96 well 分) 実施する場合、30 秒で洗浄工程が実施可能である。例えば 32 化合物を $n=3$ で評価する場合、24-well plate を用いた評価では 16 plate 必要となり洗浄工程に 64 分かかかるが、96-well plate で実施する場合、4 plate のみで、洗浄工程は 2 分で実施可能となり、大幅な時間短縮が可能となった。また microplate washer では溶液の分注、吸引を行うニードルの高さや、スピードを調節出来るため、細胞単層膜のタイトジャンクションを破壊しない最適な条件で 96 well 同時に洗浄できる。以上のことより microplate washer を使用することで 96-well plate の各 well の transport buffer による洗浄・置換は効率的かつ正確に実施できるようになり、評価法のハイスループット化へ貢献した。また 96-well plate での播種細胞条件を検討し

たところ、Table 1 に示すように 1 well 当たりの播種細胞数を 24-well plate より増やすことで、培養期間を 3 日間減少させることができ、この培養期間短縮も評価法の効率化へ貢献した。

96-well plate における評価の validation を実施するため、Table 2 に示す様々な特性を持つ計 9 化合物を 24-well plate および 96-well plate で評価し、評価結果を比較した。両 plate における P_{app} は同等の結果を示し (Figures 6, 8)、両 plate 間における NER は高い相関を示した (Figure 10)。両 Plate における P_{app} 、NER は以前報告されている結果とも一致している (Polli et al., 2001; Wandel et al., 2002; Wang et al., 2005; Ohashi et al., 2006; Takeuchi et al., 2006; Feng et al., 2008; Inoue et al., 2012)。また細胞単層膜のタイトジャンクションの形成については、96-well plate における膜透過性の低い fexofenadine、atenolol の P_{app} は低く、文献値、24-well plate と一致していたため、96-well plate においても良好な単層膜が形成していることが示された。更に Figure 11 に示すように 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価結果は高い再現性が確認できた。以上のことから、本章で構築した microplate washer を使用した 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価は良好な細胞膜単層膜形成を示し、ヒト P-gp 輸送活性も 24-well plate と同程度で高い再現性があり、assay volume が減少することで試薬使用量を削減できるため、効率的で高質かつ低コストなことが示され、創薬研究においては大変魅力的でハイスループットな評価法であると考えられた。

次に、本章で構築した評価法を活用したヒト P-gp 阻害性評価法の validation を実施した。Digoxin は P-gp 基質としてよく知られており、規制当局のガイドラインにおいてプローブ基質として使用することが推奨されている。よって 1 μ M digoxin をプローブ基質とし、評価化合物として既知 P-gp 阻害剤である verapamil、quinidine、ketoconazole、elacridar を用いて 24-well plate および 96-well plate にてヒト P-gp 阻害性評価を実施し、その結果を比較した。各評価化合物の 24-well plate と 96-well plate の阻害曲線および IC₅₀ 値はほぼ同等な結果を示し (Table 4、Figure 12)、またこれらの結果は以前報告された IC₅₀ 値とも一致した (Taub et al., 2005; Keogh and Kunta, 2006; Rautio et al., 2006; Sugimoto et al., 2011b; Bentz et al., 2013)。以上のことから、本章にて構築した 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価法を用いたヒト P-gp 阻害性評価は、24-well plate と同等な結果を示し、かつスループットも向上したため、高質かつ効率的なヒト P-gp 阻害評価法であることが示された。

Table 1. Assay conditions of human P-gp-mediated transport assay in 24-well and 96-well Multiwell Insert Systems.

Assay conditions	24-well plate	96-well plate
Cell amount (/well)	4×10^4	7×10^4
Membrane are ^{a)} (cm ² /well)	0.33	0.0804
Cell growth time ^{b)} (day)	8	5
Assay volume of apical (μL)	400	80
Assay volume of basal (μL)	800	270
Wash procedure	Manual	Microplate washer
Wash time (sec/plate)	240	30

a) apical well の細胞を播種する membrane の底面積

b) 細胞播種後から Assay 実施までの培養日数

Table 2. Test compounds used in human P-gp-mediated transport assay.

Compound	P-gp substrate ^{a)}	Permeability ^{b)}
Verapamil	Yes	High
Quinidine	Yes	High
Risperidone	Yes	High
Loperamide	Yes	Middle
Digoxin	Yes	Low
Fexofenadine	Yes	Low
Caffeine	No	High
Propranolol	No	Middle
Atenolol	No	Low

a) 文献 (Polli et al., 2001; Wandel et al., 2002; Wang et al., 2005; Ohashi et al., 2006; Takeuchi et al., 2006; Feng et al., 2008; Inoue et al., 2012) にて P-gp 基質であることが報告されているものは「Yes」と記載した。

b) 文献 (Polli et al., 2001; Wandel et al., 2002; Wang et al., 2005; Ohashi et al., 2006; Takeuchi et al., 2006; Feng et al., 2008; Inoue et al., 2012) にて LLC-PK1 または MDCKII 細胞における P_{app} が以下の範囲の値を示すものを「High」、「Middle」、「Low」と記載した。

High: $P_{app} \geq 20 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$

Middle: $20 \times 10^{-6} \text{ cm/sec} > P_{app} \geq 5 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$

Low: $P_{app} < 5 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$

Table 3. Analytical conditions in LC-MS/MS analysis.

Compound	Ionization mode	Precursor /product ion	Mobile Phase	
			A	B
Verapamil	ESI, positive	455.4/165.2	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Quinidine	ESI, positive	325.3/79.0	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Loperamide	ESI, positive	478.3/267.1	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Digoxin	ESI, negative	825.5/779.2	0.1% Formic acid	Acetonitrile
Risperidone	ESI, positive	411.2/191.2	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Fexofenadine	ESI, positive	502.5/466.3	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Atenolol	ESI, positive	267.2/190.1	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Propranolol	ESI, positive	260.3/116.0	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Caffeine	ESI, positive	195.2/138.2	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile

LC/MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Table 4. IC₅₀ values calculated from P_{app} , B to A of digoxin in the presence of verapamil, quinidine, ketoconazole and elacridar in 24-well and 96-well plates.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	24-well plate	96-well plate
Verapamil	19.1	14.1
Quinidine	15.2	21.5
Ketoconazole	5.01	6.11
Elacridar	0.0632	0.0693

IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration; P_{app} : apparent permeability coefficient

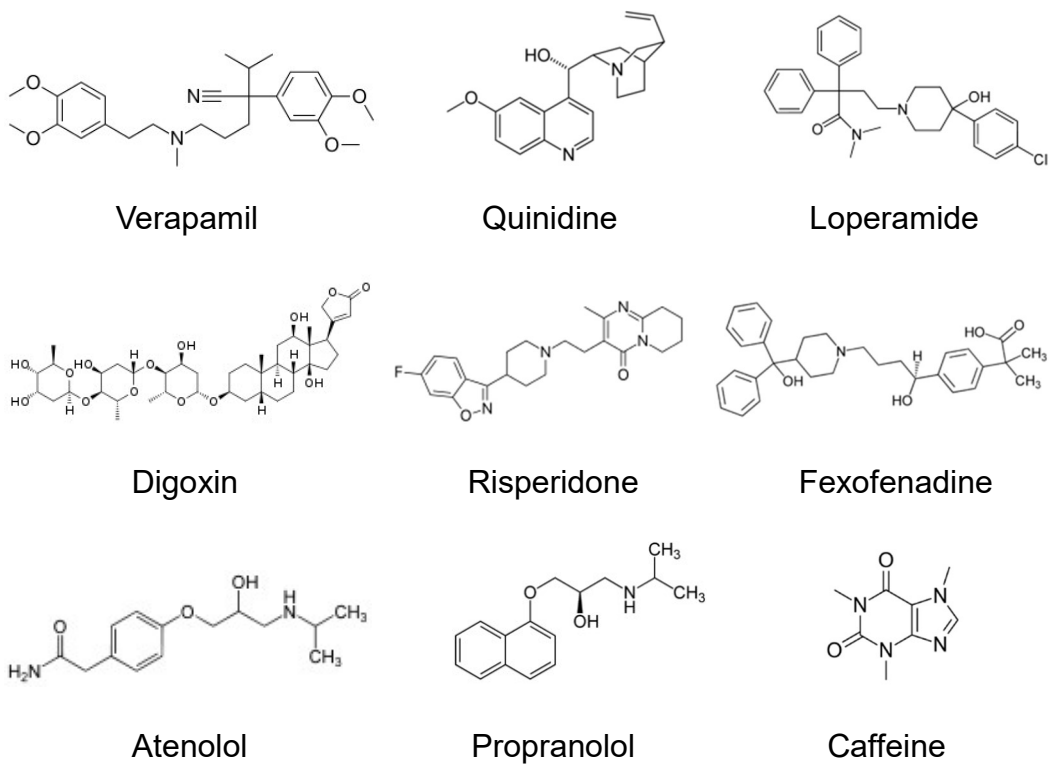


Figure 4. Chemical structures of test compounds used in human P-gp-mediated transport assay for the identification of substrates.



Figure 5. Chemical structures of test compounds used in human P-gp-mediated transport assay for the identification of inhibitors.

