

## 学位論文題名

## ポリアミン型薬物の消化管吸収および腎排泄に関する研究

## 学位論文内容の要旨

## 【序】

ウイルソン病治療薬であるトリエンチン (TE) は、銅と選択的にキレートを形成するポリアミン型薬物である。本剤はオーファンドラッグであるため体内動態に関する知見はほとんど得られていない。しかしながら、その分子構造は生体内ポリアミンであるスペルミン (SPM) に類似しており、ポリアミン類の生体内動態と同様の挙動を示すことが予想される。

生体内ポリアミンであるSPM、スペルミジン (SPD)、プトレッシン (PUT) の細胞内濃度は、細胞内での生合成と細胞外からの輸送によって調節されている。細胞外からの輸送に関しては、各種臓器由来の細胞において内向きNa勾配依存性のポリアミン輸送担体の存在が報告されている。しかしながら、ポリアミン類は細胞内で生合成および代謝されるため、細胞レベルの検討ではポリアミンの膜透過を正確に評価することはできない。したがって、細胞内酵素系を含まない膜標品を用いて考察することが重要であるが、これらに関する報告は極めて乏しい。一方、薬物の消化管吸収や腎排泄の機構解析に繁用されている小腸および腎上皮細胞の刷子縁膜・基底膜小胞は、細胞膜上に存在する各種輸送担体の機能を保持し、また細胞質に存在する酵素などをほとんど含んでいない。したがってこれら膜小胞は、ポリアミン類の膜透過機構を解明する上で極めて有用な実験系であると考えられる。本研究では、TEのウイルソン病患者およびラットにおける体内動態を把握し、次いで小腸および腎上皮細胞膜小胞を用いてポリアミン型薬物の膜透過を評価することにより、これら一連の類似構造を有する薬物の膜レベルにおける消化管吸収並びに腎排泄機構を解明した。

## I. ポリアミン型薬物の消化管吸収機構

ウイルソン病患者におけるTEの吸収率は3~65%であり、患者間で大きく変動していることが示された。また、TEのラット空腸ループからの吸収率は1hrにおいて40%であり、かつtight junctionを介した吸収の割合は低かった。これらのことより、TEの主な吸収経路は小腸細胞膜透過であることが示された。

次に、ラット小腸上皮細胞刷子縁膜小胞 (iBBMV) を用いてポリアミン型薬物の膜透過機構について検討した。SPM、SPDの刷子縁膜透過速度は濃度飽和性を示し、またSPMの膜透過はSPDによって競合的に阻害された。しかしながら、カウンタートランスポート効果はいずれのポリアミンにおいても認められず、ポリアミン類は受動拡散によって刷子縁膜を透過していることが明らかとなった。

芳香環を有するモノカチオン型薬物の膜透過は、イオン拡散電位に依存することが知られているが、PUTおよび直鎖脂肪族ジアミン類の膜透過もまた負の拡散電位により促進された。また、各薬物の拡散電位依存的な膜透過量と脂溶性の間には極めて良好な正の相関が認められた。一方、極めて脂溶性の低いSPMおよびSPDの膜透過は拡散電位の影響を全く受けなかった。以上の結果よりポリアミン型薬物の膜透過は、薬物の脂溶性が増大することにより拡散電位の影響を強く受けることが明らかとなった。

また、モノカチオン型薬物の膜透過は膜表面電位の影響を受けることも知られている。SPM、SPDおよび1,9-ノナンジアミンのiBBMVへの取り込みは、膜表面電位を相対的に正

に傾けるテトラカインによって強く阻害された。さらに、iBBMV内部のイオン強度を低下させた時、SPMのiBBMV取り込みは顕著に促進された。この取り込み促進は、iBBMV内層に局在するホスファチジルセリン等の酸性リン脂質に対するSPMの静電的な結合に起因していることが見いだされた。以上の結果より、細胞膜外層並びに内層の負の膜表面電荷に対する結合がポリアミン類の膜透過における駆動力であることが明らかとなった。

TEの刷子縁膜透過機構は、阻害実験等の詳細な検討よりSPM、SPDと同一であることがことが明確に示された。したがって、ウイルソン病患者におけるTEの吸収性の変動は、消化管内に常在するポリアミン量の違いがその一因であると考えられる。

