

博士論文

薬物の脳および脳脊髄液移行における Breast Cancer Resistance Protein の定量的機能解析

広島大学大学院医系科学研究科 総合健康科学専攻 薬科学プログラム

医療薬学講座 医療薬剤学研究室

令和2年度入学 片桐 祐希

主指導教員 高野 幹久

目次

序論.....	1
本論.....	5
第 I 章 in silico 物理化学的性質および in vitro トランスポーター基質性評価	5
第 1 節 物理化学的性質の in silico 評価	5
第 2 節 in vitro P-gp 輸送活性評価.....	7
第 3 節 in vitro BCRP 輸送活性評価	9
第 4 節 小括.....	10
第 II 章 BCRP 特異的基質のラット中枢移行性評価.....	12
第 1 節 ラット脳、血清、CSF 中タンパク結合率測定	12
第 2 節 ラット PK 解析による投与量設定.....	14
第 3 節 ラット中枢移行性評価.....	15
第 4 節 小括.....	18
第 III 章 BCRP 特異的基質の中枢移行における BCRP 機能評価.....	20
第 1 節 阻害剤の投与量設定	20
第 2 節 BCRP 特異的基質の中枢移行性に対する阻害剤の影響.....	24
第 3 節 Kinetics model 解析に基づいた考察.....	26
第 4 節 小括.....	33
第 IV 章 P-gp/BCRP 両基質の中枢移行における BCRP 機能評価.....	37
第 1 節 P-gp 基質および P-gp/BCRP 両基質のラット脳、血清、CSF 中タンパク結 合率測定	37
第 2 節 P-gp 阻害剤の投与量設定	38
第 3 節 P-gp/BCRP 両基質の中枢移行性に対する阻害剤の影響	40
第 4 節 小括.....	45
結論.....	47
謝辞.....	49
実験の部.....	50
論文目録.....	59
参考文献.....	60

略語／略号一覧

ABC	ATP binding cassette
A to B	apical to basolateral direction
ATP	adenosine triphosphate
BAB	blood–arachnoid barrier
BBB	blood-brain barrier
BCRP	breast cancer resistance protein
BCSFB	blood-cerebrospinal fluid barrier
B to A	basolateral to apical direction
CFR	corrected flux ratio
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
C_{ss}	plasma concentration at steady state
FDA	Food and Drug Administration
$f_{u,b}$	unbound fraction in brain
$f_{u,c}$	unbound fraction in cerebrospinal fluid
$f_{u,s}$	unbound fraction in serum
GLUT	glucose transporter
i.v.	intravenous
K_m	Michaelis-Menten constant
$K_{p,br/mu}$	total brain-to-muscle partition coefficient
$K_{p,total,brain}$	total brain-to-plasma partition coefficient
$K_{p,uu,brain}$	unbound brain-to-plasma partition coefficient
$K_{p,uu,CSF}$	unbound cerebrospinal fluid-to-plasma partition coefficient
LAT	L-type amino acid transporter
LC	liquid chromatography
MCT	monocarboxylate transporter
MDCKII	Madin-Darby canine kidney type II
MDR	multidrug resistance
MPO	multiparameter optimization
MS	mass spectrometry
NBD	nucleotide binding domain
P-gp	P-glycoprotein
P_{app}	apparent permeability coefficient

PK	pharmacokinetics
PS _{A-to-B}	PS product of penetration from apical side to basolateral side in MDCKII cell monolayer
PS _{A,BCRP}	PS product of efflux transport mediated by BCRP expressed in MDCKII cell monolayer
PS _{A,eff}	PS product of efflux via passive diffusion across the apical side plasma membrane in MDCKII cell monolayer
PS _{A,inf}	PS product of influx via passive diffusion across the apical side plasma membrane in MDCKII cell monolayer
PS _{B-to-A}	PS product of penetration from basolateral side to apical side in MDCKII cell monolayer
PS _{BCRP}	PS product of efflux transport mediated by BCRP
PS _{B,eff}	PS product of efflux via passive diffusion across the basolateral side plasma membrane in MDCKII cell monolayer
PS _{B,inf}	PS product of influx via passive diffusion across the basolateral side plasma membrane in MDCKII cell monolayer
PS _{bl-to-br}	PS product of BBB penetration from blood side to brain side
PS _{bl,BCRP}	PS product of efflux transport mediated by BCRP expressed in blood side plasma membrane in the endothelial cells
PS _{bl,eff}	PS product of efflux via passive diffusion across the blood side plasma membrane in the endothelial cells.
PS _{bl,inf}	PS product of influx via passive diffusion across the blood side plasma membrane in the endothelial cells
PS _{br-to-bl}	PS product of BBB penetration from brain side to blood side
PS _{br,eff}	PS product of efflux via passive diffusion across the brain side plasma membrane in the endothelial cells
PS _{br,inf}	PS product of influx via passive diffusion across the brain side plasma membrane in the endothelial cells
V _{max}	maximum velocity

序論

アルツハイマー型認知症やパーキンソン病、統合失調症などに代表される精神・神経系疾患は、高血圧症や糖尿病などの非中枢性疾患に比べて治療満足度が低い傾向にある¹⁾。また、主要国における障害調整生命年(disability-adjusted life years)増加の原因としても複数の精神・神経疾患が上位に位置づけられており²⁾、精神・神経疾患に対する治療薬の創出が社会的な課題であると考えられる。一方で、精神・神経疾患を標的とした治療薬は長い開発期間を要するにもかかわらず、開発成功率が低いことが知られている³⁾。また、近年ではメガファーマがこれらの領域の医薬品研究開発からの撤退を発表しており、精神・神経疾患を標的とした医薬品の研究開発は他の領域に比べて難易度が高いことが分かる。この原因として、疾患病態が十分に解明されていないこと、病態を反映した適切な動物モデルが存在しないこと³⁾、医薬品候補化合物が中枢組織へ到達しにくいこと⁴⁾などが挙げられている。薬物が全身循環血から中枢組織へ到達するためには、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を透過する必要があるが、98%の低分子化合物および drug delivery system を適応したものを除くほぼ 100%の高分子化合物は BBB を透過することができないと考えられている⁴⁾。精神・神経疾患に対する医薬品の作用部位は中枢組織であることがほとんどであるため、その薬効の予測には BBB の透過性を非臨床段階で予測することが重要になる。また、非中枢性疾患に対する医薬品の研究開発過程においても、医薬品候補化合物が中枢組織へ移行することは中枢性の毒性発現につながるため、疾患領域に限らず創薬研究全般において、非臨床段階における BBB 透過性の予測が重要である。第一世代抗ヒスタミン薬である diphenhydramine などは副作用として鎮静等の中枢性副作用が挙げられているが、第二世代抗ヒスタミン薬である cetirizine などは第一世代抗ヒスタミン薬と比較して鎮静等の中枢性副作用は弱い傾向にある。この原因として、第二世代抗ヒスタミン薬は第一世代抗ヒスタミン薬と比較して BBB 透過性が低いことが挙げられている⁵⁾。以上より、中枢性移行性の評価や予測は中枢性疾患の創薬のみならず、非中枢性疾患の創薬においても重要であることがうかがえる。

BBB は血液から脳へ必要な物質を輸送し、不必要な物質の移行を制限することで中枢組織の恒常性を保っている。BBB における代表的な物質輸送機構を Figure 1 に示す。BBB の構造は、管腔側は血管内皮細胞に覆われており、さらに内皮細胞の基底膜側をペリサイトとアストロサイトのエンドフットが取り囲むような構造であることが知られている⁶⁾。BBB を構成する内皮細胞は高度に発達したタイトジャンクションを形成することで、血液側から脳側への paracellular 経路による物質輸送を制限している⁷⁾。ヒトの BBB モデルとして研究されている、ヒト脳毛細血管内皮細胞を不死化した hCMEC/D3 細胞において、タ

タイトジャンクションを形成するタンパク質の一つである Claudin-5 をノックダウンすることで、paracellular経路による物質透過性が向上することが知られている⁸⁾。このような種々の研究により、BBBのタイトジャンクションがそのバリア機能形成に大きく寄与していることが明らかになっている。

一方で、発達したタイトジャンクションによって、脳の活動に必須であるグルコースやアミノ酸等の物質に関しても paracellular 経路による血液から脳への移行が制限される。さらに、グルコースやアミノ酸など脂溶性が低い物質は膜透過性が低いため、passive diffusion による脳への移行もごくわずかであると考えられる。このような脳の活動に必要な物質の供給機構として、BBBの血管内皮細胞には血液から脳へ物質を輸送する取り込みトランスポーターが発現している(Fig. 1)。一例として、GLUT1はBBBに豊富に発現していることが報告されており、グルコースを血液から脳へ供給することで、脳は活動のエネルギー源としてグルコースを利用することができる⁹⁾。その他にも、ケトン体を脳に供給するMCT1¹⁰⁾、中性アミノ酸を脳に供給するLAT1¹¹⁾がBBBに発現している。このように、取り込みトランスポーターを介して脳に必要な物質を輸送することで、BBBは異物に対するバリア機能を有しながらも栄養を脳に供給することを可能にしている。

BBBのタイトジャンクションは、膜透過性が低い物質のparacellular経路による輸送制限に対しては有効であるが、膜透過性が高くpassive diffusionにより輸送される物質の脳移行を制限する効果は限定的である。膜透過性が高くpassive diffusionによって輸送され

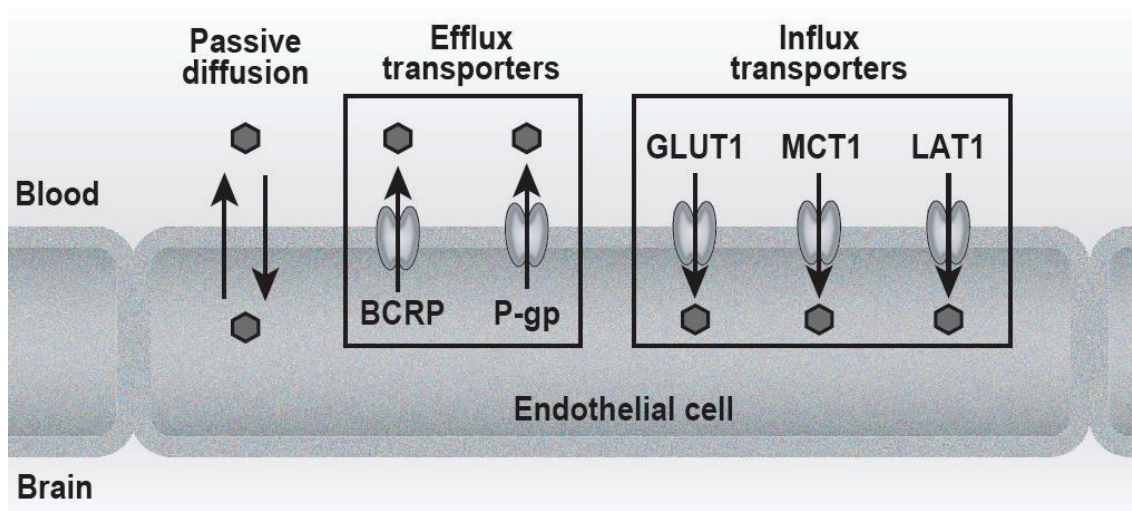


Fig. 1. Schematic illustration of major transport systems across the blood-brain barrier.

Small molecules can be transported by passive diffusion, efflux transporters and/or influx transporters across the blood side plasma membrane of endothelial cells that forms blood-brain barrier.

る物質の脳移行を制限する機構として、排出トランスポーターが挙げられる。排出トランスポーターは BBB を構成する血管内皮細胞の血管側に発現しており、細胞内から血液方向へ基質を輸送することで、脳を守る役割を担っている (Fig. 1)。BBB における代表的な排出トランスポーターは、P-glycoprotein (P-gp) および Breast cancer resistance protein (BCRP) の 2 つが挙げられる⁶⁾。

P-gp は ABCB1 (MDR1) 遺伝子にコードされる ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターであり、ATP 依存的に基質を能動輸送する¹²⁾。P-gp は、①1280 のアミノ酸から構成される、②12 の膜貫通ドメインと 2 つの nucleotide-binding domain (NBD) を有する、③ N 末端付近の最初の細胞外ドメインに位置する 3 つのアスパラギン残基が糖化されているといった構造的特徴を持つ¹³⁾。P-gp は医薬品を基質とすることが知られているが、その基質特異性は非常に広く、doxorubicin や paclitaxel などの抗がん剤、環状ペプチド医薬品の cyclosporin A、強心配糖体の digoxin、risperidone や citalopram などの向精神薬と多岐にわたる¹⁴⁾。P-gp が *in vivo* における基質の脳移行に与える影響について、P-gp knockout マウスを用いて多くの研究が行われた結果、良好な基質に対しては脳移行を大きく制限することが明らかとなり、現在では P-gp は創薬において医薬品の中枢移行性を決定づける重要な要素の一つであると考えられている¹⁵⁾。創薬の現場において、P-gp 基質性を評価するスクリーニング系は MDR1 発現細胞を使用した *in vitro* 細胞透過実験が用いられる。P-gp が基質の脳移行に与える影響は、MDR1 発現細胞の *in vitro* 細胞透過実験から算出される P-gp 基質性と相関することが報告されており、さらに BBB における P-gp 発現量を用いてヒトにおける P-gp 基質の脳移行性を予測する方法論が提案されている^{16,17)}。

BCRP は ABCG2 遺伝子にコードされている ABC トランスポーターであり、P-gp と同様に ATP 依存的に基質を能動輸送する。BCRP は他の多くの ABC トランスポーターとは異なり、6 つの膜貫通ドメインと 1 つの NBD しか持たず、複合体を形成することでトランスポーターとして機能することが知られている¹⁸⁾。BCRP は基質として、rosuvastatin などのスタチン類や topotecan、imatinib などの抗がん剤等を輸送し¹⁹⁾、BCRP knockout マウスとヒト化 BCRP マウスを用いた実験から BCRP は基質の脳移行を制限することが報告されている²⁰⁾。さらに Uchida らは LC-MS/MS を用いて脳毛細血管におけるトランスポーター発現量を定量しており、ヒトにおいては BCRP の発現量は P-gp の発現量よりも高い傾向にあることが報告されている²¹⁾。以上のように、BCRP は医薬品の脳移行性を予測する上で、重要な要素になることが示されているが、*in vivo* の脳移行における BCRP の影響は P-gp ほど明らかにされていない。その原因として、BCRP の基質特異性は P-gp とオーバーラップしているため、P-gp が脳移行に与える影響を差し引いて、BCRP のみが脳移行に

与える影響を定量的に評価することが困難であることが挙げられている²²⁻²⁴⁾。

本研究は BCRP が薬物の中枢移行に与える影響を定量的に評価するために、P-gp の非基質かつ BCRP 基質となる化合物を用いて、ラットにおける種々の中枢移行性評価を行い、BCRP の影響を定量的に明らかにすることを目的とした。

第I章 in silico 物理化学的性質および in vitro トランスポーター基質性評価

低分子化合物の BBB 透過は paracellular 経路の寄与が低く、大部分が passive diffusion による輸送であるため、passive diffusion の速度に影響する化合物の物理化学的性質が BBB 透過を考える上で重要である。低分子化合物の脳移行性に関する物理化学的性質の指標としては Lipinski's rule of 5 や CNS MPO (Central Nervous System Multiparameter Optimization) が知られている^{25,26)}。評価化合物の膜透過性が低い場合、化合物の中枢組織への分布が定常状態に到達する速度が遅く、BCRP の影響を定量的に評価することが困難であると考えられるため、中枢組織への移行性を評価するにあたり、評価化合物の物理化学的性質を理解する必要がある。以上の理由から、評価化合物の物理化学的性質を in silico により評価することとした。