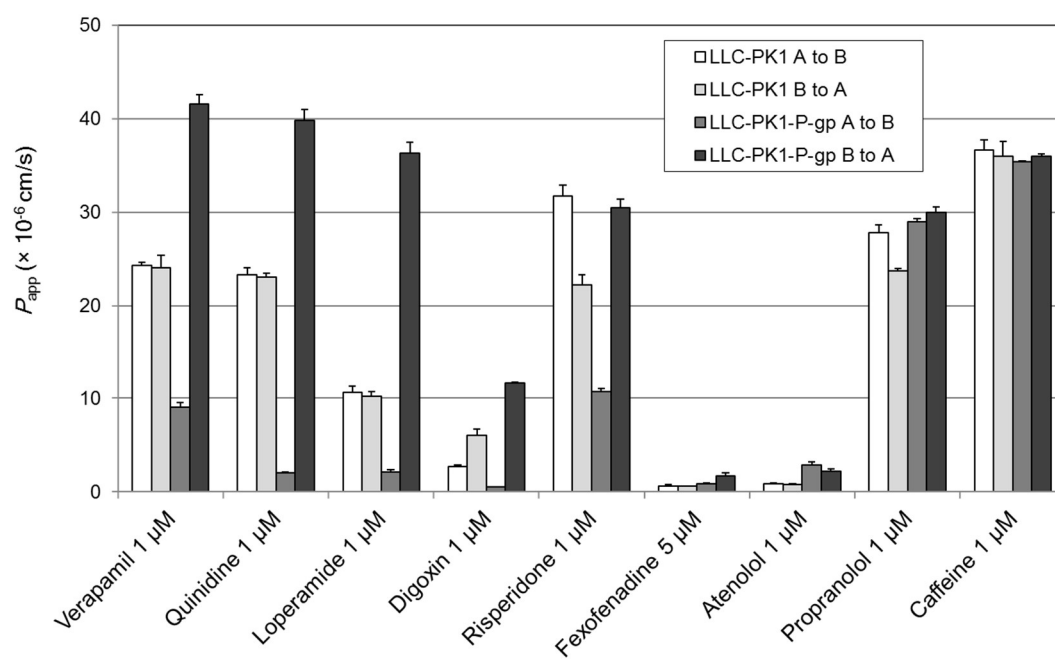


Figure 6. P_{app} of test compounds across LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in 24-well plate. Data represent average \pm SD of 3 replicates. P_{app} : apparent permeability coefficient; SD: standard deviation

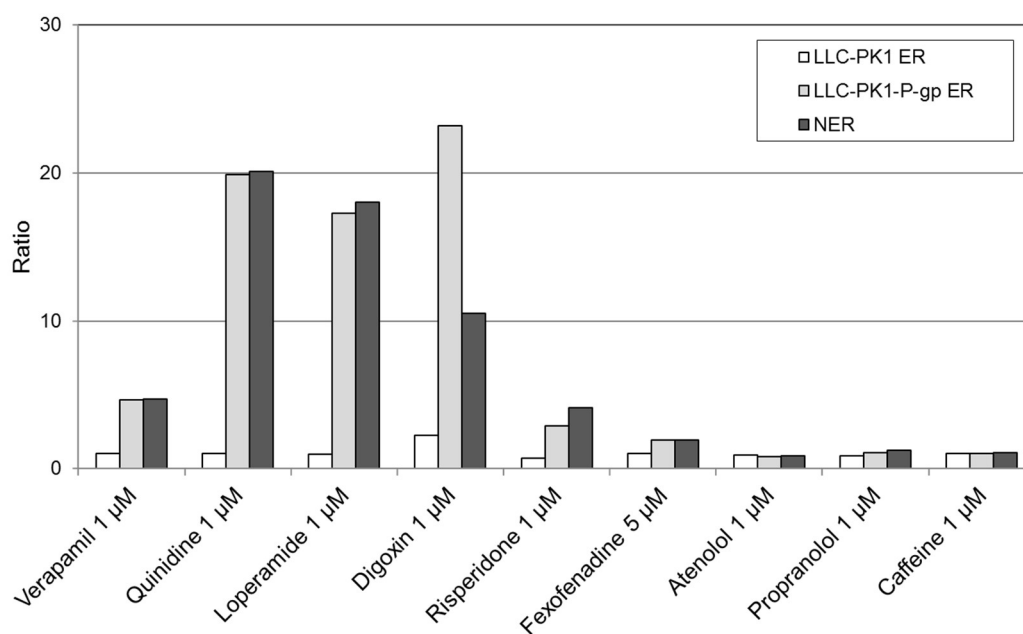


Figure 7. ER and NER of test compounds across LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in 24-well plate. ER: efflux ratio; NER: net efflux ratio

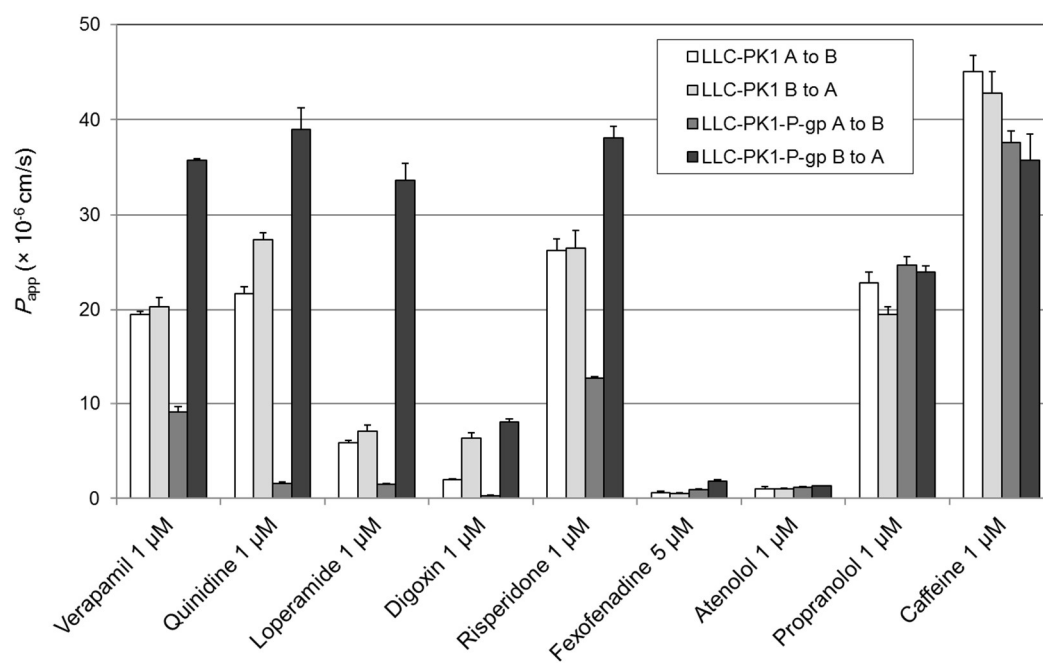


Figure 8. P_{app} of test compounds across LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in 96-well plate. Data represent average \pm SD of 3 replicates. P_{app} : apparent permeability coefficient; SD: standard deviation

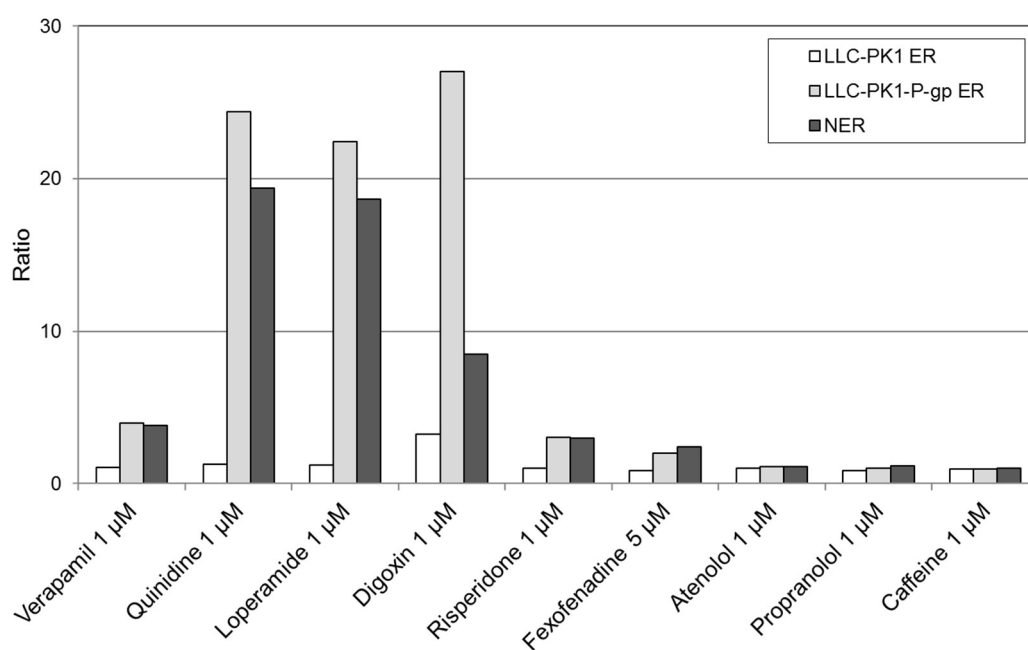


Figure 9. ER and NER of test compounds across LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in 96-well plate. ER: efflux ratio; NER: net efflux ratio