次に、ポリアミン型薬物のラット小腸上皮細胞基底膜透過機構について検討した。ポリアミン類の基底膜透過は、エネルギーを負荷しない場合には刷子縁膜透過と同様な結果を示した。一方、内向きのNa勾配を負荷した場合、PUTのみが有意な取り込み促進を示した。この内向きNa勾配依存的なPUTの輸送は濃度飽和性を示し、Km値は $1.95 \mu\text{M}$ と算出された。また、このPUT輸送はジアミン型薬物によって阻害されたが、トリおよびテトラアミン型構造を有するSPD、SPMは何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より、ラット小腸基底膜にはジアミン型薬物を認識する内向きNa勾配依存性の輸送担体が存在し、これらの薬物を血管側から細胞内へ輸送していることが強く示唆された。

#### I I. ポリアミン型薬物の腎排泄機構

健常ラットにおけるTEの腎クリアランス (CL<sub>tri</sub>) は、クレアチニンクリアランス (CL<sub>cr</sub>) を有意に上回った。また、TEと同モルの銅を投与することによりCL<sub>tri</sub>は減少し、CL<sub>cr</sub>とほぼ一致した。以上の結果より、TEのラット腎からの排泄には、能動的な尿細管分泌が関与していることが明らかとなった。

次に、ラット腎近位尿細管より刷子縁膜小胞を調製し、ポリアミン型薬物の腎排泄機構について検討した。TEは、多くのカチオン型薬物の尿細管分泌に関与しているH<sup>+</sup>/有機カチオン逆輸送担体に認識されなかった。一方、SPMおよびTEの刷子縁膜透過は外向きのNa勾配により有意に促進された。また、カウンタートランスポート効果の検討より、SPMとTEは共通の担体によって刷子縁膜を透過していることが明らかとなった。さらに、各種カチオン型薬物のSPM輸送に対する阻害実験より、分子内に4つ以上のアミノ基を有する直鎖ポリアミン型薬物のみが本輸送担体に認識されることが強く示唆された。これに対し、銅とキレートを形成したTEはこの担体に認識されないことが示された。

#### 【結論】

ポリアミン型薬物は小腸刷子縁膜において、負に荷電した細胞膜表面に吸着し、次いで細胞膜内層に局在する酸性リン脂質に引き寄せられて膜透過していることが明らかとなった。また、ポリアミン型薬物の脂溶性が増加するとともに細胞内負の拡散電位も膜透過の駆動力となることが示された。患者におけるTEの吸収率の変動は、消化管内に存在するポリアミンによる刷子縁膜透過阻害に起因していることが示唆された。このようにして上皮細胞内に輸送されたポリアミン型薬物は濃度勾配に従った受動拡散により血管側へ移行するが、一部のジアミン型薬物は基底膜に存在する内向きNa勾配依存性のPUT輸送担体により、血管側から小腸上皮細胞内へ輸送されていることが明らかとなった。

SPMおよびTEの腎排泄は腎刷子縁膜に存在するNa勾配依存性の逆輸送担体によって能動的に尿細管に分泌されていることが明らかとなった。しかしながら、銅とキレートを形成したTEはこの輸送系には認識されないことが示された。

これらのポリアミン型薬物の消化管吸収・腎排泄に関する基礎的知見は、TEはもとより、新規ポリアミン型薬物の体内動態を究明するうえで有益な知見になるものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三  
副 査 教 授 加 茂 直 樹  
副 査 教 授 宮 崎 勝 巳  
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚

## 学 位 論 文 題 名

### ポリアミン型薬物の消化管吸収および腎排泄に関する研究

ウイルソン病治療薬であるトリエンチンは、オーファンドラッグ（稀用薬）であるために体内動態に関する知見はほとんど得られていない。また、スペルミンなどの生体内ポリアミン類は細胞の分化・増殖などに大きく関与していることがよく知られており、抗癌剤や免疫抑制剤としての開発研究が行われている。したがって、申請者はウイルソン病患者ならびにラットにおけるトリエンチンの体内動態を把握するとともに、これらポリアミン型薬物の消化管吸収機構および腎排泄機構を明らかにすることを目的として研究を行い、2編にわたり論述している。