また、化合物の中枢移行における BCRP の影響を定量的に評価するために、評価化合物は BCRP の基質かつ P-gp 非基質であることが望ましい。さらに、BCRP の基質性として弱い基質から良好な基質まで幅広い基質性を持つ化合物を評価化合物として選択することで、より精緻に BCRP の影響を考察することが可能であると考えた。以上より、評価化合物の P-gp 基質性および BCRP 基質性を in vitro 細胞透過性試験により明らかにすることとした。

第1節 物理化学的性質の in silico 評価

本研究には評価化合物として、dantrolene, daidzein, nebicapone, prazosin, imatinib, quinidine, antipyrine, DSP1, DSP2, DSP3, DSP4, DSP5, DSP6, DSP7, DSP8 および DSP9 を用いた。これらの化合物の構造を Figure 2 に示す。また、これら評価化合物の物理化学的性質を ADMET Predictor 10.3 を用いて予測した (Table 1)。その結果、nebicapone, DSP3 は比較的低い acidic pKa を示し、pH 7.4 において陰イオン形の比率が高いことが示唆された。また、imatinib, quinidine および DSP9 は比較的高い basic pKa を示し、pH 7.4 において陽イオン形の比率が高いことが示唆された。評価化合物の $\log P$ および $\log D_{7.4}$ は antipyrine および nebicapone 以外の化合物において 1.0 以上の値を示したため、本研究の評価化合物は脂溶性薬物が多いことが示唆された。

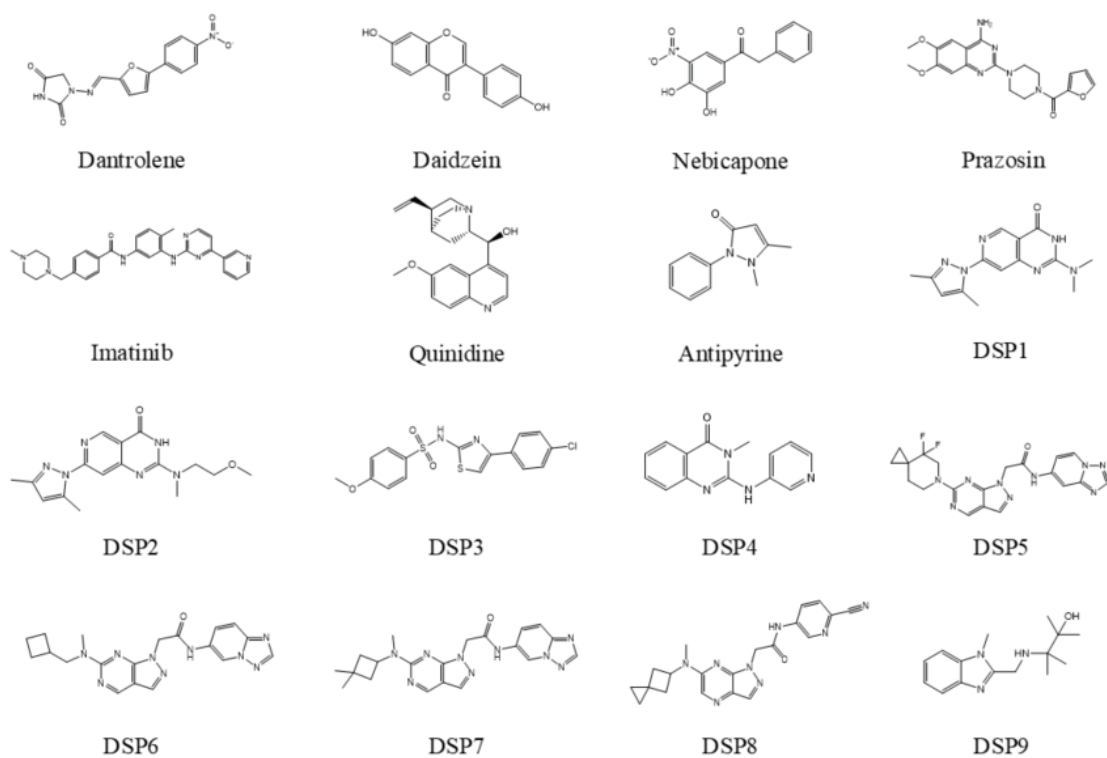


Figure 2. Structures of test compounds.

Table 1. Predicted physicochemical property of test compounds.

Compound	Acidic pKa	Basic pKa	log <i>P</i>	log <i>D</i> _{7.4}
Dantrolene	8.04	-4.63	1.69	1.62
Daidzein	8.45	None	2.575	2.538
Nebicapone	4.29	None	3.36	0.496
Prazosin	None	6.65	1.134	1.064
Imatinib	11.14	8.2	4.153	3.291
Quinidine	None	7.95	2.653	1.993
Antipyrine	None	None	0.588	0.588
DSP1	8.26	3.11	1.89	1.833
DSP2	8.51	3.21	1.952	1.92
DSP3	6.26	1.55	4.072	2.916
DSP4	None	3.76	1.787	1.787
DSP5	10.6	3.64	1.36	1.36
DSP6	10.7	3.72	1.407	1.407
DSP7	10.7	3.71	1.883	1.883
DSP8	10.7	3.67	1.576	1.576
DSP9	None	7.86	1.744	1.157

第2節 in vitro P-gp 輸送活性評価

MDR1 遺伝子を過剰発現させた MDCKII細胞(MDR1-MDCK)および control MDCKII細胞(control-MDCK)を transwell プレートに播種し、形成した単層膜を用いて in vitro 細胞透過性試験を実施した。Apical 側から basolateral 側への経細胞輸送(A to B)および basolateral 側から apical 側への経細胞輸送(B to A)を評価し、それぞれの見かけの膜透過係数(P_{app})を以下の式より算出した。

$$P_{app} = \frac{dX}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

ここで、 dX/dt は時間当たりの化合物量変化、すなわち化合物の輸送速度を示す。A はメンブレンインサートの表面積を、 C_0 はドナーの初期濃度を示す。

また、B to A の P_{app} を A to B の P_{app} で補正した efflux ratio、MDR1-MDCK の efflux ratio を control-MDCK の efflux ratio で補正した corrected flux ratio (CFR) を算出した。

膜抵抗値および lucifer yellow の透過性を測定することによって、paracellular 経路による輸送は少なく無視できるものであることを確認した。

P-gp 基質であるか否かの判定は、FDA が公開している in vitro 薬物相互作用評価のガイドラインに基づいて行い、CFR が 2.0 以上の化合物を P-gp 基質、CFR が 2.0 未満の化合物を P-gp 非基質と定義した²⁷⁾。

Prazosin, imatinib および quinidine の CFR は 2.0 以上となり、P-gp の基質であると分類された一方で、その他の化合物の CFR はおよそ 1.0 付近の値を示し、P-gp 非基質であると分類された(Table 2)。

Table 2. Transport activities of test compounds in MDR1-MDCK and corresponding control cells.

Compound	MDCK-MDR1 cell			MDCK-control cell			CFR
	P _{app}	P _{app}	Efflux	P _{app}	P _{app}	Efflux	
	A-to-B	B-to-A	ratio	A-to-B	B-to-A	ratio	
Dantrolene	28.6	23.7	0.8	28.6	23.9	0.8	1.0
Daidzein	12.0	7.11	0.6	13.5	9.13	0.7	0.9
Nebicapone	6.41	6.17	1.0	7.67	6.50	0.8	1.1
Prazosin	10.0	28.4	2.8	No data	No data	No data	2.8 ^a
Imatinib	2.75	17.0	6.2	12.9 ^b	8.51	0.7	9.3
Quinidine	3.70	38.7	10	12.7	19.7	1.6	6.7
Antipyrine	33.8	40.6	1.2	34.6	37.3	1.1	1.1
DSP1	21.0	19.4	0.9	25.9	21.9	0.8	1.1
DSP2	32.4	33.2	1.0	34.8	35.5	1.0	1.0
DSP3	2.97	3.58	1.2	3.26	3.78	1.2	1.0
DSP4	23.6	21.9	0.9	27.3	26.2	1.0	1.0
DSP5	18.0	19.3	1.1	21.3	23.0	1.1	1.0
DSP6	22.8	23.5	1.0	25.0	24.0	1.0	1.1
DSP7	22.9	17.6	0.8	27.5	22.1	0.8	1.0
DSP8	14.8	15.9	1.1	23.1	21.4	0.9	1.2
DSP9	21.4	15.3	0.7	27.1	24.9	0.9	0.8

^a The efflux ratio of the control-MDCK was assumed to be 1.

^b Donor concentration in apical side of control-MDCK after the experiment was used because of low recovery.

第3節 in vitro BCRP 輸送活性評価

BCRP を過剰発現させた MDCKII細胞(BCRP-MDCK)および control MDCKII細胞(control-MDCK)を transwell プレートに播種し形成した単層膜を用いて、in vitro 経細胞透過性試験を実施した。前節と同様に、A to B および B to A の P_{app} 、efflux ratio、CFR を算出した。

BCRP 基質であるか否かの判定は前節と同様に、CFR が 2.0 以上の化合物を BCRP 基質、CFR が 2.0 未満の化合物を BCRP 非基質と定義した

その結果、dantrolene、daidzein、nebicapone、prazosin、imatinib、DSP1、DSP2、DSP3、DSP4、DSP5、DSP6、DSP7 は 2.0 以上の CFR を示し、BCRP 基質であると分類された。一方で、quinidine、antipyrine、DSP8、DSP9 は 2.0 以下の CFR を示し、BCRP 非基質であると分類された(Table 3)。

Table 3. Transport activities of test compounds in BCRP-MDCK and corresponding control cells.

Compound	MDCK-BCRP cell			MDCK-control cell			CFR
	P_{app}	P_{app}	Efflux	P_{app}	P_{app}	Efflux	
	A-to-B	B-to-A	ratio	A-to-B	B-to-A	ratio	
Dantrolene	1.10	43.9	40	30.2	23.5	0.8	51
Daidzein	1.03	33.7	33	15.8	12.1	0.8	43
Nebicapone	0.42	12.3	30	7.02	6.68	1.0	31
Prazosin	1.78	38.1	21	18.4	23.5	1.3	17
Imatinib	1.10	29.2	26	8.55 ^a	12.5	1.5	18
Quinidine	6.48	24.0	3.7	6.90	15.2	2.2	1.7
Antipyrine	37.8	38.2	1.0	30.6	31.1	1.0	1.0
DSP1	3.57	42.5	12	23.4	23.2	1.0	12
DSP2	5.64	32.7	5.8	13.8	9.83	0.7	8.2
DSP3	0.23	5.20	22	4.11	4.18	1.0	22
DSP4	11.3	50.2	4.4	27.0	25.7	0.9	4.7
DSP5	3.44	40.9	12	20.6	21.9	1.1	11
DSP6	12.0	35.8	3.0	19.8	19.7	1.0	3.0
DSP7	15.1	27.7	1.8	17.3	15.7	0.9	2.0
DSP8	21.7	28.0	1.3	18.1	17.0	0.9	1.4
DSP9	28.0	32.7	1.2	27.6	28.8	1.0	1.1

^a Donor concentration in apical side of control-MDCK after the experiment was used because of low recovery.

第4節 小括

本章では、評価化合物の *in silico* による物理化学的性質および *in vitro* における P-gp、BCRP の基質性を評価した。

第1節では評価化合物の物理化学的性質を *in silico* で評価した。その結果、nebicapone、DSP3 は比較的低い acidic pKa を示し、imatinib、quinidine および DSP9 は比較的高い basic pKa を示した。また、評価化合物の $\log P$ および $\log D_{7.4}$ は antipyrine および nebicapone 以外の化合物において 1.0 以上の値を示した。Sulfasalazine や estrone-3-sulfate といった脂溶性の低い化合物は P-gp によって輸送されないが、BCRP によって輸送されることが知られている^{28,29}。一方で、これらの化合物は細胞透過性が低いという特徴があり、定常状態に到達するまでに時間がかかると考えられるため、中枢移行に関与する BCRP 機能を評価することは困難であると考えられる。本研究の評価化合物の $\log P$ および $\log D_{7.4}$ は antipyrine および nebicapone 以外の化合物において 1.0 以上の値を示したことから、脂溶性の高い薬物が多いと考えられる。そのため、passive diffusion による BBB 透過が期待できることから、中枢移行性は評価可能であると考えられた。

第2節、第3節では MDR1-MDCK または BCRP-MDCK を用いた *in vitro* 細胞透過性試験を行った。その結果、prazosin、imatinib および quinidine の3化合物は MDR1-MDCK において 2.0 以上の CFR を示し、P-gp 基質であると分類された一方で、その他の化合物は 2.0 未満の CFR を示し、P-gp 非基質であると分類された。Dantrolene、daidzein、nebicapone、prazosin、imatinib、DSP1、DSP2、DSP3、DSP4、DSP5、DSP6、DSP7 は BCRP-MDCK において 2.0 以上の CFR を示し、BCRP 基質であると分類された一方で、quinidine、antipyrine、DSP8、DSP9 は 2.0 以下の CFR を示し、BCRP 非基質であると分類された。以上の結果より、dantrolene、daidzein、nebicapone、DSP1、DSP2、DSP3、DSP4、DSP5、DSP6 および DSP7 は BCRP 特異的基質であると分類された (Table 4)。本研究において、dantrolene、daidzein、nebicapone は BCRP 特異的基質、quinidine は P-gp 特異的基質であると分類されたが、これらの結果は先行研究と一致しており、本研究における基質性分類の妥当性が示唆される結果となった^{28,30}。また、nebicapone および DSP3 の control-MDCK 細胞における P_{app} が比較的低い値を示したため、膜透過性が低いことが懸念される。これらの化合物は *in vivo* における中枢移行性を評価するために動物に投与した際に、脳内濃度が定常状態に到達する速度が比較的遅い可能性があることが示唆された。

以上、*in silico* の手法を用いて評価化合物の物理化学的性質を明らかにするとともに、P-gp または BCRP 発現 MDCKII細胞を用いた *in vitro* 細胞透過性試験により、本研究にお

いて用いる評価化合物をトランポーター非基質、P-gp 基質、BCRP 基質、P-gp/BCRP 両基質に分類した。

Table 4. Substrate classification of test compounds based on in vitro transport assay of MDR1-MDCK and BCRP-MDCK.

Compound	Substrate classification
Dantrolene	BCRP substrate
Daidzein	BCRP substrate
Nebicapone	BCRP substrate
Prazosin	P-gp/BCRP substrate
Imatinib	P-gp/BCRP substrate
Quinidine	P-gp substrate
Antipyrine	Non-substrate
DSP1	BCRP substrate
DSP2	BCRP substrate
DSP3	BCRP substrate
DSP4	BCRP substrate
DSP5	BCRP substrate
DSP6	BCRP substrate
DSP7	BCRP substrate
DSP8	Non-substrate
DSP9	Non-substrate

第II章 BCRP 特異的基質のラット中枢移行性評価

第I章において、評価化合物の物理化学的性質および P-gp、BCRP 基質性を評価した。その結果、複数の評価化合物が BCRP 特異的基質であることが明らかになった。さらに、BCRP 特異的基質の CFR は幅広い範囲の数値を示したことから、これらの BCRP 特異的基質の中枢移行性を評価することで、in vitro BCRP 基質性と in vivo における中枢移行性の相関関係を明らかにすることができると考えた。そこで本章では、これら BCRP 特異的基質またはトランスポーター非基質をラットに静脈内投与し、定常状態における脳および脳脊髄液 (CSF) 移行性の評価を行った。

第1節 ラット脳、血清、CSF 中タンパク結合率測定

薬物の中枢移行性を評価するための指標として、脳・血漿中非結合型薬物濃度比 ($K_{p,uu,brain}$) や CSF・血漿中非結合型薬物濃度比 ($K_{p,uu,CSF}$) が用いられる。これらの指標を算出するために、脳、血漿、CSF 中の非結合型分率が必要であることから、本節では平衡透析法を用いてラットにおける脳、血清中非結合型分率を評価した。血清中非結合型分率 ($f_{u,s}$) はラット血清をもちいて平衡透析法で評価した。脳中非結合型分率 ($f_{u,b}$) は脳ホモジネート中の非結合型分率を平衡透析法で評価し、ホモジネートの希釈倍率を補正することで外挿的に算出した。ラットにおける CSF 液中アルブミン濃度は血漿中アルブミン濃度の 0.3% であることから³¹⁾、CSF 中非結合型分率 ($f_{u,c}$) は $f_{u,s}$ より以下の式を用いて推定した³²⁾。

$$f_{u,c} = \frac{1}{1 + 0.003 \times \left(\frac{1}{f_{u,s}} - 1 \right)}$$

上記の方法で求めた評価化合物の $f_{u,s}$, $f_{u,b}$, $f_{u,c}$ を以下に示す (Table 5)。Dantrolene, daidzein, antipyrine, DSP1, DSP2, DSP4, DSP6, DSP7, DSP8, DSP9 の $f_{u,c}$ を算出した結果、いずれの化合物の $f_{u,c}$ も 1 に近い値となり、脳脊髄液中のタンパク結合率は無視できると考えられたため、これらの化合物の $f_{u,c}$ は 1 とした。Nebicapone, DSP3 の $f_{u,s}$ および $f_{u,b}$ と DSP5 の $f_{u,s}$ は 0.01 以下と低い値を示した。

Table 5. Unbound fraction of test compounds in rat serum, brain and CSF.