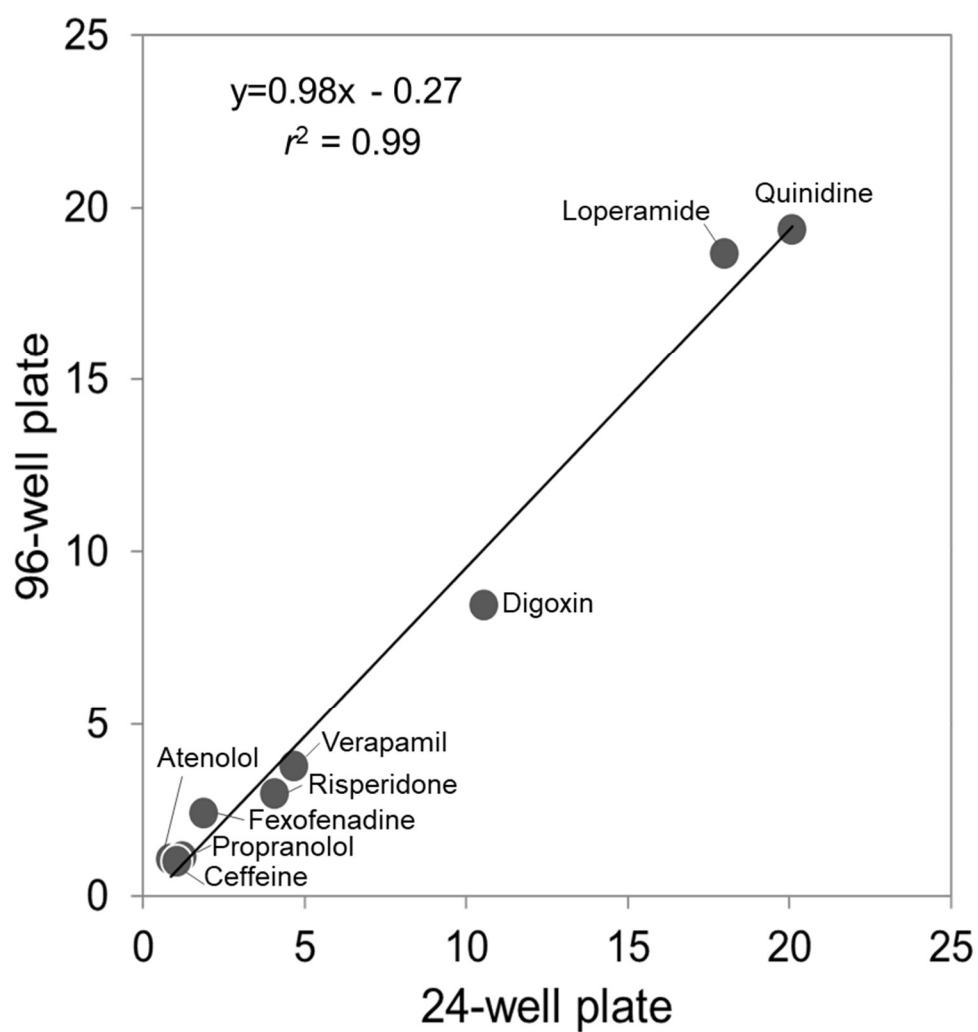


Figure 10. Correlation of NER of test compounds across LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in 24- and 96-well plates. NER: net efflux ratio

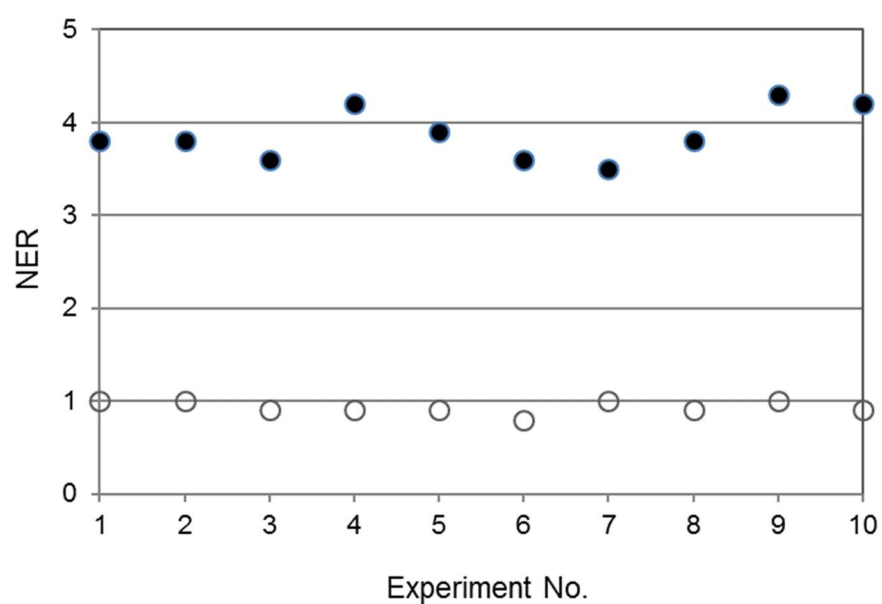
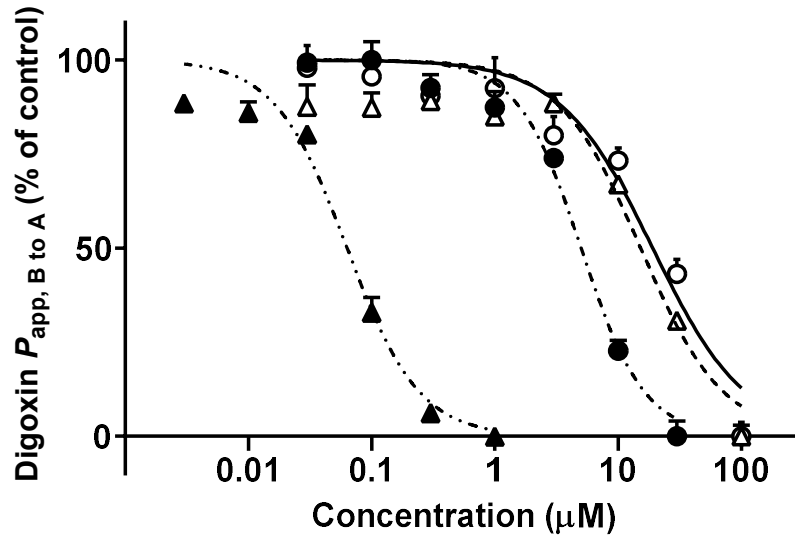


Figure 11. Reproducibility of the 96-well transport assay using LLC-PK1 cells transfected with human P-gp based on two quality control compounds (verapamil (●) and caffeine (○)) over 10 experiments. The CVs were 7% for verapamil and 8% for caffeine. CV: coefficient of variation

(A)



(B)

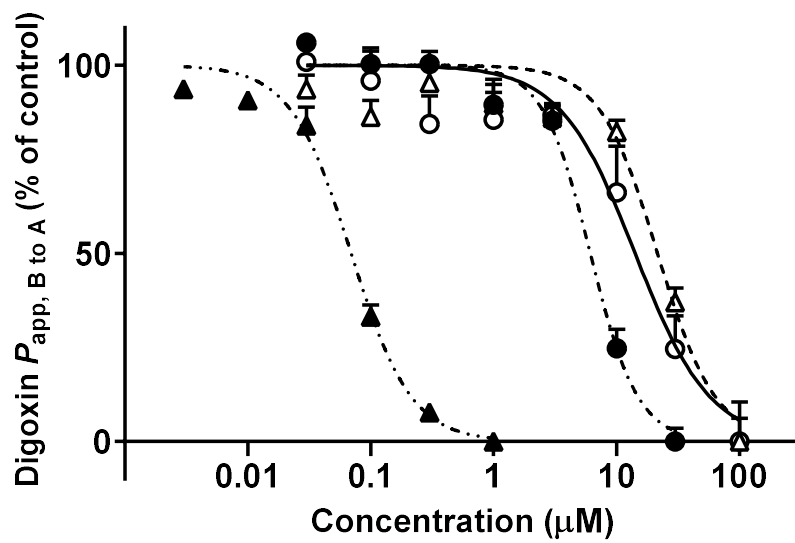


Figure 12. Concentration-dependent inhibition of $P_{app, B \text{ to } A}$ of digoxin (1 μM) by verapamil (\circ), quinidine (Δ), ketconazole (\bullet) and elacridar (\blacktriangle) in 24-well plate (A) and 96-well plate (B). Data represent average \pm SD of 3 replicates. P_{app} : apparent permeability coefficient; SD: standard deviation

第二章

LLC-PK1 細胞に発現する

内在性 Bcrp のヒト P-gp 基質性評価への影響

第一節 背景

ヒト P-gp 基質性評価に用いる細胞としてイヌ腎臓由来の MDCKII 細胞またはブタ腎臓由来の LLC-PK1 細胞が親株として一般的に広く使用されているが、MDCKII は内在性イヌ P-gp、イヌ Mrp2 が発現しており、これらトランスポーターがヒト P-gp 基質性判断を過小評価することが報告されている (Goh et al., 2002; Giri et al., 2009; Kuteykin-Teplyakov et al., 2010; Di et al., 2011; Mease et al., 2012; Li et al., 2013; Wang et al., 2013)。一方、LLC-PK1 細胞では内在性トランスポーターであるブタ P-gp、ブタ Mrp2 は発現しているが、ヒト P-gp 基質性評価へ与える影響は小さいと報告されているため (Goh et al., 2002; Kuteykin-Teplyakov et al., 2010)、第一章では P-gp 基質性評価の親株として LLC-PK1 細胞を選択し、96-well ヒト P-gp 基質性評価法を構築した。