#### 第I編：ポリアミン型薬物の消化管吸収機構……

本編では、トリエンチンをウイルソン病患者ならびにラットに投与した後の消化管吸収および尿中排泄挙動を検討し、次いで小腸上皮細胞刷子縁膜および基底膜小胞を用いてポリアミン型薬物の消化管吸収機構の解明を行った。ウイルソン病患者ならびにラットにおいて、トリエンチンは極めて脂溶性が低いにも関わらず小腸より吸収されていることを明らかにした。また、患者におけるトリエンチンの血中濃度推移および尿中排泄率は各患者間で大きく変動しており、消化管からの吸収過程にその原因があることを明らかにした。刷子縁膜透過過程は薬物の消化管からの吸収における最初の障壁であり、申請者は本膜標品を用いてポリアミン型薬物の膜透過機構に

ついて詳細な検討を行った。その結果、トリエンチンを含めたポリアミン型薬物の刷子縁膜透過は、膜表面電位に強く依存した受動拡散であることを明らかにした。すなわち、分子内に複数のカチオン性窒素原子を有するポリアミン型薬物は、シアル酸などの負の電荷を有する生体膜脂質二重層外側の表面に対して静電的に結合し、さらに脂質二重層内側に局在する酸性リン脂質などの負電荷に対して結合することにより膜透過していることを明らかにした。また、トリエンチンとスペルミン・スペルミジンの膜透過機構は、これら薬物を用いた膜透過阻害実験より完全に一致したものであることが確認された。これらの結果は、各患者におけるトリエンチンの吸収率の変動は、消化管内のポリアミン濃度の個体差に起因することを強く示唆するものであった。さらに、イオン拡散電位もポリアミン類の膜透過に寄与しており、その程度は各薬物の脂溶性と極めて良好な相関関係を示すことを明らかにした。これら各種電位によって小腸上皮細胞内に取り込まれたポリアミン型薬物は、濃度勾配にしたがって血管側へと移行していくが、一部ジアミン型薬物は小腸基底膜に存在するNa/プトレッシン共輸送担体により小腸細胞内へ輸送されることを明らかにした。

#### 第II編：ポリアミン型薬物の腎排泄機構……

本編では、まず健常ラットならびにウイルソン病病態モデルラット（LECラット）におけるトリエンチンの尿中排泄挙動を検討した。トリエンチンを連続経口投与した際の尿中排泄量は健常ラットに比べLECラットにおいて有意に少ないことを明らかにした。また、*in vivo*におけるトリエンチンの腎クリアランスはクレアチニンクリアランスを上回ったことより、トリエンチンは尿細管へ能動的に分泌されていることを見いだした。一方、トリエンチンは銅とキレートすることにより、腎クリアランスが低下していた。申請者はさらに、腎近位尿細管上皮細胞刷子縁膜小胞を用いてポリアミン型薬物の腎排泄機構について詳細な検討を行った。その結果、腎刷子縁膜上にはNa/スペルミン逆輸送担体が存在し、トリエンチンの能動的な尿細管分泌に関与していることを初めて明らかにした。この担体は分子内のアミノ基が2ないし3個の生体内ポリアミンであるプトレッシンやスペルミジン、数多くの有機カチオン型薬物の尿細管分

泌に関与しているH<sup>+</sup>/有機カチオン逆輸送担体の基質薬物、分子内に4個以上のアミノ基を有するアミノ配糖体抗生物質などは全く認識しないことを明らかにした。さらに、トリエンチンは銅とキレート形成することにより本輸送担体に認識されなくなることを示した。したがって、Na/スペルミン逆輸送担体は分子内に4個以上のアミノ基を有する直鎖脂肪族ポリアミン型薬物のみを認識し、これら薬物の能動的な尿細管分泌に寄与していることが強く示唆された。

以上のことから本学位論文は、ポリアミン型薬物の消化管吸収ならびに腎排泄機構を明らかにした研究成果であり、これらはウイルソン病患者においてトリエンチンによる薬物療法を適正かつ安全に行っていく上でも有益な知見である。さらに、製薬会社などで進められている新規ポリアミン型薬物の開発においても重要な基礎的知見を与えるものであり、博士（薬学）を受けるに十分値すると認めた。