Compound	$f_{u,s}$	$f_{u,b}$	Calculated $f_{u,c}$
Dantrolene	0.041	0.043	1.0 ^a
Daidzein	0.050	0.054	1.0 ^a
Nebicapone	0.0016	0.0020	0.35
Antipyrine	0.84	0.72 ^b	1.0 ^a
DSP1	0.066	0.19	1.0 ^a
DSP2	0.11	0.20	1.0 ^a
DSP3	0.00060	0.0041	0.17
DSP4	0.33	0.16	1.0 ^a
DSP5	0.0062	0.031	0.67
DSP6	0.050	0.035	1.0 ^a
DSP7	0.034	0.015	1.0 ^a
DSP8	0.021	0.018	1.0 ^a
DSP9	0.42	0.24	1.0 ^a

^a $f_{u,c}$ was assumed to be 1. ^b Reference from [33].

第2節 ラット PK 解析による投与量設定

中枢移行性評価は、血漿中濃度が定常状態に到達した時点で評価することが望ましい。そのため、より早い時間に定常状態に到達させることを目的に、ラットに急速静脈内投与を行ったのちに定速静脈内投与を行い、一定時間後の中枢移行性を評価することとした。評価化合物の急速静脈内および定速静脈内投与の投与量は、ラットに急速静脈内投与を行った際のPKを1-compartment modelまたは2-compartment model解析およびsimulationすることで決定した。決定した目標血漿中濃度、急速静脈内投与および定速静脈内投与の投与量を以下に示す(Table 6)。本節にて設定した目標血漿中濃度は、評価化合物をカクテルで投与した際にトランスポーターや代謝酵素の相互作用がないよう、十分に低い値を設定した。

Table 6. Target plasma concentration and doses of intravenous bolus and infusion administered into rats

	Target C _{ss} ng/mL	iv bolus mg/kg	iv infusion mg/h/kg
Dantrolene	400	0.22	0.40
Daidzein	500	1.0	1.2
Nebicapone	2000	0.70	0.69
Antipyrine	100	1.1	0.75
DSP1	100	0.13	0.071
DSP2	250	0.12	0.19
DSP3	2000	0.50	0.14
DSP4	250	0.14	0.32
DSP5	250	0.084	0.13
DSP6	200	0.20	0.54
DSP7	100	0.11	0.19
DSP8	100	0.15	0.40
DSP9	250	0.59	1.6

第3節 ラット中枢移行性評価

第 2 節にて投与量設定を行った通り、評価化合物をカクテルでラット静脈内に急速投与後、定速投与を 3 時間行った。投与後の脳、血漿、大腿筋、CSF を採取し、LC-MS/MS を用いて組織中の化合物濃度を測定したのち、第 1 節で測定した $f_{u,s}$ 、 $f_{u,b}$ 、 $f_{u,c}$ を用いて脳-血漿中総薬物濃度比($K_{p,total,brain}$)、脳-血漿中非結合型薬物濃度比($K_{p,uu,brain}$)、脳-筋肉中総薬物濃度比($K_{p,br/mu}$)、CSF-血漿中非結合型薬物濃度比($K_{p,uu,CSF}$)を算出した。その結果を Table 7 に示す。また、第 1 章で算出した各評価化合物の BCRP 発現細胞における CFR と各 K_p 値の関係を Figure 3 に示す。今回用いた BCRP 特異的基質およびトランスポーター非基質となる評価化合物において、BCRP 発現細胞における CFR が低い化合物は各 K_p 値が高い値を示す傾向にある一方で、CFR が高い化合物は、各 K_p 値が低い値を示す傾向にあることが示された。さらに、 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ は nebicapone 以外の各化合物においておおよそ同程度の値を示したが、各化合物の $K_{p,uu,CSF}$ は同化合物の $K_{p,uu,brain}$ と比較して高い傾向にあることが示唆された(Fig. 4)。BCRP 発現細胞における CFR が高く、 $K_{p,uu,brain}$ が低い評価化合物において特にその傾向が顕著であった。

Table 7. Rat $K_{p,total,brain}$, $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of test compounds.

	$K_{p,total,brain}$	$K_{p,uu,brain}$	$K_{p,br/mu}$	$K_{p,uu,CSF}$
Dantrolene	0.035	0.036	0.082	0.22
Daidzein	0.13	0.14	0.22	0.57
Nebicapone	0.0022	0.0028	0.026	0.60
Antipyrine	0.85	0.65	0.68	1.1
DSP1	0.18	0.52	0.45	1.4
DSP2	0.25	0.48	0.53	1.2
DSP3	0.0056	0.038	0.044	1.5
DSP4	0.68	0.33	0.96	0.78
DSP5	0.070	0.35	0.39	0.83
DSP6	0.61	0.44	1.0	0.67
DSP7	1.2	0.53	1.3	0.54
DSP8	0.86	0.77	1.0	1.1
DSP9	16	9.3	7.9	1.9

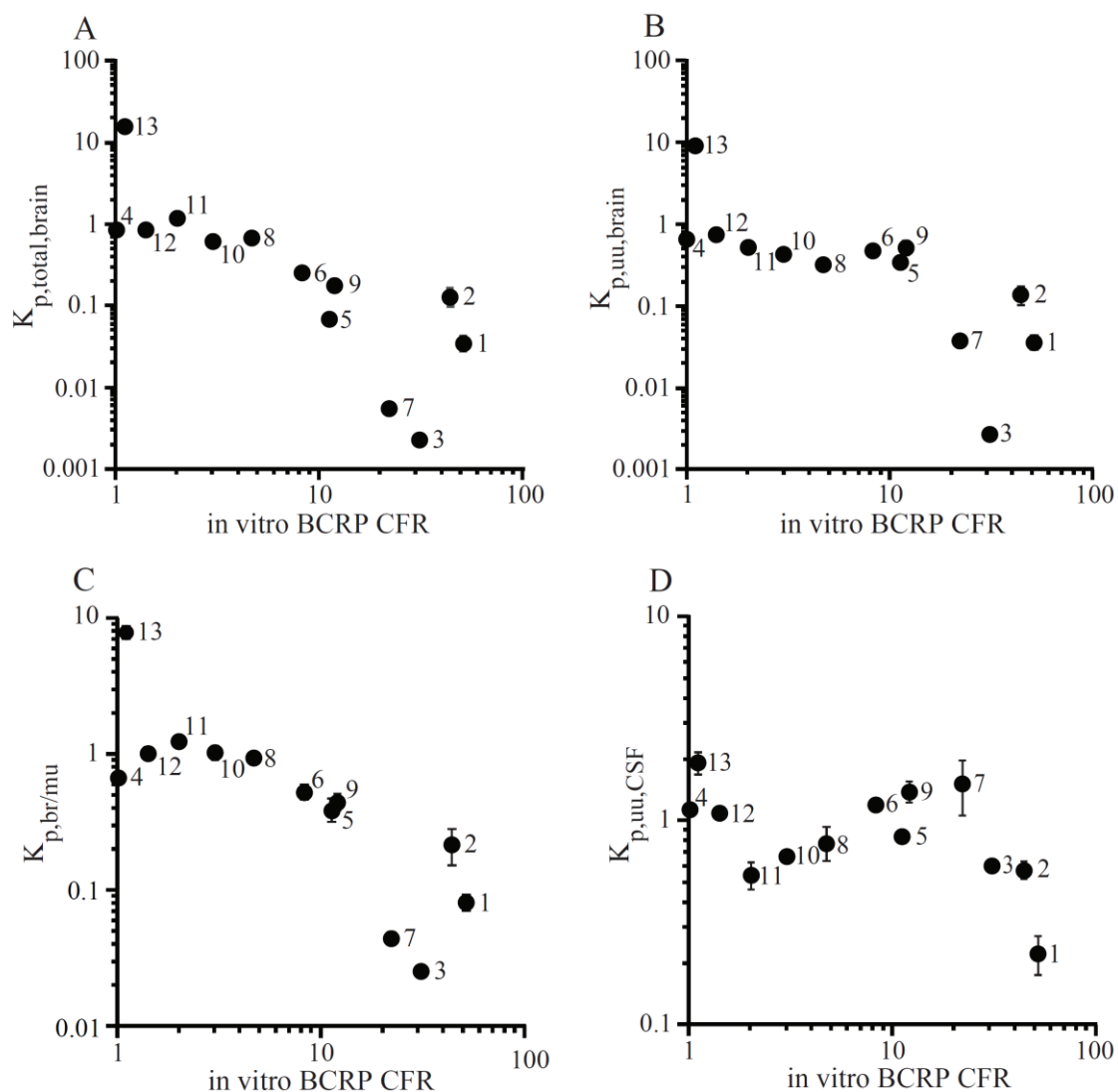


Figure 3. Relationship between $K_{p,total,brain}$, $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$, and $K_{p,uu,CSF}$ values in rats and the CFR in BCRP-MDCK of BCRP-specific substrates and non-substrates.

The $K_{p,total,brain}$ (A), $K_{p,uu,brain}$ (B), $K_{p,br/mu}$ (C), and $K_{p,uu,CSF}$ (D) values of BCRP-specific substrates and non-substrates in rats were plotted against the CFR in BCRP-MDCK. Each symbol represents the mean \pm S.E.M. of three animals. 1, dantrolene; 2, daidzein; 3, nebicapone; 4, antipyrine; 5, DSP1; 6, DSP2; 7, DSP3; 8, DSP4; 9, DSP5; 10, DSP6; 11, DSP7; 12, DSP8; 13, DSP9.

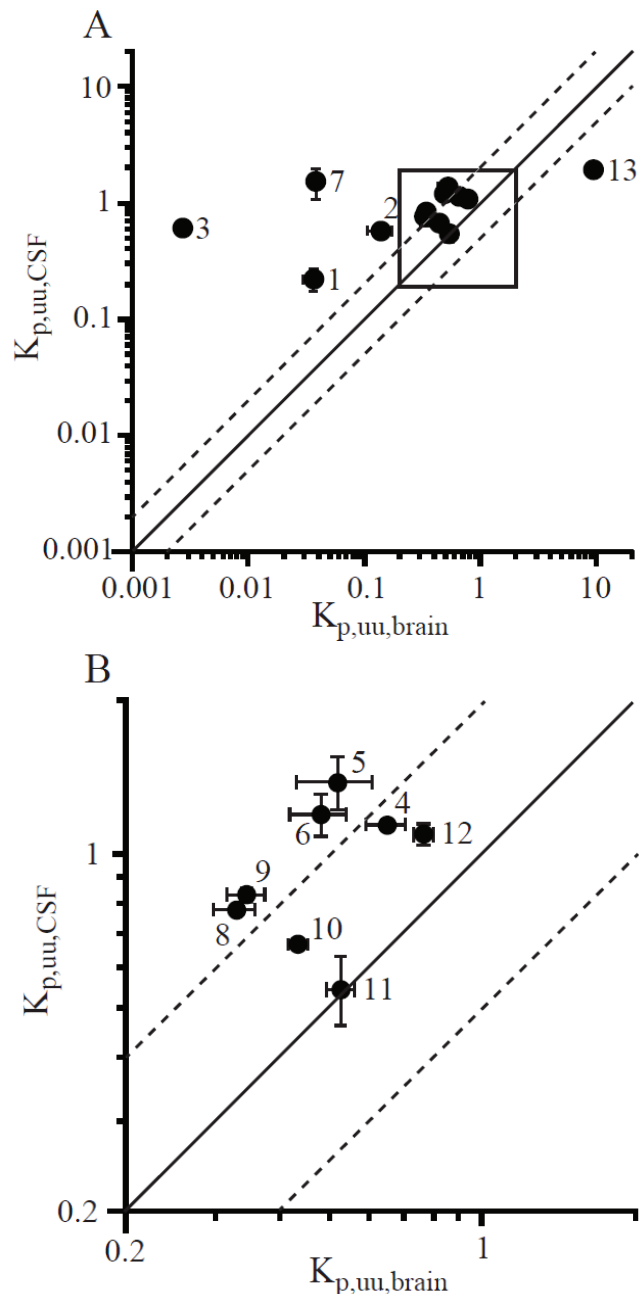


Figure 4. Comparison of the $K_{p,uu,brain}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of BCRP-specific substrates and non-substrates in rats.

Comparison of the $K_{p,uu,brain}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of BCRP-specific substrates and non-substrates (A) and magnified view (B) of the square. The solid line indicates the line of unity, and the dashed lines indicate 2-fold difference. Each symbol represents the mean \pm S.E.M of three animals. 1, dantrolene; 2, daidzein; 3, nebicapone; 4, antipyrine; 5, DSP1; 6, DSP2; 7, DSP3; 8, DSP4; 9, DSP5; 10, DSP6; 11, DSP7; 12, DSP8; 13, DSP9.