これまで LLC-PK1 細胞における発現が報告されている内在性トランスポーターはいくつかあるが、ブタ Bcrp に関する発現の報告はなかった。ヒト BCRP 基質はヒト P-gp の基質になることも多く (Xiao et al., 2006; Giacomini et al., 2010; Agarwal et al., 2011)、例えば LLC-PK1 細胞にブタ Bcrp が発現し、ヒト BCRP 基質の輸送活性が高かった場合、ヒト P-gp およびヒト BCRP 両方の基質となる化合物を LLC-PK1 細胞を用いたヒト P-gp 基質性評価法にて評価すると、ブタ Bcrp がヒト P-gp 基質性判断に影響を与える可能性が考えられた。よって本章では LLC-PK1 におけるブタ Bcrp の機能を明らかにするために quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) によりブタ Bcrp の発現を調べ、ヒト BCRP 基質および非基質 (Figure 13)、BCRP

阻害剤である Ko 143 (Figure 14) を用いてヒト P-gp 基質性評価を実施し、ブタ Bcrp のヒト P-gp 基質性評価に与える影響について調べた。Daidzein、dantrolene、triamterene はヒト BCRP 単独の基質であるが、prazosin、fluvastatin、gefitinib はヒト P-gp とヒト BCRP の両方の基質化合物である (Enokizono et al., 2007; Enokizono et al., 2008; Zhou et al., 2009; Agarwal et al., 2010; Ni et al., 2010; Li et al., 2011; Poirier et al., 2014b)。

第二節 実験材料および実験方法

1) 実験材料

LLC-PK1 細胞は ATCC (Manassas, VA, USA) から購入した。LLC-PK1-P-gp 細胞は LLC-PK1 細胞にヒト *MDR1* cDNA をトランスフェクションして樹立した細胞である (Tanigawara et al., 1992; Ueda et al., 1992)。LLC-PK1-P-gp 細胞 (LLC-GA5-CoL150) は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研バイオリソース研究センターから提供して頂いた。PREADY-PORT BCRP_96 (MDCKII および MDCKII-BCRP が assay 用 Plate に播種されたもの) は SOLVO Biotechnology (Szeged, Hungary) から購入した。Medium 199 (Cat No: 11150)、ペニシリン-ストレプトマイシン (Cat No: 15070)、FBS (Cat No: 10099141)、0.05% トリプシン-EDTA (Cat No: 25300)、HBSS (Cat No: 14025)、1 M HEPES (Cat No: 15630)、Power SYBR Green Master Mix (Cat No: 4368577)、High capacity RNA-to-cDNA Kit (Cat No: 4388950) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。RNeasy 96 Kit (Cat No: 74182)、RNase-Free DNase Set (Cat No: 79254) は QIAGEN (Venlo, Netherlands) から購入した。Verapamil (Cat No: V4629)、prazosin (Cat No: P7791)、dantrolene (Cat No: D9175)、triamterene (Cat No: T4143) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Daidzein (Cat No: 10005166)、gefitinib (Cat No: 13166) は Cayman (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。Fluvastatin (Cat No: F0820) は東京化成工業 (東京、日本) から購入した。Ko 143 (Cat No: K655000) はコスモバイオ (東京、日本) から購入

した。アセトニトリル (Cat No: 015-08633)、colchicine (Cat No: 035-03853) は和光純薬 (大阪、日本) から購入した。Millicell-96 Cell Culture Insert Plate (Cat No: PSRP004R5) は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した。LightCycler 480 System II は Roche Applied Science (Mannheim, Germany) から購入した。Microplate washer (HydroSpeed™) は TECAN (Mannedorf, Switzerland) から購入した。

2) 細胞培養

LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞は 10% FBS、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む Medium 199 培地中で plastic culture dishes を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて培養した。LLC-PK1-P-gp 細胞の培地には Colchicine (150 ng/mL) を添加した。細胞は 60-80%コンフルエンスに達した時点で 0.05% トリプシン-EDTA を用いて 2-3 日おきに継代培養した。LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞は 1.5×10^4 cells/well で Millicell-96 Cell Culture Insert Plate に播種した。播種 2 日後に新鮮な培地に置換し、播種 5 日後にヒト P-gp 基質性評価を実施した。

また本章では、第一章で構築した 96-well ヒト P-gp 基質性評価法を一部改良している。改良点は transport assay 用 plate と plate への播種細胞数である。Transport assay 用 plate は第一章では 96-well Multiwell Insert Systems (membrane area: 0.0804 cm²) であったが、本章では membrane area が広く、化合物輸送量がより多い Millicell-96 Cell Culture Insert Plate (membrane

area: 0.11 cm²) を使用した。細胞播種数は第一章では 7×10^4 cells/well であったが、本章では plate 変更に伴い細胞播種数を検討し、播種細胞がより少ない 1.5×10^4 cells/well に変更し、verapamil、quinidine、loperamide、digoxin、propranolol、caffeine にて第一章と同等の結果が得られることを確認した。

3) qRT-PCR

Thermo Fisher Scientific 社のプロトコルに従い RNeasy 96 Kit および RNase-Free DNase Set を使用して、LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞から total RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit を使用して mRNA を逆転写反応させ cDNA を得た。Power SYBR Green Master Mix を使用して qRT-PCR 反応を実施した。PCR 反応は酵素活性化ステップとして 95°C 10 分を 1 サイクル、その後 95°C 15 秒、60°C 60 秒を 1 サイクルとし 45 サイクル反応させた。使用した PCR プライマーはヒト P-gp; 5'-GGA GCC TAC TTG GTG GCA CAT AA-3' (forward)、5'-TGG CAT AGT CAG GAG CAA ATG AAC-3'(reverse)、ブタ P-gp; 5'-ATT GCC CAG ATAACA GCA CCA C-3'(forward)、5'-AAC CTG GAT GTA AGC AGC AAC AAG-3'(reverse)、ブタ Bcrp; 5'-CAC AAC TGG CTT AGA CTC CAG CA-3'(forward)、5'-CCA ACA AGG TGA GGC TAT CAA ACA-3'(reverse)、ブタ *Gapdh*; 5'-CAG AAC ATC ATC CCT GCT TCC A-3'(forward)、5'-CGG CAG GTC AGA TCC ACA AC-3'(reverse) である。LightCycler 480 System II を使用し qRT-PCR 解析を実施した。ブタ *Gapdh* をコントロールサンプルとし各 mRNA 発現量の補正を実施した。

4) ヒト P-gp 基質性評価

Transport buffer は 1 M HEPES を HBSS にて希釈し、25 mM HEPES/HBSS を調製し、1 M NaOH により pH 7.4 に調整したものを使用した。Microplate washer を使用して Millicell-96 Cell Culture Insert Plate の培地を 37°C の transport buffer により 2 回洗浄後、置換し 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて 1 時間 pre-incubation を実施した。BCRP 阻害剤である 0.2 μM Ko143 を添加または非添加の 1 μM 評価化合物を含んだ transport buffer を donor 側へ、0.2 μM Ko143 を添加または非添加の transport buffer を receiver 側へ置換し、donor 側から 0 時間のサンプル採取 (30 μL) 後、Millicell-96 Cell Culture Insert Plate を 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて静置し、評価を開始した。Assay volume は apical 側: 120 μL、basal 側: 270 μL で実施した。3 時間 incubation 後に receiver 側からサンプル採取した (30 μL)。

5) ヒト BCRP 基質性評価

READYPORT BCRP₉₆ を使用し、SOLVO のプロトコルに従い MDCKII および MDCKII-BCRP 細胞を用いてヒト BCRP 基質性評価を実施した。READYPORT BCRP₉₆ の培地を transport buffer に置換し 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて 30 分 pre-incubation を実施した。1 μM 評価化合物を含んだ transport buffer を donor 側へ、評価化合物を含まない transport buffer を receiver 側へ置換し、donor 側から 0 時間のサンプル採取

(25 μ L) 後、PREADYPORT BCRP_96 を 37°C、5% CO₂ の条件下で CO₂ インキュベーターにて静置し、ヒト BCRP 基質性評価を開始した。Assay volume は apical 側:75 μ L、basal 側:250 μ L で実施した。2 時間 incubation 後に receiver 側からサンプル採取した (25 μ L)。

6) 定量

採取したサンプルを 80% (v/v) アセトニトリルと混合し (LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞:170 μ L、MDCKII および MDCKII-BCRP 細胞:175 μ L)、4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS により分析した。LC-MS/MS は ACQUITY UPLC® (Waters, MA, USA) と Xevo TQ (Waters, MA, USA) または Xevo TQ-S (Waters, MA, USA) を組み合わせて使用した。分析サンプルは、TSKgel ODS-120H、1.9 μ m、2.0 \times 30 mm (東ソー、東京、日本) を使用して、流速 0.9 mL/min、カラム温度 50°Cでカラム分離した。移動相 B 液の初期濃度は 5%で、次の 0.2 分間で移動相 B 液を 85%まで直線的に増加させ、0.47 分間保持し、その後、移動相 B を 5%に戻し、平衡化のために 0.07 分間保持した。MS/MS 分析は MRM 条件でイオン検出し、各化合物の LC-MS/MS 条件は Table 5 に示した。

7) 解析

P_{app} 、ER、NER は下記の計算式 (1) - (3) を用いて算出した。

$$P_{app} = \frac{R \times V_R}{Area \times D_0 \times Time} \quad (1)$$

$$ER = \frac{P_{app, B \text{ to } A}}{P_{app, A \text{ to } B}} \quad (2)$$

$$NER = \frac{ER_{P-gp \text{ or } BCRP}}{ER_{WT}} \quad (3)$$

R は receiver 側の incubation 終了時の濃度 (μM)、 V_R は receiver 側の容量 (mL)、Area は Millicell-96 Cell Culture Insert Plate の membrane area (cm^2)、 D_0 は donor 側の incubation 開始時の濃度 (μM)、Time は incubation 時間 (sec)である。

第三節 結果

1) qRT-PCR によるブタ P-gp, ブタ Bcrp, ヒト P-gp の mRNA 発現解析

LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞におけるブタ Bcrp、ブタ P-gp およびヒト P-gp の mRNA レベルを qRT-PCR により定量した (Figure 15)。ブタ Bcrp およびブタ P-gp の mRNA は LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞で検出された。また LLC-PK1-P-gp 細胞のヒト P-gp の mRNA 発現レベルは LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞の内在性ブタ P-gp の mRNA 発現レベルよりも有意に高く、以前の報告と一致した (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010)。

2) ヒト BCRP 基質を用いたヒト P-gp 基質性評価

LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp の活性およびヒト P-gp 基質性評価に与える影響を調べるため、LLC-PK1 および LLC-PK1-P-gp 細胞において既知のヒト BCRP 基質 6 化合物のヒト P-gp 基質性評価を実施した (Table 6)。ヒト BCRP 基質には daidzein、dantrolene、triamterene、prazosin、fluvastatin、gefitinib を用い、negative control としてヒト P-gp 基質でありヒト BCRP 非基質の verapamil を用いて評価した。その結果、LLC-PK1 細胞において全 BCRP 基質の ER は ≥ 2 を示した。BCRP 選択的阻害剤である Ko143 添加時、ヒト BCRP 基質化合物の LLC-PK1 細胞における ER は 1.54 以下へ減少した。ヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質化合物である prazosin、fluvastatin、gefitinib の Ko143 非添加時の NER はそれぞれ 1.35、1.66、2.47 であったが、Ko143 添加時にはそれぞれ 2.11、3.08、5.96 と増加し、3 化合物とも ≥ 2 を示

した。一方、P-gp 基質である verapamil の ER は Ko143 非添加および添加群で 1 付近であり、NER は Ko143 非添加および添加群において 3.66、3.17 を示した。

3) ヒト BCRP 基質を用いた MDCKII 細胞におけるヒト BCRP 基質性評価

評価に用いたヒト BCRP 基質 6 化合物およびヒト BCRP 非基質である verapamil におけるヒト BCRP 基質性を調べるため、MDCKII 細胞におけるヒト BCRP 基質性評価を実施した (Table 7)。Verapamil の ER および NER は <2 となり、ヒト BCRP 基質でないことが示された。また全 BCRP 基質化合物の NER は ≥ 2 となり、これら化合物がヒト BCRP 基質であることが示された。評価化合物 7 化合物の MDCKII および MDCKII-BCRP 細胞における NER と LLC-PK1 細胞の ER を比較したところ、 $r^2 = 0.92$ と高い相関を示した (Figure 16)。

第四節 考察

本章では LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp の発現および輸送活性を明らかにし、ヒト P-gp 基質性評価への影響を調べた。qRT-PCR による解析ではブタ Bcrp の mRNA が検出され、LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp の mRNA の発現が確認された。次に LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp の活性を確認するため、複数のヒト BCRP 基質および BCRP 阻害剤である Ko143 を用いてヒト P-gp 基質性評価を行った。Ko143 は BCRP の輸送活性を完全に阻害し、P-gp および MRP2 の輸送活性を阻害しない 0.2 μ M にて使用した (Allen et al., 2002; Pan et al., 2007; Giri et al., 2009; Matsson et al., 2009; Agarwal et al., 2010; Romermann et al., 2015)。LLC-PK1 細胞では Ko143 非添加時、全 BCRP 基質化合物は $ER \geq 2$ を示したが、Ko143 添加時、全 BCRP 基質化合物の ER は ≤ 1.54 へ減少したことから、LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp はヒト BCRP 基質の輸送活性を持つことが明らかとなった。またヒト BCRP 基質である daidzein、dantrolene、triamterene は Ko143 添加時および非添加時において $NER < 2$ を示し、規制当局ガイドラインの判断基準ではヒト P-gp 非基質と判断されるため、ヒト P-gp 基質性は正しく評価された。一方、ヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質化合物である prazosin、fluvastatin、gefitinib の Ko143 非添加時の NER はそれぞれ 1.35、1.66、2.47 を示し、Ko143 添加時の NER はそれぞれ 2.11、3.08、5.96 を示した。規制当局ガイドラインの判断基準では Ko143 非添加時は prazosin、fluvastatin はヒト P-gp 非基質と判断されるが、Ko143 を添加し、ブタ Bcrp の輸送活性を阻害した場合は

NER ≥ 2 となりヒト P-gp 基質と判断される。以上のことより LLC-PK1 細胞に発現するブタ Bcrp はヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質となる化合物のヒト P-gp 基質性評価においてヒト P-gp 基質性を過小評価する場合があることが示された。Ko143 非添加時において gefitinib はヒト P-gp 基質性を過小評価されなかったが、prazosin および fluvastatin はヒト P-gp 基質性を過小評価する結果を示した。これはヒト P-gp 基質性があまり高くなく、ブタ Bcrp 基質性が高く、ブタ Bcrp によってより輸送され易い化合物は LLC-PK1 細胞の ER が高くなり、LLC-PK1-P-gp 細胞の ER との差が小さくなるため、NER <2 を示すことが原因と考えられた。

ヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質となる化合物は経口投与後の体内への吸収や組織移行性が単一のトランスポーターの基質化合物より低くなることが報告されている (Oostendorp et al., 2009; Agarwal et al., 2011)。そのため、ヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質となる化合物のヒト P-gp 基質性を正しく評価できないことは大きな過小評価となり、創薬段階の薬物動態評価において避けたい false-negative である。よって本研究にて LLC-PK1 細胞に発現するブタ Bcrp のヒト P-gp 基質性評価への影響を明らかにしたことは、より正確なヒト P-gp 基質性評価に向けて大変有益な情報であると考えられた。更に本研究では BCRP 選択的阻害剤を添加しヒト P-gp 基質性評価を実施することでブタ Bcrp のヒト P-gp 基質性評価への影響を抑え、より正確なヒト P-gp 基質性評価が実施可能であることを示し、ヒト P-gp 基質性予測精度の向上につながると考えられた。

次に、BCRP 基質化合物の LLC-PK1 細胞における ER と MDCKII および MDCKII-BCRP 細胞における NER を比較したところ高い相関が認められ($r^2 = 0.92$)、本章で用いた評価化合物ではブタ Bcrp とヒト BCRP の基質特異性に高い相関があることが示された。LLC-PK1-P-gp 細胞を用いたヒト P-gp 基質性評価ではヒト P-gp およびヒト BCRP の両方の基質となる化合物の NER はヒト P-gp 基質性を過小評価してしまうことがあるが、これら化合物の LLC-PK1 細胞の ER はヒト BCRP 基質性の予測できる可能性があることが示された。もちろん評価化合物の正確なブタ Bcrp またはヒト BCRP の基質性を確認するためには、BCRP 選択的阻害剤を用いた評価やヒト BCRP を発現する細胞を用いたヒト BCRP 基質性評価の実施が必要である。

Table 5. Analytical conditions in LC-MS/MS analysis.

Compound	Ionization mode	Precursor/ product ion	Mobile Phase	
			A	B
Verapamil	ESI, positive	455.4/165.2	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Daidzein	ESI, positive	255.0/199.0	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Dantrolene	ESI, negative	313.1/227.7	0.1% Formic acid	Acetonitrile
Triamterene	ESI, positive	254.1/237.1	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Prazosin	ESI, positive	384.1/247.0	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Fluvastatin	ESI, positive	412.3/265.6	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile
Gefitinib	ESI, positive	447.2/128.1	20 mM Acetic ammonium	Acetonitrile

LC/MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Table 6. P_{app} , ER and NER of test compounds in LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells in the absence or presence of BCRP inhibitor Ko143. Data represent mean \pm SD (n = 3).

Substrate	Ko143	LLC-PK1						LLC-PK1-P-gp						NER
		$P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$						$P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$						
		A to B		B to A		ER		A to B		B to A		ER		
Verapamil	-	23.79	± 1.74	23.64	± 1.22	0.99		9.68	± 1.11	35.04	± 1.88	3.62		3.66
	+	22.56	± 0.99	23.75	± 0.35	1.05		11.31	± 0.38	37.70	± 3.21	3.33		3.17
Daidzein	-	11.21	± 0.80	35.37	± 1.67	3.16		15.36	± 4.88	26.74	± 1.42	1.74		0.55
	+	20.80	± 0.91	21.36	± 0.92	1.03		18.89	± 0.87	20.06	± 0.82	1.06		1.03
Dantrolene	-	11.78	± 0.43	34.48	± 1.94	2.93		10.02	± 0.93	30.53	± 4.33	3.05		1.04
	+	23.68	± 0.25	28.86	± 0.96	1.22		18.57	± 0.52	33.98	± 2.24	1.83		1.50
Triamterene	-	7.42	± 0.84	19.93	± 1.62	2.69		7.20	± 1.01	20.80	± 0.06	2.89		1.07
	+	11.26	± 0.65	15.99	± 1.99	1.42		9.88	± 0.83	23.21	± 0.49	2.35		1.65
Prazosin	-	9.37	± 0.93	27.65	± 0.63	2.95		6.99	± 0.65	27.76	± 1.85	3.97		1.35
	+	15.92	± 0.50	21.94	± 0.76	1.38		9.09	± 1.55	26.47	± 2.00	2.91		2.11
Fluvastatin	-	3.74	± 0.92	17.06	± 1.04	4.56		2.60	± 0.16	19.72	± 3.49	7.58		1.66
	+	8.57	± 1.19	13.22	± 1.25	1.54		4.45	± 0.93	21.10	± 3.19	4.74		3.08
Gefitinib	-	1.99	± 0.12	6.78	± 0.04	3.41		2.28	± 0.21	19.17	± 0.93	8.41		2.47
	+	1.70	± 0.12	2.54	± 0.20	1.49		2.44	± 0.35	21.66	± 3.52	8.88		5.96

P_{app} : apparent permeability coefficient; ER: efflux ratio; NER: net efflux ratio;

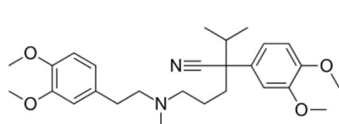
SD: standard deviation

Table 7. P_{app} , ER and NER of test compounds in MDCKII and MDCKII-BCRP cells. Data represent mean \pm SD (n = 3).