第4節 小括

本章では、BCRP 特異的基質およびトランスポーター非基質のラットにおける中枢移行性を評価した。

第 1 節では、平衡透析法により評価化合物のタンパク結合率を測定し、血清中タンパク結合率から CSF 中タンパク結合率を推定した。その結果、nebicapone、DSP3 の $f_{u,s}$ および $f_{u,b}$ と DSP5 の $f_{u,s}$ は 0.01 以下と低い値となった。 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$ といった中枢移行性の指標を算出するにあたり、タンパク結合率を用いる必要がある。そのため、 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$ などの値は血漿中または組織中タンパク結合率に大きく依存する。タンパク結合率が高く非結合型分率が低いほど、非結合型分率の誤差が相対的に大きくなることが知られているため³⁴⁾、 $f_{u,s}$ および $f_{u,b}$ が低い値を示した nebicapone、DSP3、DSP5 の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$ の解釈は注意が必要であると考えられる。

第 2 節では、評価化合物濃度をラットに急速静脈内投与し、血漿中濃度を測定して PK パラメーターを算出することで、中枢移行性評価を行う際の投与量設定を行った。中枢移行性評価を行う際は血漿中濃度を定常状態に保つことが望ましいため、定常状態に早く到達させるために、定速静脈内投与を行う前に急速静脈内投与を行うこととした。目標とした定常状態における血漿中濃度と血清中タンパク結合率から算出される定常状態における非結合型血漿中濃度は十分に低く、トランスポーターや代謝酵素の飽和およびこれらを介した相互作用の懸念は小さいと考えられた。

第 3 節では、第 2 節で投与量設定を行った通り、評価化合物をラットに投与しラットの血漿中濃度および組織中濃度を測定することで $K_{p,total,brain}$ 、 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を算出した。これらの K_p 値と同化合物の *in vitro* BCRP CFR を比較すると、いずれの K_p 値を用いた場合でも *in vitro* BCRP CFR が増加するにつれて、 K_p 値が低下する傾向が見られた。また、同化合物における各 K_p 値を比較すると、 $K_{p,total,brain}$ 、 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ は nebicapone 以外概ね近い値を示した。一方で、 $K_{p,uu,CSF}$ は $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ と比較して高い数値を示し、さらに、*in vitro* BCRP CFR が高い化合物において $K_{p,uu,CSF}$ と $K_{p,uu,brain}$ の乖離が大きくなる傾向が認められた。各 K_p 値に関していずれの指標も中枢移行性を示す指標として知られているが、このうち $K_{p,br/mu}$ の活用が比較的最近報告されている³⁵⁾。 $K_{p,br/mu}$ は、脑中総薬物濃度と筋肉中総薬物濃度の比で表される。筋肉と血液の間には BBB のような関門がないことから、血漿中非結合型薬物濃度と筋肉中非結合型薬物濃度が等しく、脳と筋肉における薬物の非結合型分率が等しいという仮定に基づき、 $K_{p,br/mu}$ は $K_{p,uu,brain}$ と等しいと考えることができる。 $K_{p,br/mu}$ の活用を報告した論文では、

複数の化合物間で脳と筋肉における非結合型分率が概ね近い値を示し、同化合物における $K_{p,br/mu}$ と $K_{p,uu,brain}$ も概ね近い値を示したことが報告されており、 $K_{p,br/mu}$ を脳移行性評価に用いる際の有用性が示唆されている。脳移行性評価を行う際に、 $K_{p,uu,brain}$ ではなく $K_{p,br/mu}$ を用いる際の利点は、実験結果から算出した非結合型分率を用いずに K_p 値を算出できる点にある。上記で述べた通り、非結合型分率が低い化合物は誤差が相対的に大きくなるため³⁴⁾、このような化合物は $K_{p,uu,brain}$ よりも $K_{p,br/mu}$ を用いる方が正確に脳移行性を評価できる可能性がある。脳および血清中の非結合型分率が低い化合物のうち、**nebicapone** は $K_{p,uu,brain}$ と $K_{p,br/mu}$ に約 10 倍の乖離があるが、上記の理由から $K_{p,uu,brain}$ よりも $K_{p,br/mu}$ が本化合物の脳移行性評価に適している可能性がある。また、**nebicapone** 以外の評価化合物に関しては、 $K_{p,uu,brain}$ と $K_{p,br/mu}$ が同程度の値を示していることから、非結合型分率および $K_{p,uu,brain}$ を大きな誤差なく求めることが出来ていると考えられる。

以上より、本章においては、BCRP 基質性が高いほど中枢移行性が低下する傾向が認められた一方で、BCRP 基質の脳移行性は CSF 移行性よりも低い傾向にあることが認められた。

第III章 BCRP 特異的基質の中枢移行における BCRP 機能評価

第II章において、BCRP 特異的基質のラット中枢移行性を評価し、BCRP 基質性が高くなるに従って中枢移行性が低下することが示された。さらに、BCRP 基質の脳移行性と CSF 移行性を比較すると、BCRP の基質性が高くなるに従って CSF 移行性が脳移行性よりも高くなる傾向が認められた。これらの現象における BCRP の役割についてさらに詳細に解析するために、本章では BCRP 特異的基質と阻害剤を併用し、BCRP 特異的基質のラット中枢移行性を評価することで、BCRP の機能解析を行った。

第1節 阻害剤の投与量設定

本章における検討では BCRP 阻害剤として elacridar を用いた。Elacridar は P-gp 阻害剤としても知られており、げっ歯類において薬物の脳移行に対する P-gp の影響を評価することを目的として、P-gp の基質とともに elacridar を併用する方法が報告されている³⁶⁾が、elacridar を用いてラット脳移行における BCRP の影響を評価する方法は確立されていない。本節では、BCRP の評価を行うために、BCRP 特異的基質である dantrolene を用いて、静脈内投与を行う elacridar の投与量を検討した。

Elacridar を評価化合物と併用投与するにあたり、化合物の投与前から十分に BCRP を阻害することを目的として、化合物の投与 1 時間前から elacridar の投与を開始することとした。Elacridar の事前投与は評価化合物と同様に、急速静脈内投与の直後から定速静脈内投与を行った。また、評価化合物投与の際の急速静脈内投与を行う投与液は elacridar を添加せず、評価化合物投与の定速静脈内投与を行う投与液にのみ elacridar を添加した。阻害剤および評価化合物の投与方法を示した模式図を Figure 5 に示す。

評価化合物の中枢移行における BCRP 機能の評価するにあたり、elacridar により BCRP が完全に阻害されている条件で各評価化合物の中枢移行性を評価することが望ましい。Elacridar によって BCRP が完全に阻害される投与条件を設定するため、elacridar 併用時における BCRP 特異的基質である dantrolene の脳移行性および CSF 移行性を評価することで、適切な elacridar の投与量を探索した。本試験における elacridar の急速静脈内投与および定速静脈内投与の投与量設定を行うにあたり、ラットに elacridar を急速静脈内投与し、得られた血漿中濃度を基に PK 解析を行うことで得た PK パラメーターを用いた。急速静脈内投与および定速静脈内投与の投与量として、低用量(急速静脈内投与: 3.8 mg/kg, 定速静脈内投与: 2.4 mg/h/kg)、中用量(急速静脈内投与: 7.6 mg/kg, 定速静脈内投与: 4.8

mg/h/kg)、高用量(急速静脈内投与: 15.2 mg/kg, 定速静脈内投与: 9.6 mg/h/kg) を設定した。これらの投与量の elacridar を Figure 5 の投与スケジュールに従って投与し、得られた dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を Figure 6 に示す。

Dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ は elacridar の投与量依存的に上昇していることから、elacridar は dantrolene の脳移行に関与する BCRP を阻害していることが明らかになった(Figure 6A)。また、中用量から高用量にかけて脳移行性上昇の飽和性を示していることから、elacridar 中用量群から高用量群において dantrolene の脳移行に関与する BCRP を elacridar が完全に阻害している可能性が示唆された。Vehicle 群と比較して、elacridar 高用量群では dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ が 7.4 倍上昇した。中用量では標準誤差が大きく、個体によっては十分に BCRP が阻害されていない可能性が考えられたため、中用量よりも高用量の elacridar 投与が BCRP 阻害の観点では望ましいと考えられた。

Dantrolene の CSF 移行性は elacridar の併用により上昇したが、脳移行性とは異なり低用量の elacridar 投与から飽和傾向を示した(Figure 6B)。このことから、dantrolene の CSF 移行に関与する BCRP は低用量から完全に阻害されることが示唆された。Vehicle 群と比較して、elacridar 高用量群では dantrolene の $K_{p,uu,CSF}$ が 2.2 倍上昇した。

以上より、中枢移行性に関与する BCRP を完全阻害する elacridar の投与量は高用量(急速静脈内投与: 15.2 mg/kg, 定速静脈内投与: 9.6 mg/h/kg)が最適であると考えられた。

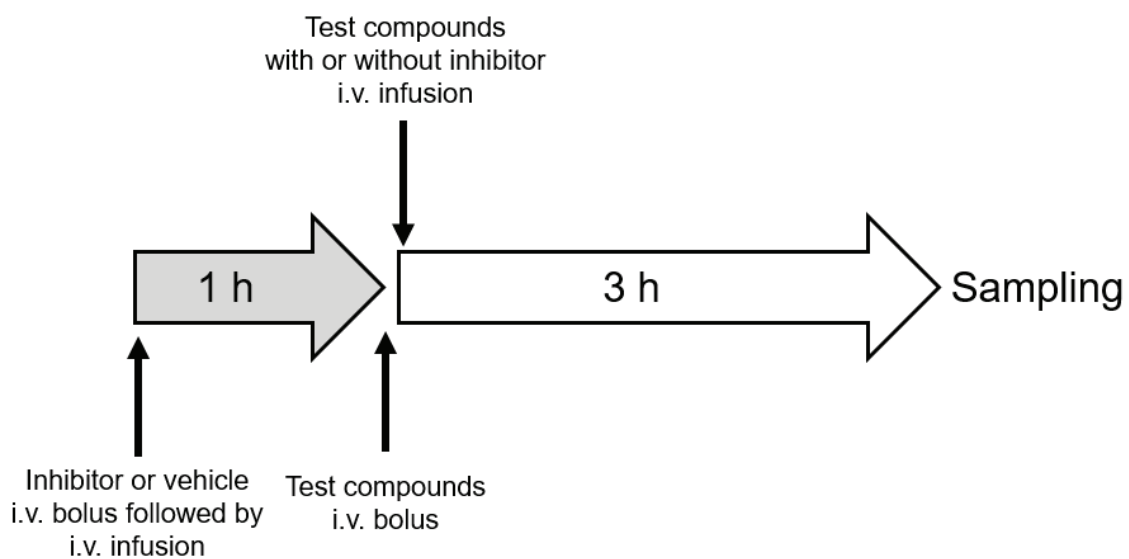


Figure 5. Timeline of dosing inhibitor and test compounds into rats via intravenous bolus and infusion.

Rats were given vehicle or inhibitor as an intravenous bolus and then infusion for 1 h. Following administration of the vehicle or inhibitor, the test compounds without inhibitor were given as an intravenous bolus, and the test compounds with or without inhibitor were intravenously infused for 3 h. The femoral muscle, CSF, brain and plasma were collected after dosing of test compounds.

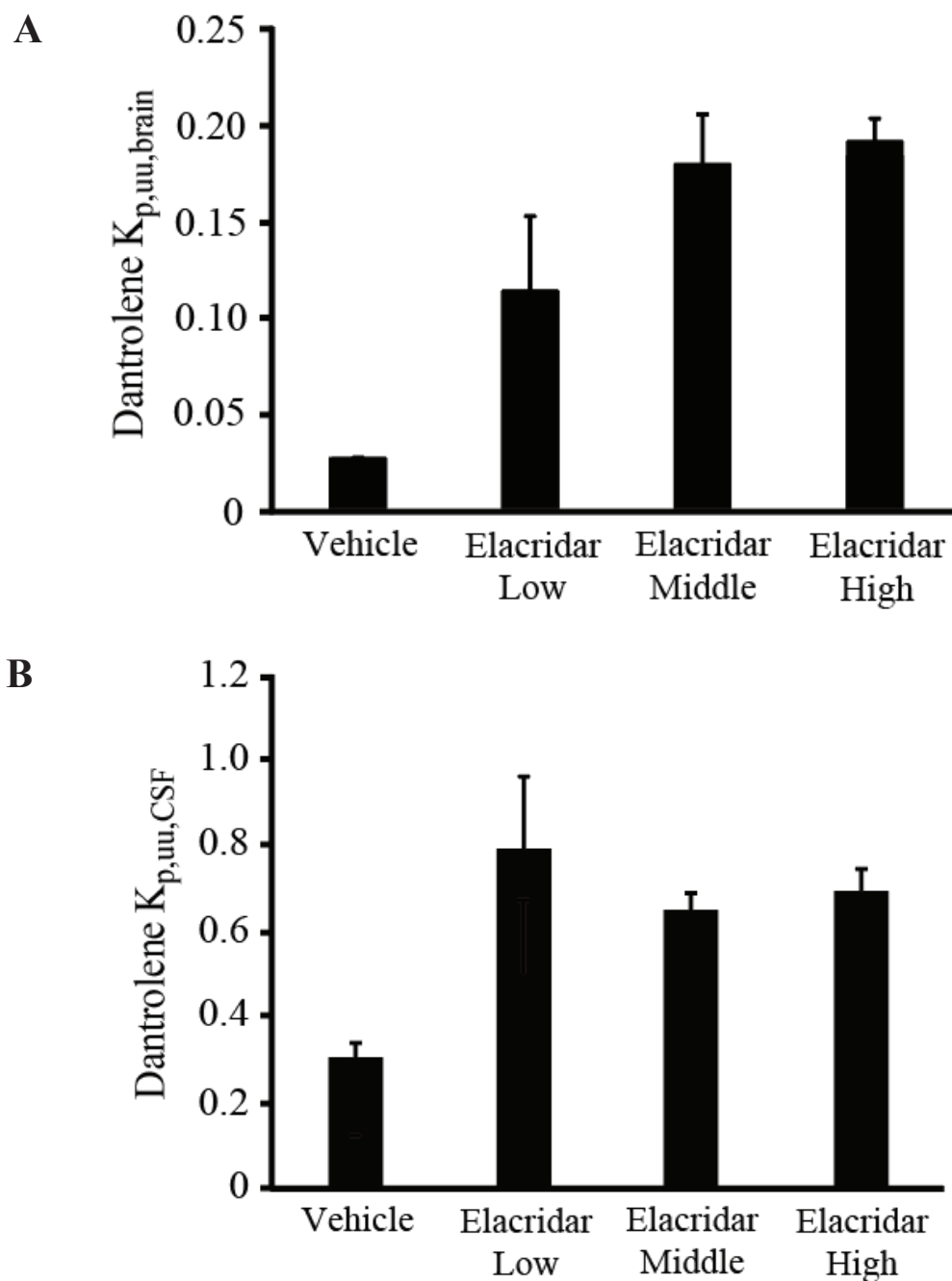


Figure 6. Increase in $K_{p,uu,brain}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of dantrolene by co-administration of elacridar.

$K_{p,uu,brain}$ (A) and $K_{p,uu,CSF}$ (B) values of dantrolene with co-administration of low, middle, and high doses of elacridar were compared. The intravenous bolus (mg/kg) and infusion (mg/h/kg) doses of elacridar were as follows: 3.8 and 2.4 for the low dose, 7.6 and 4.8 for the middle dose, 15.2 and 9.6 for the high dose. Each bar represents the mean \pm S.E.M of two or three animals.

第2節 BCRP 特異的基質の中枢移行性に対する阻害剤の影響

第1節では中枢移行に関与するBCRPの機能評価を行うことを目的に、BCRP阻害剤であるelacridarの投与量設定を行った。第2節では、第1節で設定した投与条件に基づき、BCRP特異的基質の中枢移行性に対するelacridar併用の影響について検討した。

Vehicleおよびelacridar併用時におけるBCRP特異的基質の各 K_p 値をTable 8に示す。第1節では、vehicle群に対してelacridar高用量群におけるdantroleneの $K_{p,uu,brain}$ は7.4倍上昇し、 $K_{p,uu,CSF}$ は2.2倍上昇した。本節の実験においては、elacridar併用時におけるdantroleneの $K_{p,uu,brain}$ は5.1倍上昇し、 $K_{p,uu,CSF}$ は3.0倍上昇した。第1節および本節におけるdantroleneの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$ およびその変動率は同程度であることから、本節における実験は第1節における実験を再現し、elacridarによるBCRP機能評価の実験間の変動は少ないと考えられた。

さらに本節においては、elacridar併用によるdantrolene以外のBCRP基質についても中枢移行性の向上を確認することができた。また、elacridar併用群における $K_{p,br/\mu}$ と $K_{p,uu,brain}$ を比較すると、タンパク結合率の高いnebicapone以外の評価化合物はおおよそ3倍以内の同等の値を示した。Nebicaponeを含む全ての評価化合物において、elacridar併用による $K_{p,br/\mu}$ および $K_{p,uu,brain}$ の変動率は同程度であった。

Table 8. Rat $K_{p,total,brain}$, $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/\mu}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of test compounds with or without elacridar.