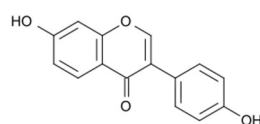
Substrate	MDCKII WT							MDCKII-BCRP							NER
	P_{app} (× 10 ⁻⁶ cm/s)						ER	P_{app} (× 10 ⁻⁶ cm/s)						ER	
	A to B			B to A				A to B			B to A				
Verapamil	11.14	±	0.91	12.88	±	0.86	1.16	12.45	±	0.82	19.18	±	1.38	1.54	1.33
Daidzein	3.44	±	0.19	2.02	±	0.09	0.59	1.26	±	0.08	35.26	±	1.59	27.98	47.42
Dantrolene	25.27	±	1.40	18.95	±	0.82	0.75	1.36	±	0.06	44.69	±	4.47	32.86	43.81
Triamterene	12.78	±	0.40	9.90	±	0.36	0.77	0.96	±	0.02	22.97	±	0.40	23.93	31.08
Prazosin	20.72	±	1.18	15.46	±	0.16	0.75	0.73	±	0.07	33.69	±	2.80	46.15	61.53
Fluvastatin	9.27	±	0.58	5.14	±	0.35	0.55	0.39	±	0.16	18.33	±	0.82	47.00	85.45
Gefitinib	0.93	±	0.24	0.64	±	0.06	0.69	0.45	±	0.12	19.40	±	1.72	43.11	62.48

P_{app} : apparent permeability coefficient; ER: efflux ratio; NER: net efflux ratio;

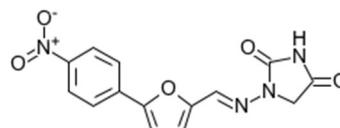
SD: standard deviation



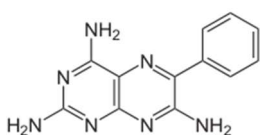
Verapamil



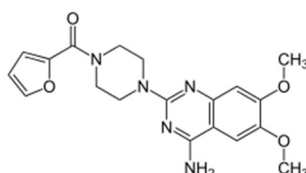
Daidzein



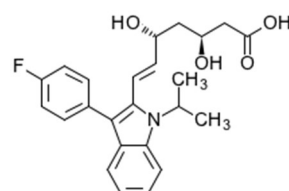
Dantrolene



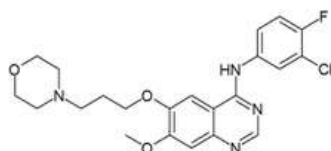
Triamterene



Prazosin



Fluvastatin



Gefitinib

Figure 13. Chemical structures of test compounds used in P-gp-mediated and BCRP-mediated transport assay for substrates.

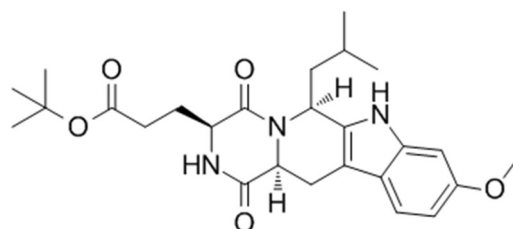


Figure 14. Chemical structures of Ko 143 used in P-gp-mediated and BCRP-mediated transport assay for inhibitor.

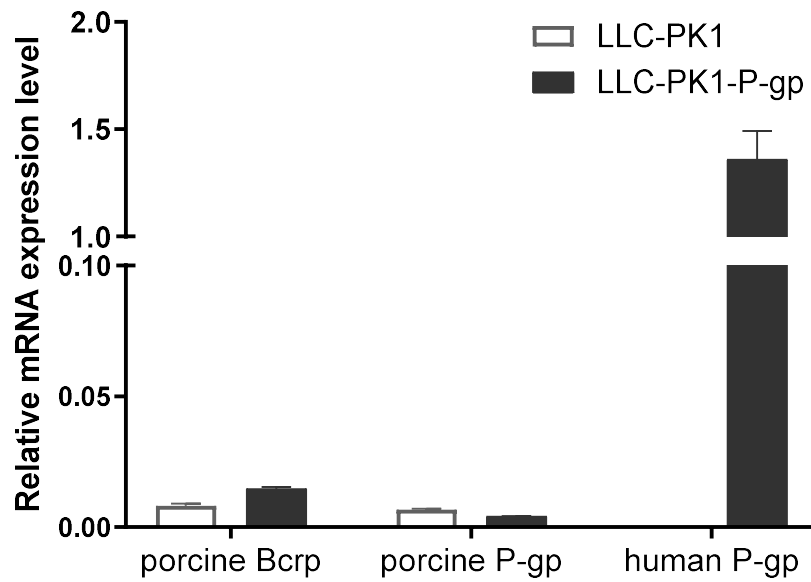


Figure 15. mRNA expression level of porcine Bcrp and P-gp, and human P-gp in LLC-PK1 and LLC-PK1-P-gp cells using qRT-PCR. The genes were normalized to porcine *Gapdh* mRNA expression. Data represent mean \pm SD (n = 4). SD: standard deviation

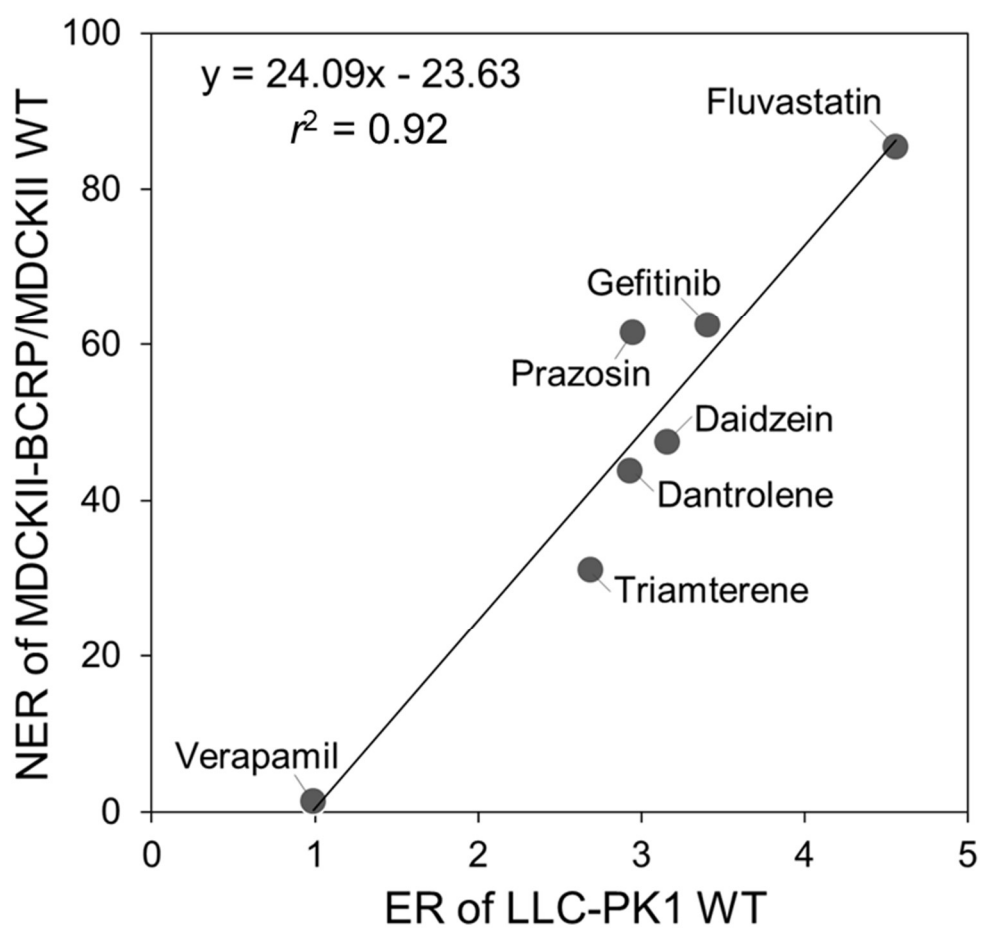


Figure 16. Correlation between the ER in LLC-PK1 cells and NER calculated from MDCKII and MDCKII-BCRP cells for seven test compounds.

ER: efflux ratio; NER: net efflux ratio

総括

ATP binding cassette トランスポーターの一種である P-gp はヒト体内において様々な組織に発現し、薬物の消化管での吸収、血中濃度の維持、血中からの消失、組織分布、排泄経路等の薬物動態に影響し、その薬物の有効性、安全性に影響を与えるため、開発する薬物がヒト P-gp の基質か否かを早い段階で正確に見極めることはとても重要である。FDA や厚生労働省の規制当局から薬物間相互作用に関するガイドラインが発行され、これらガイドラインではヒト P-gp が発現した細胞を用いた経細胞輸送評価の実施が推奨されており、この評価法はヒト生体内において P-gp が薬物の体内動態に与える影響と良く相関し、現段階では最も信頼性が高い評価法であることが報告されている。評価に用いる細胞としては MDCKII 細胞または LLC-PK1 細胞にヒト P-gp を強制発現させた細胞が一般的によく用いられているが、これら細胞にはそれぞれ内在性のトランスポーターが発現しており、特に MDCKII 細胞では内在性イヌ P-gp の発現が高く、ヒト P-gp 基質性評価に影響を与えることが複数報告されている。一方 LLC-PK1 細胞は内在性ブタ P-gp の発現量が低く、ヒト P-gp 基質性評価への影響は小さいことが報告されているため、より正確なヒト P-gp 基質性評価実施のためには LLC-PK1 細胞がより適した親株細胞と考え、本研究では LLC-PK1 細胞を親株として選択し、創薬の効率化を目指したヒト P-gp 基質性評価法の改善を行った。

経細胞輸送評価は細胞を用いた煩雑な手順を含む評価法のため 12-well plate や 24-well plate を用いて実施されることが多くスループットの低い評価法であった。創薬の成功確率向上のためにはより早期の薬物動態評価の実施は

有効な手段であるため、創薬段階早期におけるヒト P-gp 基質性評価実施のためのハイスループット化が必要であった。

以上のことより、第一章ではヒト P-gp 基質性評価実施のハイスループット化を目指し microplate washer を用いた効率的な 96-well plate におけるヒト P-gp 基質性評価法を構築した。本評価法は microplate washer を用いることにより正確に短時間で assay plate における transport buffer による洗浄・置換が可能となり、膜透過性およびヒト P-gp 輸送活性は 24-well plate と同等であり、また高い再現性があり、試薬使用量も削減できたことから、効率的に高質かつ低コストで実施できる評価法であることが示され、創薬研究において大変魅力的なハイスループットな評価法であると考えられた。アステラス製薬株式会社では本評価構築後にスループットが 4 倍となり、2010 年から 2019 年 3 月に至るまで約 6,000 の創薬段階の社内化合物を評価し、創薬研究に貢献した。

また、LLC-PK1 細胞に関する内在性トランスポーターについてはブタ P-gp、ブタ Mrp2 に関する報告はあったが、ブタ Bcrp の発現に関する報告はなかった。ヒト BCRP 基質はヒト P-gp の基質にもなることが多く、もし LLC-PK1 細胞にブタ Bcrp が発現し、ヒト BCRP 基質の輸送活性があった場合、LLC-PK1 細胞を用いたヒト P-gp 基質性評価においてブタ Bcrp はヒト BCRP の基質となる化合物のヒト P-gp 基質性判断に影響を与える可能性が考えられた。

よって、第二章では LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp について調べ、ブタ Bcrp が発現、機能していることを明らかにし、ヒト P-gp とヒト BCRP の両方の基質となる化合物のヒト P-gp 基質性評価ではヒト P-gp 基質性を過小評価す

る場合があることを示した。一方、BCRP 阻害剤である Ko143 を添加しヒト P-gp 基質性評価を実施することでブタ Bcrp の機能を抑え、ヒト P-gp とヒト BCRP の両方の基質となる化合物のヒト P-gp 基質性を正しく評価できることが確認できた。以上のことより、LLC-PK1 細胞におけるヒト P-gp 基質性評価において BCRP 選択的阻害剤添加により、より正確なヒト P-gp 基質性評価が実施可能となったことを示した。

規制当局のガイドラインではヒト P-gp およびヒト BCRP の基質性評価の実施が求められているが、両トランスポーターの基質となる薬物の各トランスポーター基質性評価は、評価に用いる細胞の特性を考慮し実施しなければならないと考えられた。LLC-PK1 細胞はブタ P-gp の発現量が低く、ヒト P-gp 基質性評価結果への影響が小さいことが報告されているが、本研究においてブタ Bcrp の輸送活性が明らかとなった。一方、MDCKII 細胞ではイヌ P-gp を発現し、ヒト P-gp 基質性評価結果に影響することが報告されているが、内在性イヌ Bcrp は発現していないことが報告されている(Di et al., 2011; Romermann et al., 2015)。よって、評価に用いる親株の内在性トランスポーターの輸送活性を考慮し、各内在性トランスポーターの選択的阻害剤を添加することにより、より正確なヒト P-gp およびヒト BCRP 基質性評価を実施することが可能と考えられた。例えば、ヒト P-gp 基質性評価には内在性 P-gp の輸送活性が低く、内在性 Bcrp の輸送活性がみられる LLC-PK1 細胞を親株としたヒト P-gp 発現細胞株に BCRP 選択的阻害剤を添加してヒト P-gp 基質性評価を実施し、ヒト BCRP 基質性評価には内在性 Bcrp が発現しておらず、内在性 P-gp の輸送活性が

みられる MDCKII 細胞を親株としたヒト BCRP 発現細胞株に P-gp 選択的阻害剤を添加しヒト BCRP 基質性評価を実施することで、より正確なヒト P-gp およびヒト BCRP 基質性の評価が可能となる。

本研究により創薬段階におけるヒト P-gp 基質性評価のスループットを上昇させ、また LLC-PK1 細胞におけるブタ Bcrp 機能を明らかにすることで、より早期に正確にヒト P-gp 基質性判断ができるようになった。これらヒト P-gp 基質性評価における量的および質的な改善は、創薬の効率化、開発候補品のヒト体内動態の予測精度向上につながり、更なる医薬品開発の成功確率向上へ貢献するものと考えられる。

参考文献

Agarwal S, Hartz AM, Elmquist WF, and Bauer B (2011) Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in brain cancer: two gatekeepers team up. *Current Pharmaceutical Design* 17: 2793-2802.

Agarwal S, Sane R, Gallardo JL, Ohlfest JR, and Elmquist WF (2010) Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334: 147-155.

Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, and Schinkel AH (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 417-425.

Bentz J, O'Connor MP, Bednarczyk D, Coleman J, Lee C, Palm J, Pak YA, Perloff ES, Reyner E, Balimane P, Brannstrom M, Chu X, Funk C, Guo A, Hanna I, Heredi-Szabo K, Hillgren K, Li L, Hollnack-Pusch E, Jamei M, Lin X, Mason AK, Neuhoﬀ S, Patel A, Podila L, Plise E,

Rajaraman G, Salphati L, Sands E, Taub ME, Taur JS, Weitz D, Wortelboer HM, Xia CQ, Xiao G, Yabut J, Yamagata T, Zhang L, and Ellens H (2013) Variability in P-glycoprotein inhibitory potency (IC₅₀) using various *in vitro* experimental systems: implications for universal digoxin drug-drug interaction risk assessment decision criteria. *Drug Metabolism and Disposition* 41: 1347-1366.

Di L, Whitney-Pickett C, Umland JP, Zhang H, Zhang X, Gebhard DF, Lai Y, Federico JJ, 3rd, Davidson RE, Smith R, Reyner EL, Lee C, Feng B, Rotter C, Varma MV, Kempshall S, Fenner K, El-Kattan AF, Liston TE, and Troutman MD (2011) Development of a new permeability assay using low-efflux MDCKII cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100: 4974-4985.

Ellens H, Deng S, Coleman J, Bentz J, Taub ME, Ragueneau-Majlessi I, Chung SP, Heredi-Szabo K, Neuhoﬀ S, Palm J, Balimane P, Zhang L, Jamei M, Hanna I, O'Connor M, Bednarczyk D, Forsgard M, Chu X, Funk C, Guo A, Hillgren KM, Li L, Pak AY, Perloff ES, Rajaraman G, Salphati L, Taur JS, Weitz D, Wortelboer HM, Xia CQ, Xiao G, Yamagata T, and Lee CA (2013) Application of receiver operating

characteristic analysis to refine the prediction of potential digoxin drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* 41: 1367-1374.

Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, Schinkel AH, and Sugiyama Y (2008)

Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metabolism and Disposition* 36: 995-1002.

Enokizono J, Kusuhara H, and Sugiyama Y (2007) Effect of breast cancer

resistance protein (Bcrp/Abcg2) on the disposition of phytoestrogens. *Molecular Pharmacology* 72: 967-975.

Feng B, Doran AC, Di L, West MA, Osgood SM, Mancuso JY, Shaffer CL,

Tremaine L, and Liras J (2018) Prediction of human brain penetration of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein substrates using *in vitro* transporter studies and animal models. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107: 2225-2235.

Feng B, Mills JB, Davidson RE, Mireles RJ, Janiszewski JS, Troutman MD,

and de Moraes SM (2008) *In vitro* P-glycoprotein assays to predict the *in vivo* interactions of P-glycoprotein with drugs in the central

nervous system. *Drug Metabolism and Disposition* 36: 268-275.

Gartzke D, Delzer J, Laplanche L, Uchida Y, Hoshi Y, Tachikawa M, Terasaki T, Sydor J, and Fricker G (2015) Genomic knockout of endogenous canine P-glycoprotein in wild-type, human P-glycoprotein and human BCRP transfected MDCKII cell lines by Zinc finger nucleases. *Pharmaceutical Research* 32: 2060-2071.

Gartzke D and Fricker G (2014) Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103: 1298-1304.

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, and Zhang L (2010) Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 215-236.