	Vehicle				Elacridar			
	$K_{p,total,brain}$	$K_{p,uu,brain}$	$K_{p,br/\mu}$	$K_{p,uu,CSF}$	$K_{p,total,brain}$	$K_{p,uu,brain}$	$K_{p,br/\mu}$	$K_{p,uu,CSF}$
Dantrolene	0.035	0.036	0.082	0.22	0.18	0.18	0.40	0.66
Daidzein	0.13	0.14	0.22	0.57	0.34	0.37	0.66	0.97
Nebicapone	0.0023	0.0028	0.026	0.60	0.0043	0.0053	0.053	2.3
Antipyrine	0.85	0.65	0.68	1.1	0.62	0.76	-	0.95
DSP1	0.18	0.52	0.45	1.4	0.37	1.1	0.94	1.8
DSP2	0.25	0.48	0.53	1.2	0.47	0.89	1.3	1.4
DSP3	0.0056	0.038	0.044	1.5	0.0091	0.062	0.088	1.1
DSP4	0.68	0.33	0.96	0.78	1.1	0.54	1.6	0.89
DSP5	0.070	0.35	0.39	0.83	0.13	0.64	1.1	1.0
DSP6	0.61	0.44	1.0	0.67	0.63	0.45	1.7	0.62
DSP7	1.2	0.53	1.3	0.54	1.6	0.73	1.8	0.50
DSP8	0.86	0.77	1.0	1.1	0.77	0.69	1.9	0.82
DSP9	16	9.3	7.9	1.9	14	8.2	8.0	1.6

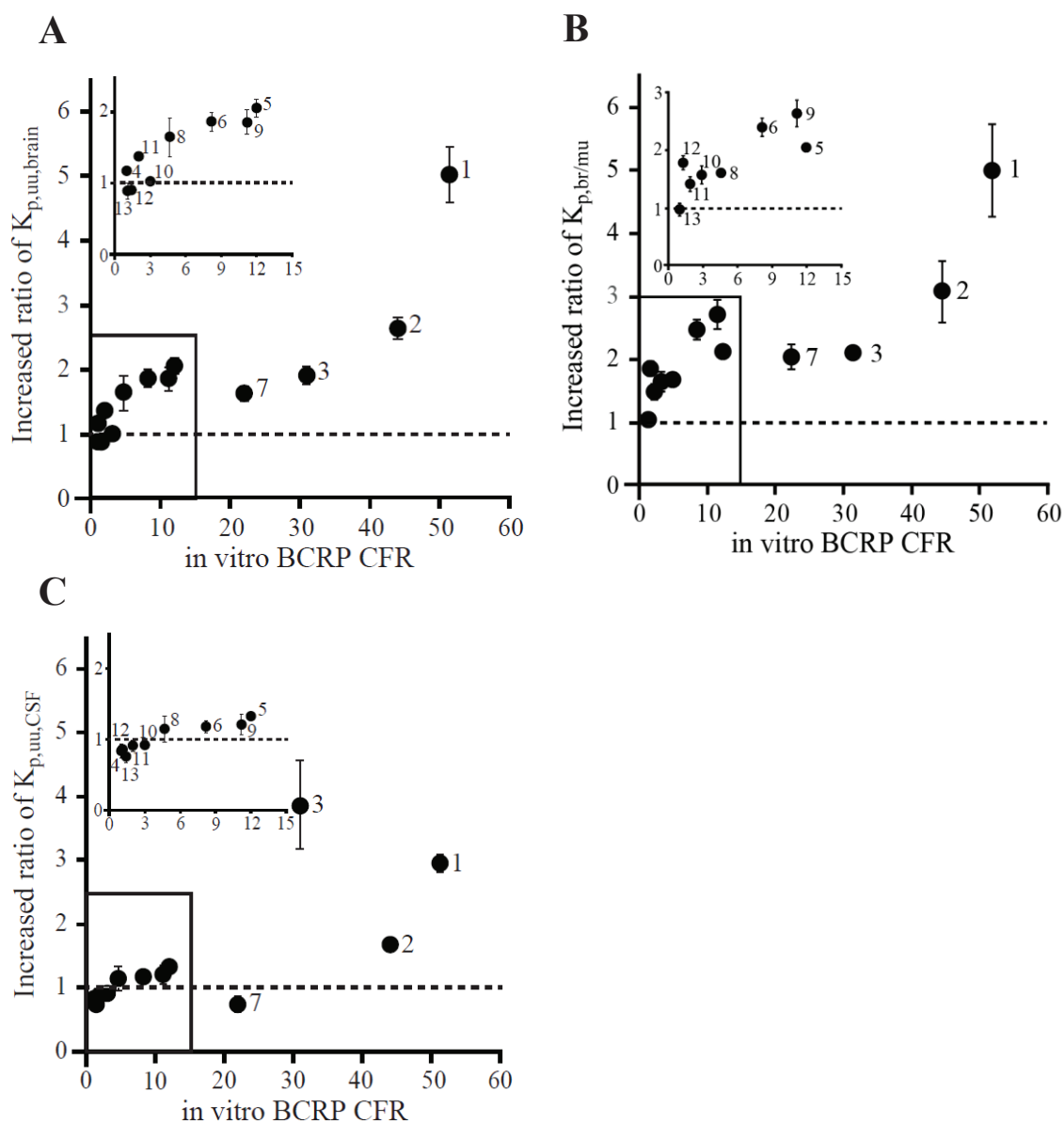


Figure 7. Increase in the $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of BCRP-specific substrates and non-substrates by co-administration of elacridar.

The increased ratios of the $K_{p,uu,brain}$ (A), $K_{p,br/mu}$ (B) and $K_{p,uu,CSF}$ (C) values of BCRP-specific substrates and non-substrates with elacridar to those without elacridar were plotted against CFR in BCRP-MDCK. The dashed lines represent unity. Each bar and symbol represent the mean \pm S.E.M of three animals. 1, dantrolene; 2, daidzein; 3, nebicapone; 4, antipyrine; 5, DSP1; 6, DSP2; 7, DSP3; 8, DSP4; 9, DSP5; 10, DSP6; 11, DSP7; 12, DSP8; 13, DSP9.

In vivo における BCRP 阻害効果についてさらに解析することを目的に、elacridar による $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ の変動率と in vitro BCRP CFR を比較した(Fig. 7)。Elacridar による $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ の変動率は、in vitro BCRP CFR が大きいほど高い傾向となり、両者には直線性の正の相関関係が認められた。 $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ の変動率と in vitro BCRP CFR の相関係数は、それぞれ 0.86, 0.83, 0.73 であった。また、nebicapone 以外の BCRP 特異的基質は、 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ の変動率よりも $K_{p,uu,CSF}$ の変動率の方が小さくなる傾向にあった。 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率と $K_{p,uu,CSF}$ 変動率の比較から、BCRP は基質の CSF 移行よりも脳移行をより強く制限することが示唆された。

第3節 Kinetics model 解析に基づいた考察

第2節において、elacridar によるラット脳移行性および CSF 移行性の変動率と in vitro BCRP CFR に直線性の正の相関関係があることが示された。第3節では、第2節で示された正の相関関係を kinetics model に基づいて考察する。Kinetics model は BBB における P-gp や BCRP の寄与を考察する際に用いられている^{37, 38)}。本節においては、Figure 8, Figure 9 に示すような、passive diffusion および BCRP による物質移動を考慮したモデルを用いる。本章においては BCRP 特異的基質を評価しているため、P-gp による排出クリアランスは無視できるものと考えた。

第2節において評価した定常状態における vehicle 群の $K_{p,uu,brain}$ を示す $K_{p,uu,brain,vehicle}$ および elacridar 併用群の $K_{p,uu,brain}$ を示す $K_{p,uu,brain,elacridar}$ は Figure 8 の kinetics model に基づいて以下の通り表される。

$$K_{p,uu,brain,vehicle} = \frac{PS_{bl-to-br,vehicle}}{PS_{br-to-bl,vehicle}}$$

$$K_{p,uu,brain,elacridar} = \frac{PS_{bl-to-br,elacridar}}{PS_{br-to-bl,elacridar}}$$

ここで $PS_{bl-to-br,vehicle}$ および $PS_{bl-to-br,elacridar}$ は、vehicle 群または elacridar 併用群において、評価化合物が BBB を構成する内皮細胞を血管側から脳側へ透過する際のクリアランスをそれぞれ示す。 $PS_{br-to-bl,vehicle}$ および $PS_{br-to-bl,elacridar}$ は、vehicle 群または elacridar 併用群において、評価化合物が BBB の内皮細胞を脳側から血管側へ透過するクリアランスを示す。

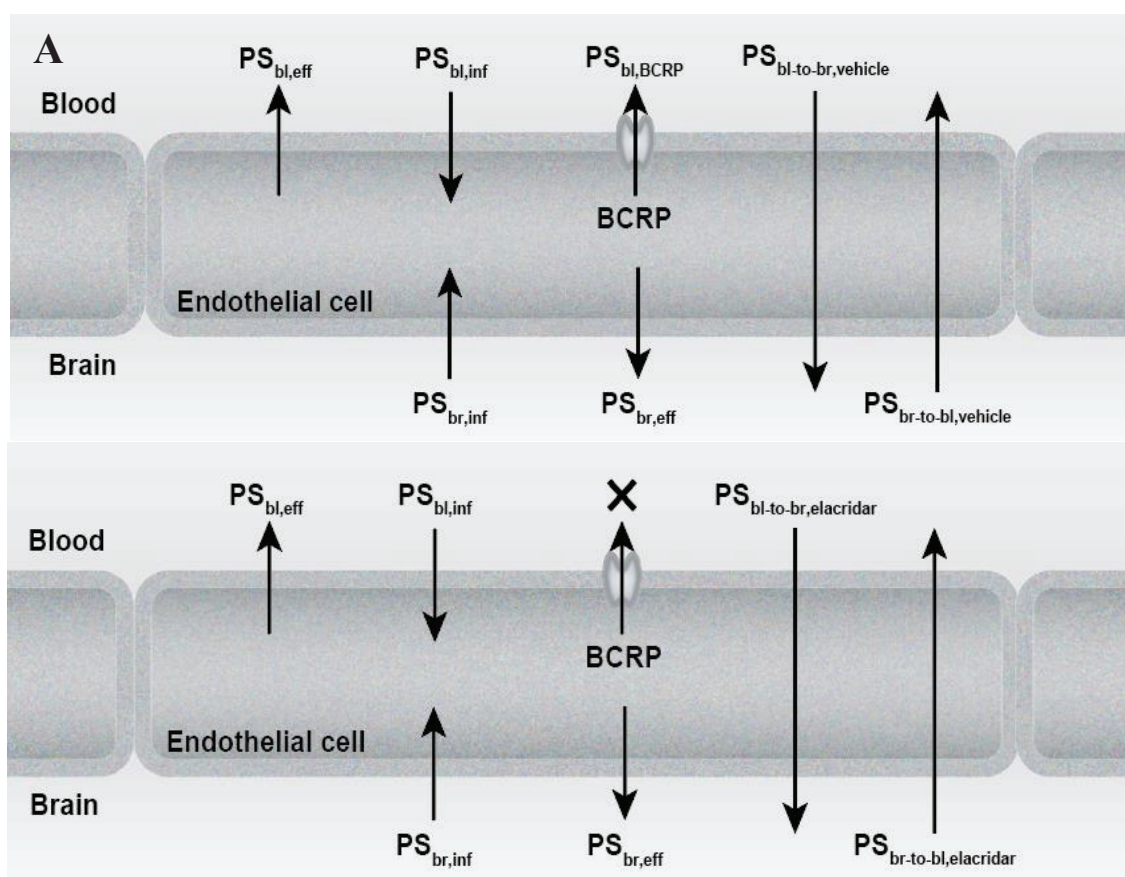


Figure 8. Kinetics model of BCRP-specific substrate permeation across the rat blood-brain barrier.

The BBB permeation of BCRP-specific substrates in rats is described as the kinetics model using various PS products (A). The inhibition of BCRP is incorporated into the kinetics model of BBB permeation in the rats co-administrated with elacridar (B). The arrows represent permeation of compounds. $PS_{bl-to-br,vehicle}$ and $PS_{br-to-bl,vehicle}$ respectively represent PS products of BBB permeation from blood side to brain side and from brain side to blood side in the rats without elacridar. $PS_{bl-to-br,elacridar}$ and $PS_{br-to-bl,elacridar}$ respectively represent PS products of BBB permeation from blood side to brain side and from brain side to blood side in the rats co-administrated with elacridar. $PS_{bl,inf}$ and $PS_{bl,eff}$ respectively represent PS products of influx and efflux via passive diffusion across the blood side plasma membrane in the endothelial cells. $PS_{br,inf}$ and $PS_{br,eff}$ respectively represent PS products of influx and efflux via passive diffusion across the brain side plasma membrane in the endothelial cells. $PS_{bl,BCRP}$ represent PS products of efflux transport mediated by BCRP expressed in blood side plasma membrane in the endothelial cells.

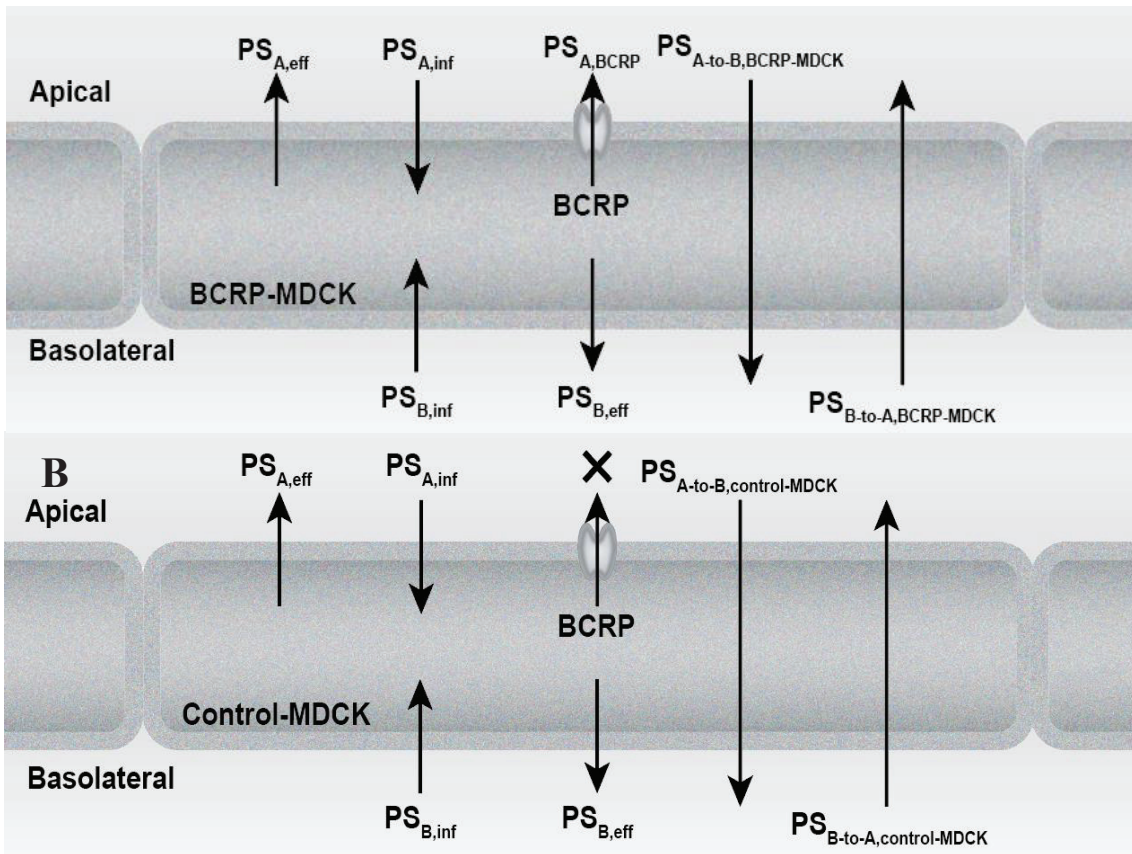


Figure 9. Kinetics model of BCRP-specific substrate permeation across the MDCKII cell monolayer.

The permeation of BCRP-specific substrate across the BCRP-MDCK (A) and control-MDCK (B) monolayer is described using various PS products. The arrows represent permeation of compounds. $PS_{A-to-B,BCRP-MDCK}$ and $PS_{B-to-A,BCRP-MDCK}$ respectively represent PS products of permeation from apical side to basolateral side and from basolateral side to apical side in the BCRP-MDCK monolayer. $PS_{A-to-B,control-MDCK}$ and $PS_{B-to-A,control-MDCK}$ respectively represent PS products of permeation from apical side to basolateral side and from basolateral side to apical side in the control-MDCK monolayer. $PS_{A,inf}$ and $PS_{A,eff}$ respectively represent PS products of influx and efflux via passive diffusion across the apical side plasma membrane in BCRP-MDCK and control-MDCK. $PS_{B,inf}$ and $PS_{B,eff}$ respectively represent PS products of influx and efflux via passive diffusion across the basolateral side plasma membrane in BCRP-MDCK and control-MDCK. $PS_{A,BCRP}$ represent PS products of efflux transport mediated by BCRP expressed in apical side plasma membrane in BCRP-MDCK.

上記の各透過クリアランスを BBB の内皮細胞における素過程のクリアランスを用いて表すと以下の通りとなる。

$$PS_{bl-to-br,vehicle} = \frac{PS_{bl,inf} \times PS_{br,eff}}{PS_{bl,eff} + PS_{bl,BCRP} + PS_{br,eff}}$$

$$PS_{br-to-bl,vehicle} = \frac{PS_{br,inf} \times (PS_{bl,eff} + PS_{bl,BCRP})}{PS_{bl,eff} + PS_{bl,BCRP} + PS_{br,eff}}$$

$$PS_{bl-to-br,elacridar} = \frac{PS_{bl,inf} \times PS_{br,eff}}{PS_{bl,eff} + PS_{br,eff}}$$

$$PS_{br-to-bl,elacridar} = \frac{PS_{br,inf} \times PS_{bl,eff}}{PS_{bl,eff} + PS_{br,eff}}$$

ここで、 $PS_{bl,inf}$ および $PS_{bl,eff}$ は、BBB を構成する内皮細胞の血管側細胞膜における passive diffusion による influx および efflux クリアランスをそれぞれ示す。 $PS_{bl,BCRP}$ は、内皮細胞の血管側細胞膜における BCRP による efflux クリアランスを示す。 $PS_{br,inf}$ および $PS_{br,eff}$ は、内皮細胞の脳側細胞膜における passive diffusion による influx および efflux クリアランスをそれぞれ示す。Elacridar 併用群は BCRP が阻害されているため、BCRP における血管側の efflux クリアランスを無視することができると考えた。

$K_{p,uu,brain,vehicle}$ および $K_{p,uu,brain,elacridar}$ を素過程のクリアランスで表した上記の式を用いて表すと以下の通りとなる。

$$K_{p,uu,brain,vehicle} = \frac{PS_{bl,inf} \times PS_{br,eff}}{PS_{br,inf} \times (PS_{bl,eff} + PS_{bl,BCRP})}$$

$$K_{p,uu,brain,elacridar} = \frac{PS_{bl,inf} \times PS_{br,eff}}{PS_{br,inf} \times PS_{bl,eff}}$$

さらに、第 2 節において elacridar 併用時における $K_{p,uu,brain}$ の変動率を求めたが、素過程のクリアランスによって $K_{p,uu,brain,elacridar}$ と $K_{p,uu,brain,vehicle}$ の比を表すと以下の通りとなる。

$$\frac{K_{p,uu,brain,elacridar}}{K_{p,uu,brain,vehicle}} = 1 + \frac{PS_{bl,BCRP}}{PS_{bl,eff}}$$

以上より、kinetics model に基づく解析では、elacridar 併用時における $K_{p,uu,brain}$ の変動

率から 1 を引いた値は、内皮細胞の血管側における BCRP による排出クリアランスと passive diffusion による排出クリアランスの比を表すことが示された。

同様に、in vitro における BCRP-MDCK または control-MDCK を用いた in vitro 経細胞輸送実験を Figure 9 に示す kinetics model に基づき考察する。

第 1 章 第 2 節で記載した通り、in vitro 細胞透過実験における efflux ratio および CFR は A-to-B および B-to-A の P_{app} を実験的に求めることで算出されるが、kinetics model に基づき control-MDCK、BCRP-MDCK における efflux ratio および CFR を解析する。Control-MDCK、BCRP-MDCK の A-to-B、B-to-A の透過クリアランスを表すと以下の通りとなる。

$$PS_{A-to-B,control-MDCK} = \frac{PS_{A,inf} \times PS_{B,eff}}{PS_{A,eff} + PS_{B,eff}}$$

$$PS_{B-to-A,control-MDCK} = \frac{PS_{B,inf} \times PS_{A,eff}}{PS_{A,eff} + PS_{B,eff}}$$

$$PS_{A-to-B,BCRP-MDCK} = \frac{PS_{A,inf} \times PS_{B,eff}}{PS_{A,eff} + PS_{A,BCRP} + PS_{B,eff}}$$

$$PS_{B-to-A,BCRP-MDCK} = \frac{PS_{B,inf} \times (PS_{A,eff} + PS_{A,BCRP})}{PS_{A,eff} + PS_{A,BCRP} + PS_{B,eff}}$$

ここで、 $PS_{A-to-B,control-MDCK}$ および $PS_{B-to-A,control-MDCK}$ は、control-MDCK における A-to-B、B-to-A の透過クリアランスをそれぞれ示す。 $PS_{A-to-B,BCRP-MDCK}$ および $PS_{B-to-A,BCRP-MDCK}$ は、BCRP-MDCK における A-to-B、B-to-A の透過クリアランスをそれぞれ示す。 $PS_{A,inf}$ および $PS_{A,eff}$ は、MDCKII細胞の apical 側細胞膜における passive diffusion による influx および efflux クリアランスをそれぞれ示す。 $PS_{A,BCRP}$ は、apical 側細胞膜における BCRP による efflux クリアランスを示す。 $PS_{B,inf}$ および $PS_{B,eff}$ は、basolateral 側細胞膜における passive diffusion による influx および efflux クリアランスをそれぞれ示す。Control-MDCK は BCRP を導入されていないため、BCRP による efflux クリアランスを無視することができると考えた。

Efflux ratio は B-to-A の透過クリアランスと A-to-B の透過クリアランスの比で表されるが、上記の式に基づき control-MDCK、BCRP-MDCK の efflux ratio を素過程のクリアランスで表すと以下の通りとなる。

$$Efflux\ ratio_{control-MDCK} = \frac{PS_{B,inf} \times PS_{A,eff}}{PS_{A,inf} \times PS_{B,eff}}$$

$$Efflux\ ratio_{BCRP-MDCK} = \frac{PS_{B,inf} \times (PS_{A,eff} + PS_{A,BCRP})}{PS_{A,inf} \times PS_{B,eff}}$$

ここで、 $efflux\ ratio_{control-MDCK}$ および $efflux\ ratio_{BCRP-MDCK}$ は control-MDCK、BCRP-MDCK の $efflux\ ratio$ をそれぞれ示す。

CFR は BCRP-MDCK の $efflux\ ratio$ と control-MDCK の $efflux\ ratio$ の比で表されるが、上記の式に基づき CFR を素過程のクリアランスで表すと以下の通りとなる。

$$CFR = 1 + \frac{PS_{A,BCRP}}{PS_{A,eff}}$$

以上より、CFR から 1 を引いた値は、BCRP-MDCK における apical 側の BCRP による $efflux$ クリアランスと passive diffusion による $efflux$ クリアランスの比で表される。

Kinetics model に基づき、BCRP 特異的基質の in vitro BCRP CFR および elacridar 併用による $K_{p,uu,brain}$ 変動率は、ともに BCRP による $efflux$ クリアランスと BCRP が発現している細胞膜における passive diffusion による透過クリアランスの比で表されることが明らかになった。

この BCRP-passive diffusion クリアランス比は、in vitro MDCKII 細胞膜と in vivo ラット BBB において異なる値を示すと考えられる。その最も大きな要因として、BCRP-MDCK における BCRP の発現量とラット BBB における BCRP の発現量が異なるため、BCRP による $efflux$ クリアランスが異なる点が考えられる。一般に、基質濃度が十分低い場合の BCRP による排出クリアランスは Michaelis-Menten 式に基づいて以下の通り表される。

$$PS_{BCRP} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

ここで、 PS_{BCRP} は BCRP による $efflux$ クリアランスを示す。 V_{max} は BCRP による、発現膜上における最大基質輸送速度を示す。 K_m は V_{max} の半分の輸送速度を示す際の基質濃度を示す。BCRP の発現量は V_{max} と比例関係にあるため、 PS_{BCRP} とも比例関係にあると考えられる。

本研究において、in vitro BCRP CFR は human BCRP を用いて評価しており、in vivo

において評価した BCRP 機能は rat BCRP の機能であるため、BCRP 輸送活性において種差がある可能性を考える必要がある。げっ歯類の BCRP においては、mouse BCRP がよく研究されており、ヒトとの相同性が高いことが報告されている³⁹⁾。さらに、mouse BCRP 発現細胞と human BCRP 発現細胞の efflux ratio を比較したところ、両者はよく一致しており種差が少ないことが報告されている⁴⁰⁾。以上より、human BCRP とげっ歯類である rat BCRP の種差は kinetics model に基づく解析において考慮する必要はないと判断した。

以上より、発現量に基づく in vitro MDCKII細胞および in vivo BBB における BCRP-passive diffusion クリアランス比の差は、化合物間で単一のスケールリングファクターを用いて表される比例関係にあると考えられる。この関係は、第 2 節において in vitro BCRP CFR と elacridar 併用による $K_{p,uu,brain}$ 変動率が直線性の相関関係にあったことと一致しており、BCRP 特異的な基質の脳移行性は、本章において採用した kinetics model によって説明できることが示された。このことは、MDCKII細胞を用いた in vitro 細胞透過試験の結果に基づいて、ラットにおける in vivo の BCRP 機能を予測できることを示唆するものである。さらに、ヒト BBB およびラット BBB における BCRP の発現量が報告されている⁴¹⁾ことから、発現量の種差を補正することによって、BCRP 特異的基質のヒトにおける脳移行性を MDCKII細胞による in vitro 細胞透過試験の結果から予測できる可能性が示唆された。

Elacridar 併用による $K_{p,uu,CSF}$ 変動率において、 $K_{p,uu,brain}$ 変動率と同様に線形性の相関関係が認められたことから、 $K_{p,uu,CSF}$ 変動率に関しても BCRP による efflux クリアランスから説明できると考えられるが、 $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は $K_{p,uu,brain}$ 変動率よりも低い傾向にあった。一般に、BBB は血液脳脊髄液関門(BCSFB)などの他の関門よりも表面積が大きいことから、中枢組織への化合物透過は、BBB の影響を大きく受けると考えられている⁴²⁾。また、脳実質細胞と CSF の間の関門については報告が少なく、関門がない場合は脳実質細胞における化合物の非結合型濃度と CSF 中濃度は定常状態において等しいと考えられる。こうした前提に立つと、本節において考えている kinetics model では $K_{p,uu,CSF}$ 変動率と $K_{p,uu,brain}$ 変動率の違いを説明することができず、本現象を説明するためには CSF 中の薬物動態を規定する因子をさらに kinetics model に取り入れる必要がある。

第4節 小括

本章において、BCRP 特異的基質の中枢移行性に及ぼす BCRP 阻害の影響を評価することで、化合物の中枢移行における BCRP の機能を定量的に解析した。

第1節では、代表的な BCRP 特異的基質である dantrolene を用いて BCRP 阻害剤である elacridar の投与量設定を行った。Elacridar は dantrolene 投与の1時間前から急速静脈内投与および定速静脈内投与を行った。さらに dantrolene のみを急速静脈内投与後、elacridar および dantrolene を共に定速静脈内投与することで、BCRP 阻害下における dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を評価した。その結果、vehicle 群と比較して elacridar 併用群における dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は上昇した。さらに、elacridar の投与量に対して、dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は飽和性を示し、dantrolene の脳移行および CSF 移行に關与する BCRP が完全に阻害されたことが示唆された。P-gp および BCRP の基質である sunitinib のマウスにおける脳移行性は、elacridar 併用によって P-gp/BCRP dual knockout マウスと同程度まで上昇することが報告されている⁴³⁾ことから、elacridar 投与によって、BBB における P-gp および BCRP を完全に阻害することは可能であると考えられる。さらに、BCRP knockout ラットにおいて報告されている dantrolene の $K_{p,total,brain}$ は 0.156 であり、wild-type ラットと比較して dantrolene の $K_{p,total,brain}$ は 3.9 倍上昇することが報告されている⁴⁴⁾。本章においては、第1節および第2節において高用量の elacridar 併用下における dantrolene の $K_{p,total,brain}$ を測定した。その結果 vehicle 群と比較して、elacridar 併用下における dantrolene の $K_{p,total,brain}$ は、第1節において 7.4 倍、第2節において 5.1 倍上昇した。さらに、elacridar 併用下における dantrolene の $K_{p,total,brain}$ は、第1節において 0.187、第2節において 0.175 であった。これらの値は BCRP knockout ラットのものと同程度であり、このことから高用量の elacridar が BBB における BCRP を完全に阻害している可能性が示唆された。

第2節では、第1節において確認した elacridar の投与条件を用いて種々の BCRP 特異的基質の中枢移行に關与する BCRP 機能評価を行った。第1節においては dantrolene の中枢移行性が elacridar 併用により上昇したが、第2節においては dantrolene 以外の BCRP 基質も elacridar によって中枢移行性が上昇することが示された。Elacridar 併用下における BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ は、タンパク結合率が非常に高い nebicapone において顕著な違いを示した。BCRP 特異的基質の elacridar 併用による $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率は、nebicapone を含む全ての化合物において同程度のものであった。一方で、BCRP 特異的基質の elacridar 併用による $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は、 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動

率と比較して nebicapone を除く全化合物において低い傾向にあり、BCRP は基質の CSF 移行よりも脳移行を強く制限することが示唆された。一般に、CSF における薬物濃度は非結合型脳内濃度のサロゲートになることが期待されるが、本節における検討から、BCRP 基質の CSF 中薬物濃度をサロゲートとした場合、非結合型脳内濃度を過大評価する可能性が示唆された。また、BCRP の影響を定量的に解析するために、*in vitro* BCRP CFR と $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率をプロットした。その結果、 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ いずれの場合においても両者に直線性の相関関係が認められた。

第 3 節では、第 2 節において得られた *in vitro* BCRP CFR と $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率の相関関係について kinetics model に基づく解析を行った。本節において採用した kinetics model に基づくと、*in vitro* BCRP CFR および $K_{p,uu,brain}$ 変動率は、BCRP による efflux クリアランスと BCRP が発現している細胞膜における passive diffusion の efflux クリアランスの比で表されることが明らかになった。Human BCRP と rat BCRP の輸送活性の種差が小さいと考えられることから、ラット BBB と *in vitro* MDCKII 細胞におけるクリアランス比の違いは、主に BCRP の発現量の差に基づくものと思われる。すなわち、ラット BBB と *in vitro* MDCKII 細胞における BCRP-passive diffusion クリアランス比は BCRP 発現量に基づく比例関係にあると考えられることから、第 2 節において評価した *in vitro* BCRP CFR と elacridar 併用による $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ の変動率が直線性の相関関係にあったこととよく一致しており、脳移行に関与する BCRP 機能は本節において採用した kinetics model によって説明できることが示された。以上より、BCRP を発現させた MDCKII 細胞を用いた *in vitro* 経細胞透過性試験は、*in vivo* における BCRP 機能を反映する試験系であり、創薬研究における BCRP 基質のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、kinetics model に基づき、*in vitro* BCRP CFR と *in vivo* ラット BBB における BCRP 機能が直線性の相関関係にあったため、ラット BBB における BCRP 機能は、*in vitro* BCRP CFR から予測できることが示唆された。さらに、ラットおよびヒト BBB における BCRP 発現量が明らかになっているため、BCRP 発現量に基づく補正を行うことで、ヒトにおける BCRP 機能を予測できる可能性が考えられることから、医薬品研究への更なる応用が期待できる。