Giri N, Agarwal S, Shaik N, Pan G, Chen Y, and Elmquist WF (2009) Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple

binding sites in *in vitro* assay design. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 560-570.

Goh LB, Spears KJ, Yao D, Ayrton A, Morgan P, Roland Wolf C, and Friedberg T (2002) Endogenous drug transporters in *in vitro* and *in vivo* models for the prediction of drug disposition in man. *Biochemical Pharmacology* 64: 1569-1578.

Hsiao P, Bui T, Ho RJ, and Unadkat JD (2008) *In vitro*-to-*in vivo* prediction of P-glycoprotein-based drug interactions at the human and rodent blood-brain barrier. *Drug Metabolism and Disposition* 36: 481-484.

Inoue T, Osada K, Tagawa M, Ogawa Y, Haga T, Sogame Y, Hashizume T, Watanabe T, Taguchi A, Katsumata T, Yabuki M, and Yamaguchi N (2012) Blonanserin, a novel atypical antipsychotic agent not actively transported as substrate by P-glycoprotein. *Progress In Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 39: 156-162.

Karlgren M, Simoff I, Backlund M, Wegler C, Keiser M, Handin N, Muller J, Lundquist P, Jareborg AC, Oswald S, and Artursson P (2017) A CRISPR-Cas9 generated MDCK cell line expressing human MDR1 without endogenous canine MDR1 (cABCB1): An Improved tool for

drug efflux studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106: 2909-2913.

Keogh JP and Kunta JR (2006) Development, validation and utility of an *in vitro* technique for assessment of potential clinical drug-drug interactions involving P-glycoprotein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 543-554.

Kola I and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 711-715.

Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortos C, Ambroziak K, and Loscher W (2010) Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *British Journal of Pharmacology* 160:1453-1463.

Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, and Hidalgo IJ (2011) Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the *in vitro* efflux of statin drugs. *Drug Metabolism and Disposition* 39: 1196-1202.

Li J, Wang Y, and Hidalgo IJ (2013) Kinetic analysis of human and canine

P-glycoprotein-mediated drug transport in MDR1-MDCK cell model: approaches to reduce false-negative substrate classification. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102: 3436-3446.

Mahar Doan KM, Humphreys JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, Adkison KK, and Polli JW (2002) Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303: 1029-1037.

Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergstrom CA, and Artursson P (2009) Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharmaceutical Research* 26: 1816-1831.

Mease K, Sane R, Podila L, and Taub ME (2012) Differential selectivity of efflux transporter inhibitors in Caco-2 and MDCK-MDR1 monolayers: a strategy to assess the interaction of a new chemical entity with P-gp, BCRP, and MRP2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101: 1888-1897.

Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, and Mao Q (2010) Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current Drug Metabolism* 11: 603-617.

Ohashi R, Kamikozawa Y, Sugiura M, Fukuda H, Yabuuchi H, and Tamai I (2006) Effect of P-glycoprotein on intestinal absorption and brain penetration of antiallergic agent bepotastine besilate. *Drug Metabolism and Disposition* 34: 793-799.

Ohe T, Sato M, Tanaka S, Fujino N, Hata M, Shibata Y, Kanatani A, Fukami T, Yamazaki M, Chiba M, and Ishii Y (2003) Effect of P-glycoprotein-mediated efflux on cerebrospinal fluid/plasma concentration ratio. *Drug Metabolism and Disposition* 31: 1251-1254.

Oostendorp RL, Buckle T, Beijnen JH, van Tellingen O, and Schellens JH (2009) The effect of P-gp (Mdr1a/1b), BCRP (Bcrp1) and P-gp/BCRP inhibitors on the *in vivo* absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib. *Investigational New Drugs* 27: 31-40.

Pan G, Giri N, and Elmquist WF (2007) Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metabolism and Disposition* 35: 1165-1173.

Poirier A, Cascais AC, Bader U, Portmann R, Brun ME, Walter I, Hillebrecht

A, Ullah M, and Funk C (2014a) Calibration of *in vitro* multidrug resistance protein 1 substrate and inhibition assays as a basis to support the prediction of clinically relevant interactions *in vivo*. *Drug Metabolism and Disposition* 42: 1411-1422.

Poirier A, Portmann R, Cascais AC, Bader U, Walter I, Ullah M, and Funk C

(2014b) The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: why, when, and how? *Drug Metabolism and Disposition* 42: 1466-1477.

Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, and

Serabjit-Singh CS (2001) Rational use of *in vitro* P-glycoprotein assays in drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299: 620-628.

Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, Balakrishnan A, Keogh JP, Kunta JR,

Serabjit-Singh CJ, and Polli JW (2006) *In vitro* p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates.

Drug Metabolism and Disposition 34: 786-792.

Romermann K, Helmer R, and Loscher W (2015) The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Neuropharmacology* 93: 7-14.

Sugimoto H, Hirabayashi H, Amano N, and Moriwaki T (2013) Retrospective analysis of P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions at the blood-brain barrier in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 41: 683-688.

Sugimoto H, Hirabayashi H, Kimura Y, Furuta A, Amano N, and Moriwaki T (2011a) Quantitative investigation of the impact of P-glycoprotein inhibition on drug transport across blood-brain barrier in rats. *Drug Metabolism and Disposition* 39: 8-14.

Sugimoto H, Matsumoto S, Tachibana M, Niwa S, Hirabayashi H, Amano N, and Moriwaki T (2011b) Establishment of *in vitro* P-glycoprotein inhibition assay and its exclusion criteria to assess the risk of drug-drug interaction at the drug discovery stage. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100: 4013-4023.

Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S, Ebihara T, Katoh M,

Yokoi T, and Asahi S (2006) Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharmaceutical Research* 23: 1460-1472.

Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, and Hori R (1992) Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 263: 840-845.

Taub ME, Podila L, Ely D, and Almeida I (2005) Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gp) probe substrates: influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 1679-1687.

Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, and Hori R (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *Journal of Biological Chemistry* 267: 24248-24252.

Wandel C, Kim R, Wood M, and Wood A (2002) Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug

transporter P-glycoprotein. *Anesthesiology* 96: 913-920.

Wang Q, Rager JD, Weinstein K, Kardos PS, Dobson GL, Li J, and Hidalgo

IJ (2005) Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics* 288: 349-359.

Wang Z, Pal D, Patel A, Kwatra D, and Mitra AK (2013) Influence of

overexpression of efflux proteins on the function and gene expression of endogenous peptide transporters in MDR-transfected MDCKII cell lines. *International Journal of Pharmaceutics* 441: 40-49.

Xiao Y, Davidson R, Smith A, Pereira D, Zhao S, Soglia J, Gebhard D, de

Morais S, and Duignan DB (2006) A 96-well efflux assay to identify ABCG2 substrates using a stably transfected MDCKII cell line. *Molecular Pharmaceutics* 3: 45-54.

Yamazaki M, Neway WE, Ohe T, Chen I, Rowe JF, Hochman JH, Chiba M,

and Lin JH (2001) *In vitro* substrate identification studies for P-glycoprotein-mediated transport: species difference and predictability of *in vivo* results. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296: 723-735.

Zhou L, Schmidt K, Nelson FR, Zelesky V, Troutman MD, and Feng B (2009)

The effect of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein on the brain penetration of flavopiridol, imatinib mesylate (Gleevec), prazosin, and 2-methoxy-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyloxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propanoic acid (PF-407288) in mice. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 946-955.

In Vitro Metabolism-and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction

Studies Guidance for Industry (2017) Food and Drug Administration (USA)

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 (2018) 厚

生労働省 医薬・生活衛生局医薬品審査管理課

謝辭

本論文の作成にあたり終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました筑波大学 生命環境系 繁森英幸教授 に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり懇切丁寧な御指導、御校閲を賜りました筑波大学 生命環境系 臼井健郎教授、山田小須弥准教授、内海真生准教授 に深い感謝の意を表します。

本論文の作成の機会を与えて頂き、御指導、御支援を賜りましたアステラス製薬 株式会社 薬物動態研究所 所長 田端健司博士 に深謝申し上げます。

本論文の作成にあたり多大なる御指導、御支援を賜りましたアステラス製薬 株式会社 薬物動態研究所 野沢敬博士 に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、御助言、御協力を賜りました旧アステラスリサーチテクノロジー株式会社 薬物動態研究所 塩塚晃一氏、深海和樹博士、木村麻友子氏に厚く御礼申し上げます。

本研究はアステラス製薬株式会社、旧アステラスリサーチテクノロジー株式会社の多くの皆様のお陰で遂行できたものであり、ここに御礼申し上げます。

本論文作成にあたり御配慮賜りました株式会社サンプラネット 筑波研開発支援事業部 薬物動態バイオアナリシスユニット 統轄部長 佐野善寿博士、薬物動態バイオアナリシスユニット探索動態グループ 統轄部長 藤澤直樹氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、日常的に支援してくれた夫の鉄也、息子の楓に心から感謝致します。

発表論文目録

Rei Miyamoto, Takashi Nozawa, Mayuko Kimura, Koichi Shiozuka, and Kenji Tabata (2015)

Development and validation of semiautomated 96-Well transport assay using LLC-PK1 cells transfected with human P-glycoprotein for high-throughput screening.

ASSAY and Drug Development Technologies 13: 79-87.

Rei Miyamoto, Takashi Nozawa, Koichi Shiozuka, and Kenji Tabata (2019)

The impact of endogenous breast cancer resistance protein on human P-glycoprotein-mediated transport assays using LLC-PK1 cells transfected with human P-glycoprotein.

Journal of Pharmaceutical Sciences 108: 1085-1089.