一方で、 $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率よりも低い傾向にあった。一般に、BBB は BCSFB 等の他の関門よりも表面積が大きいことから、化合物の脳移行性は BBB の影響を大きく受け⁴²⁾、さらに脳実質と CSF 間に関門が存在しないと仮定すれば、 $K_{p,uu,CSF}$ は $K_{p,uu,brain}$ と同一の値になると考えられる。第 3 節において採用された kinetics model では、これらの $K_{p,uu,CSF}$ と $K_{p,uu,brain}$ の違いを説明することができず、CSF 移行に与える BCRP

の機能を解析するためには更なる CSF における薬物動態の理解に基づいた kinetics model が望まれる。

$K_{p,uu,CSF}$ 変動率は、 $K_{p,uu,brain}$ 変動率と同様に、in vitro BCRP CFR と直線性の相関関係にあったことから、BCRP による輸送が関与していると考えられる。 $K_{p,uu,CSF}$ 変動率と $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ 変動率の乖離の原因として、BBB 以外の関門に発現する BCRP が CSF における薬物動態に関与する可能性が考えられる。BCRP 発現が報告されている関門として、BCSFB および血液クモ膜関門(BAB)が挙げられる。BCRP はラット BCSFB において発現が報告されており⁴⁵⁾、その局在は脈絡叢の apical 側に発現していることから⁴⁶⁾、BCSFB に発現する BCRP は血液側から CSF 側へ基質を輸送することが示唆されている。また、P-gp knockout マウス、BCRP knockout マウスおよび P-gp/BCRP knockout マウスを用いて、P-gp および BCRP 基質である topotecan の中枢移行性に関する研究が行われており、BCSFB に発現する BCRP は脳室内において血液側から CSF 側へ topotecan を輸送するという可能性が示唆されている⁴⁷⁾。以上のように、本研究においても BCSFB に発現する BCRP が血液から CSF への influx に寄与していれば、elacridar 併用によって BCSFB における BCRP を介した CSF への influx が阻害されるため、BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,CSF}$ 変動率が $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率よりも低いという結果と一致する。また、クモ膜に存在する BAB の血管側に BCRP が発現していることがブタにおいて報告されており、CSF 側から血液側へ基質を輸送する可能性が示唆されている⁴⁸⁾。さらに、ブタ BAB に発現する BCRP の発現量は、ブタ BBB に発現する BCRP の発現量よりも低いことが明らかになっている⁴⁹⁾。以上より、BAB の影響を受けると考えられるクモ膜下孔に存在する CSF においては、BBB よりも BAB による影響を大きく受けるため、BCRP は基質の CSF 移行よりも脳移行を強く制限する可能性が指摘されている⁴⁸⁾。これは、本研究において認められた elacridar 併用による BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,CSF}$ 変動率が $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率よりも低いという結果と一致している。上記のように、 $K_{p,uu,CSF}$ 変動率と $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率の乖離の原因を説明しうる報告は存在するが、BCRP 基質の CSF における薬物動態を定量的に理解するためには更なる研究が必要であると考えられる。

以上より、本章においては、elacridar 併用による BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率が in vitro BCRP CFR と直線性の相関を示すことが示された。この結果は、本章において採用した kinetics model と一致しており、BCRP 特異的基質の脳移行性は kinetics model によって定量的に説明できることが示された。また、elacridar 併用による BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,brain}$ 変動率が $K_{p,uu,CSF}$ 変動率よりも大きい傾向にあり、BCRP は基質の脳移行よりも CSF 移行を強く制限することが示唆された。一方で、 $K_{p,uu,brain}$

変動率および $K_{p,u,u,CSF}$ 変動率の乖離は kinetics model によって説明することができず、BCRP 基質の CSF における薬物動態を定量的に理解するためには更なる研究が必要であると考えられる。

第IV章 P-gp/BCRP 両基質の中枢移行における BCRP 機能評価

第III章において、BCRP 特異的基質のラット中枢移行における BCRP 機能を定量的に解析した。その結果、脳および CSF 移行における BCRP の機能は BCRP-MDCK を用いた *in vitro* 経細胞輸送実験の結果に相関することが示され、さらに発現量の種差を考慮することでヒト BBB における BCRP 機能を推定できる可能性が示唆された。本知見は創薬研究に応用できると思われるが、第III章における結果は BCRP 特異的基質を用いているため、P-gp/BCRP 両基質においても同様の関係が成立するか不明である。

P-gp/BCRP 両基質の脳移行性は P-gp knockout マウス、BCRP knockout マウス、P-gp/BCRP knockout マウスを用いて研究されているが、それらの結果から P-gp、BCRP は相互作用を行い、基質を排出している可能性が指摘されている⁵⁰⁾。このことから、BCRP 特異的基質と同様に、P-gp/BCRP 両基質においても、中枢移行に関与する BCRP 機能を定量的に理解する必要があると考えた。また、序論で述べたように、医薬品や医薬品候補化合物のうち BCRP 基質となるものの多くは P-gp/BCRP 両基質となる。そのため、BCRP 特異的基質を用いた解析のみでは創薬研究への応用に不十分であると考えた。そこで、本章においては、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する BCRP 機能について解析を行い、BCRP 特異的基質における BCRP 機能と比較を行った。

第1節 P-gp 基質および P-gp/BCRP 両基質のラット脳、血清、CSF 中タンパク結合率測定

本節において、P-gp 基質および P-gp/BCRP 両基質の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を算出するために、第II章 第2節と同様に、平衡透析法を用いてラットにおける脳、血清、CSF 中の非結合型分率を評価した。その結果を Table 9 に示す。

Table 9. Unbound fraction of test compounds in rat serum, brain and CSF.

Compound	$f_{u,s}$	$f_{u,b}$	Calculated $f_{u,c}$
Quinidine	0.239	0.043	1.0 ^a
Imatinib	0.038	0.022	1.0 ^a
Prazosin	0.23	0.055	1.0 ^a

^a $f_{u,c}$ was assumed to be 1.

第2節 P-gp 阻害剤の投与量設定

本章において、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する BCRP 機能を解析することを目的としているが、そのためには中枢移行に関与する P-gp 機能と BCRP 機能を分離して評価する必要がある。P-gp 機能と BCRP 機能を分離評価する方法として、本章においては、P-gp 阻害剤である PSC-833 を用いることとした。PSC-833 は BCRP に対する阻害活性は弱いですが、P-gp 阻害活性は強いことが知られているため⁴⁰、in vivo において P-gp 特異的阻害剤として用いることができる可能性があると考えた。本節においては、P-gp 特異的基質である quinidine³⁰)を用いて、PSC-833 のラットに対する投与量設定を行った。

PSC-833 および quinidine の投与スケジュールは、Figure 5 に示す elacridar と同様のものとした。また、elacridar と同様に、ラットに PSC-833 を急速静脈内投与し、得た PK 結果を解析することで、低用量(急速静脈内投与: 1.0 mg/kg, 定速静脈内投与: 0.21 mg/h/kg)、中用量(急速静脈内投与: 2.0 mg/kg, 定速静脈内投与: 0.42 mg/h/kg)、高用量(急速静脈内投与: 4.0 mg/kg, 定速静脈内投与: 0.84 mg/h/kg) の投与量を設定した。この3つの投与量の PSC-833 と quinidine を併用した際の quinidine の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を Figure 10 に示す。

Quinidine の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は PSC-833 の投与量依存的に上昇した。また、 $K_{p,uu,brain}$ は PSC-833 の投与量増加による飽和傾向は見られなかったが、 $K_{p,uu,CSF}$ は PSC-833 の中用量、高用量で同等の値を示し、飽和傾向にあることが示された。本実験において得られた高用量の PSC-833 併用による P-gp 阻害条件下における quinidine の中枢移行性やその変動率は、P-gp knockout ラットと概ね同程度であったため^{33,51})、PSC-833 は quinidine の中枢移行に関与する P-gp を完全に阻害していると考えられた。また、BCRP 特異的基質である dantrolene を PSC-833 と併用し、脳および CSF 移行性を評価したところ、いずれの投与量の PSC-833 によっても脳および CSF 移行性に有意な変化は見られなかったことから、PSC-833 は今回検討した投与量において中枢移行性に関与する BCRP を阻害しないことが示唆された。

以上より、中枢移行性に関与する BCRP を阻害せず、P-gp のみを阻害する条件として、高用量(急速静脈内投与: 4.0 mg/kg, 定速静脈内投与: 0.84 mg/h/kg)の PSC-833 を評価化合物と併用することとした。

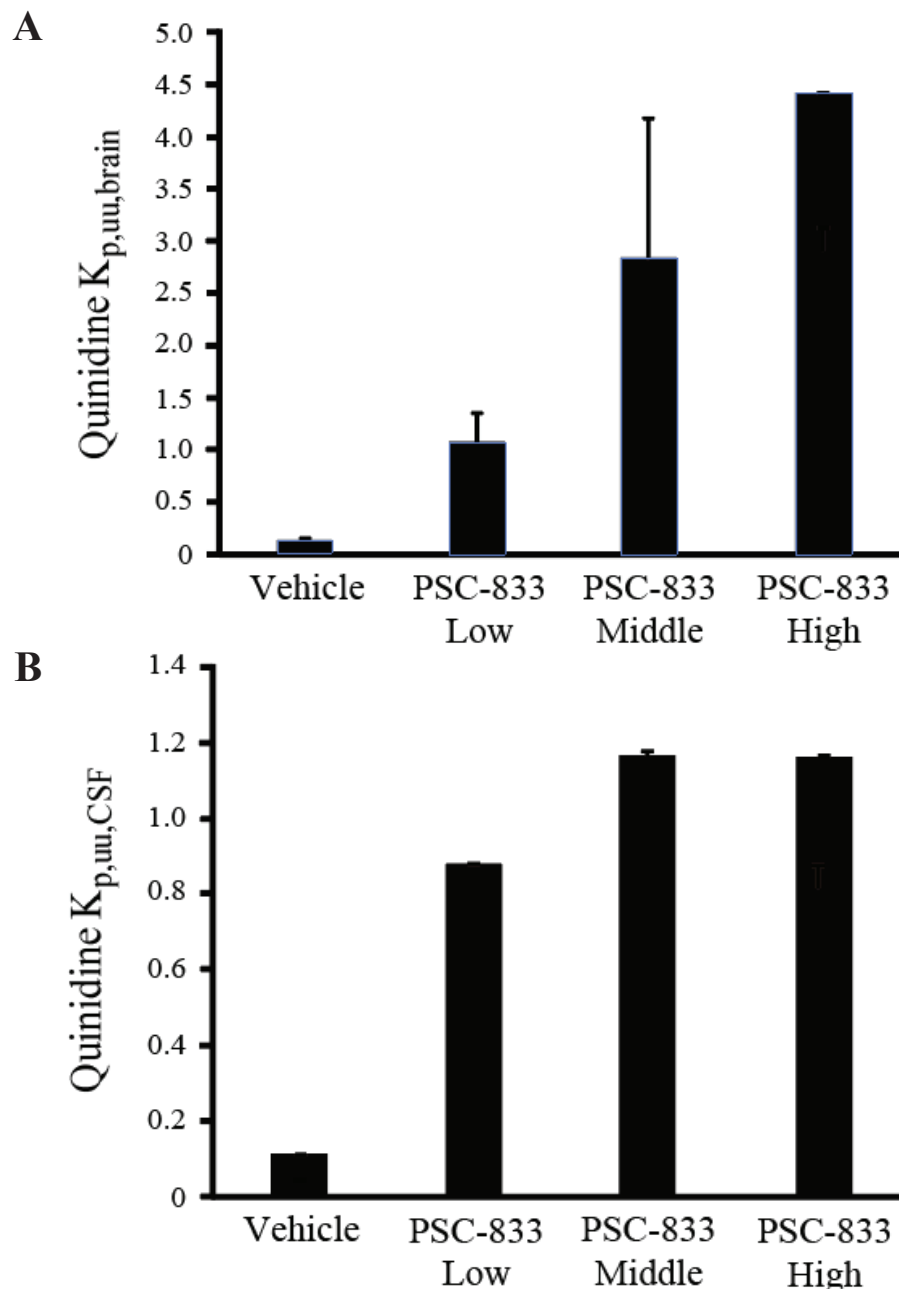


Figure 10. Increase in $K_{p,uu,brain}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of quinidine by co-administration of PSC-833.

The $K_{p,uu,brain}$ (A) and $K_{p,uu,CSF}$ (B) values of quinidine with co-administration of low, middle, and high doses of PSC-833 were compared. The intravenous bolus (mg/kg) and infusion (mg/h/kg) doses of PSC-833 were as follows: 1.0 and 0.21 for the low dose, 2.0 and 0.42 for the middle dose, 4.0 and 0.82 for the high dose. Each bar represents the mean \pm S.E.M of two or three animals.

第3節 P-gp/BCRP 両基質の中枢移行性に対する阻害剤の影響

第2節ではP-gp/BCRP両基質の中枢移行性に関与するP-gp機能とBCRP機能を分離評価することを目的にPSC-833の投与量設定を行った。第3節では、第2節で設定したPSC-833投与条件および、第III章第2節で設定したelacridar投与条件に基づき、P-gp/BCRP両基質の中枢移行性に対するPSC-833とelacridar併用の影響について検討した。同時に、P-gp特異的基質であるquinidineおよびBCRP特異的であるdantroleneを用いて、特異的基質に対する両阻害剤の影響を確認した。PSC-833およびelacridarによる $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ の変動率をFigure 11に示す。

PSC-833を併用した際のquinidineの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は、第2節における投与量設定のための実験と同程度の値を示した。このことから、PSC-833併用によるP-gp阻害に大きな実験間差はないと考えられた。PSC-833およびelacridarを併用した際のquinidineの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は同程度の値を示した。一方で、dantroleneの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ はelacridar併用によって上昇したが、PSC-833を併用した際のdantroleneの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は変動を示さなかった。以上のPSC-833およびelacridarによる阻害効果は、quinidineおよびdantroleneのP-gpおよびBCRPに対する基質性と一致している。以上より、PSC-833は脳移行に関与するP-gpのみを特異的に阻害し、elacridarは脳移行に関与するP-gpとBCRPを阻害することが確認された。

P-gp/BCRP両基質としてprazosinおよびimatinibを用いた。Prazosinおよびimatinibは、第I章第2節および第3節において実施したin vitro細胞透過実験において、P-gp/BCRP両基質として分類されている。Prazosinおよびimatinibの $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は、PSC-833およびelacridarの併用によって上昇した。Prazosinおよびimatinibの $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 上昇は、PSC-833併用による上昇よりもelacridar併用による上昇が大きかったことから、prazosinおよびimatinibの脳移行にはP-gpとBCRPが関与しており、in vitroに基づく基質性の分類と一致していることが示された。PSC-833およびelacridarによる $K_{p,uu,CSF}$ 変動率が同程度であったことから、prazosinおよびimatinibのCSF移行は、P-gpと比較してBCRPの寄与が見かけの上では小さいと考えられた。

本節において、PSC-833はP-gpを完全に阻害し、elacridarはP-gpとBCRPを完全に阻害すると考えられたことから、elacridar併用時における K_p 値とPSC-833併用時における K_p 値の比が脳およびCSF移行時におけるBCRP機能を示すと考えられる。第III章第3節において、BCRP特異的基質の中枢移行に関与するBCRP機能をkinetics modelを用いて解析した。P-gp/BCRP両基質を用いた場合においても、PSC-833併用下においては

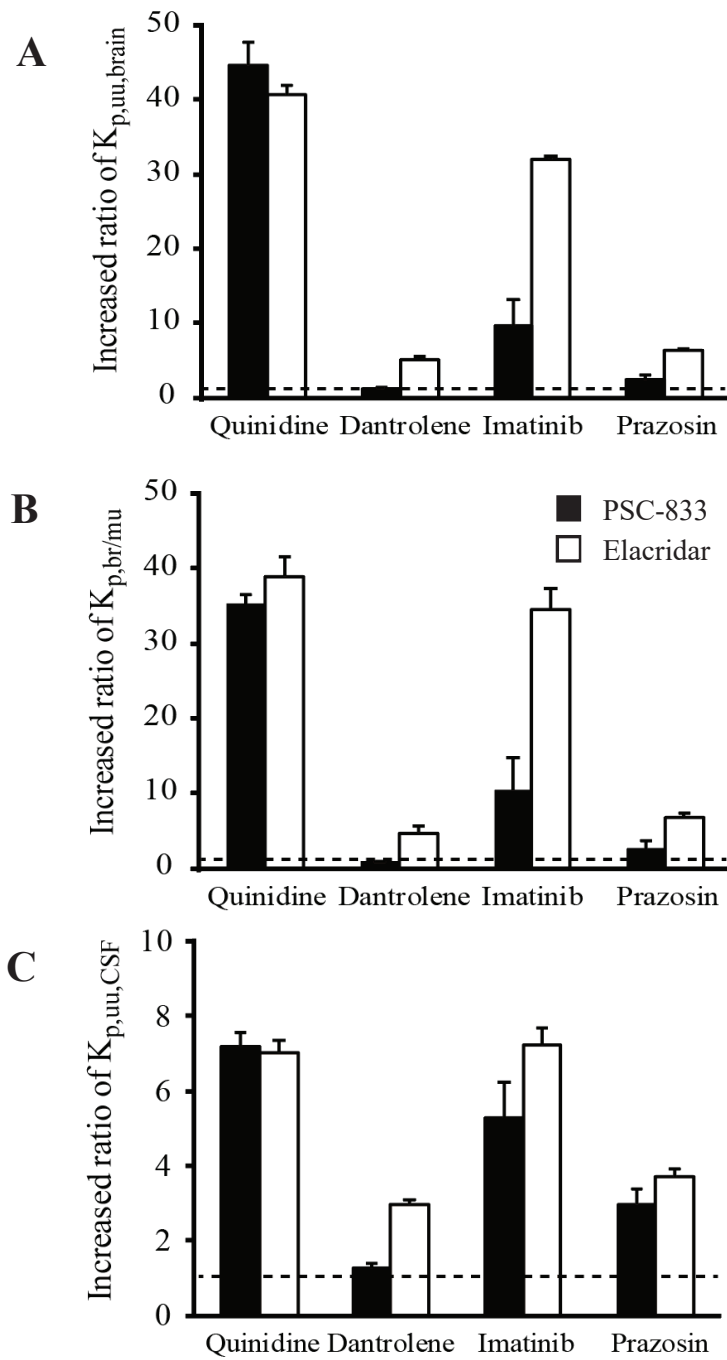


Figure 11. Comparison of the effect of the co-administration of elacridar and PSC-833 on $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values of the P-gp/BCRP dual substrates.

The increased ratios of the $K_{p,uu,brain}$ (A), $K_{p,br/mu}$ (B) and $K_{p,uu,brain}$ (C) values of P-gp and BCRP substrates in rats were shown. The closed bars show the increased ratios by co-administration of PSC-833, and the open bars show the increased ratios by co-administration of elacridar. The dashed lines represent unity. Each bar represents the mean \pm S.E.M of two or three animals.

P-gp 機能が無視できることが示唆されたため、Figure 8 に示す kinetics model を用いて解析することが可能であると考えられる。kinetics model に基づいて P-gp/BCRP 両基質に関する BCRP 機能を示すと以下の通りとなる。

$$\frac{K_{p,uu,brain,elacridar}}{K_{p,uu,brain,PSC-833}} = 1 + \frac{PS_{bl,BCRP}}{PS_{bl,eff}}$$

ここで、 $K_{p,uu,brain,elacridar}$ は elacridar 併用群の $K_{p,uu,brain}$ を示し、 $K_{p,uu,brain,PSC-833}$ は PSC-833 併用群の $K_{p,uu,brain}$ を示す。また、 $PS_{bl,eff}$ は、BBB を構成する内皮細胞の血管側細胞膜における passive diffusion による efflux クリアランスを、 $PS_{bl,BCRP}$ は、内皮細胞の血管側細胞膜における BCRP による efflux クリアランスをそれぞれ示す。上記のように、elacridar 併用時における K_p 値と PSC-833 併用時における K_p 値の比から 1 を引いた値が、内皮細胞の血管側細胞膜における BCRP の efflux クリアランスと、同細胞膜における passive diffusion による efflux クリアランスの比を示す。

Kinetics model に基づくと、上記の通り PSC-833 併用時と elacridar 併用時における K_p 値の比は BCRP 機能を反映するものである。実験によって求めた $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 値の比を Figure 12 に示す。P-gp 特異的基質である quinidine は、 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 値の比がともに 1 に近い値を示したことから、脳および CSF 移行に BCRP は関与していないことが示唆された。Dantrolene においては、PSC-833 併用による $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 値が変動しなかったため、第 III 章 第 2 節において elacridar 併用群と vehicle 群から求めた $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ 変動率と同程度の値を示した。Prazosin および imatinib において、elacridar と PSC-833 併用による $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 値の比が 1 より大きい値を示したことから、脳移行において BCRP が機能していることが示唆された。一方で、 $K_{p,uu,CSF}$ 値の比は 1 に近い値を示したことから、CSF 移行における見かけ上の BCRP の影響はほとんどないことが示唆された。

Figure 12 に示した prazosin および imatinib の elacridar 併用時における K_p 値と PSC-833 併用時における K_p 値の比は in vivo における BCRP 機能を示すが、これは第 III 章 第 3 節において kinetics model に基づいて解析した elacridar 併用時における K_p 値の変動率が示す BCRP 特異的基質における BCRP 機能と同様のものと考えられる。そこで、BCRP 特異的基質の elacridar による K_p 値の変動率と in vitro BCRP CFR の相関図に、PSC-833 および elacridar を使用して求めた P-gp/BCRP 両基質の K_p 値の比をプロットすることで、P-gp/BCRP 両基質においても in vitro と in vivo の BCRP 機能の関係を考察した。その結果、Figure 13 に示す通り、PSC-833 併用時と elacridar 併用時における prazosin

および imatinib の K_p 値の比と *in vitro* BCRP CFR のプロットは、BCRP 特異的基質における相関と概ね同じ範囲内に位置した。以上より、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する BCRP 機能においても BCRP 特異的基質と同様に *in vitro* BCRP CFR と相関し、その BCRP 機能は kinetics model で説明することができる可能性が示唆された。

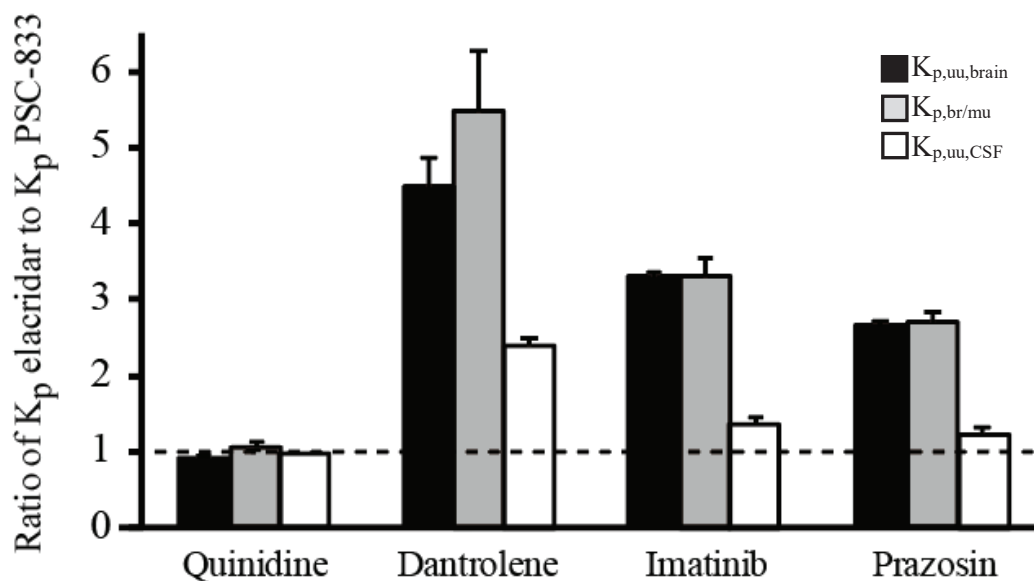


Figure 12. Estimation of the *in vivo* BCRP function for the P-gp/BCRP dual substrates from the effect of the co-administration of elacridar and PSC-833

The ratio of a $K_{p,uu,brain}$, $K_{p,br/mu}$ and $K_{p,uu,CSF}$ values with elacridar to those with PSC-833 are represented by closed bars and open bars, respectively. The dashed line represents unity. Each bar represents the mean \pm S.E.M of two or three animals.

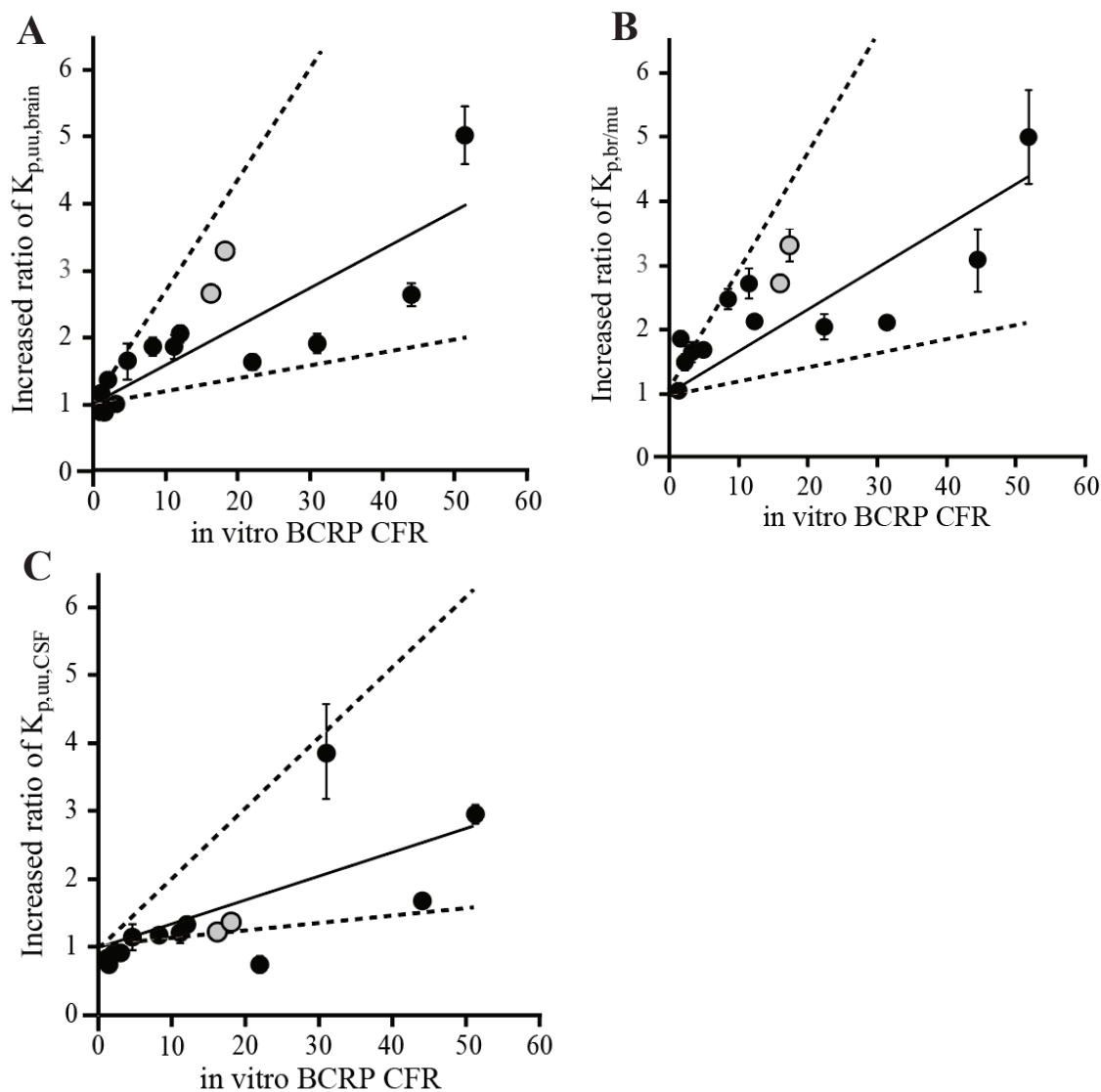


Figure 13. Comparison between P-gp/BCRP dual substrates and BCRP-specific substrates in correlation of in vitro BCRP CFR

The ratio of the $K_{p,uu,brain}$ (A), $K_{p,br/mu}$ (B) and $K_{p,uu,CSF}$ (C) values of the P-gp/BCRP dual substrates with elacridar or PSC-833 and BCRP-specific substrates with or without BCRP inhibition were plotted against CFR in BCRP-MDCK. The closed circles represent BCRP-specific substrates, and the gray circles represent prazosin and imatinib as P-gp/BCRP dual substrates. The dashed lines represent three-fold difference from the regression line. Each bar and symbol represent the mean \pm S.E.M of three animals.

第4節 小括

本章においては、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する BCRP 機能を評価した。

第 1 節において、本章で新たに評価化合物として用いる quinidine、prazosin および imatinib のタンパク結合率を第II章 第 1 節と同様に評価した。CSF 中非結合型分率の推定値はいずれの化合物も 1 近くであり CSF 中のタンパク結合は無視できると考えたため、CSF 中非結合型分率として 1 を使用した。

第 2 節において、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する P-gp と BCRP の機能を分離評価するため、P-gp 特異的基質として知られる quinidine を用いて P-gp 阻害剤である PSC-833 の影響を評価した。PSC-833 は、第III章における elacridar と同様に急速静脈内投与後、定速静脈内投与した。Quinidine の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は PSC-833 の投与量依存的に上昇し、 $K_{p,uu,CSF}$ の上昇は PSC-833 の中用量・高用量において飽和傾向を示した。高用量の PSC-833 投与時における quinidine の中枢移行性やその変動率は P-gp knockout ラットと比較して同程度であったことから^{33,51}、高用量の PSC-833 は P-gp を完全に阻害していることが示唆された。また、いずれの投与量の PSC-833 を投与した場合においても、dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は顕著な変化を示さなかったことから、高用量の PSC-833 は P-gp のみを特異的に阻害し、P-gp と BCRP の分離評価が可能であることが示唆された。

第 3 節において、PSC-833 と elacridar を用いて P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する BCRP 機能を評価した。また、P-gp 特異的基質である quinidine および BCRP 特異的基質である dantrolene を用いて、両阻害剤の効果を確認した。Quinidine の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ の変動率は PSC-833 と elacridar で同程度であった。一方で、dantrolene の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は PSC-833 の併用によって変動せず、elacridar の併用によって増加した。以上より、PSC-833 および elacridar を用いて、P-gp の影響を除いた上で BCRP の影響を評価可能であることが示唆された。

P-gp/BCRP 両基質である prazosin と imatinib の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ は、PSC-833 および elacridar の併用によって増加した。PSC-833 併用下においては、BCRP のみによって脳移行および CSF 移行が制限されていると考えられるため、kinetics model に基づいて考察すると、elacridar 併用時の K_p 値と PSC-833 併用時の K_p 値の比が BCRP 機能を表していると考えられる。Prazosin と imatinib の elacridar 併用時と PSC-833 併用時の $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 比は 1 より大きい値となったため、prazosin と imatinib の脳移行において BCRP は機能していることが示唆された。一方で、 $K_{p,uu,CSF}$ の比は 1 に近い値を示したため、prazosin と imatinib の CSF 移行において、BCRP は見かけ上ほとん

ど寄与していないことが示唆された。

Elacridar 併用時の K_p 値と PSC-833 併用時の K_p 値の比が BCRP 機能を表していることから、第III章 第2節において評価した BCRP 特異的基質の中枢移行に関与する BCRP 機能と同様の相関を示すと考えられた。Elacridar 併用による BCRP 特異的基質の K_p 値の変動率と *in vitro* BCRP CFR は直線性の相関を示したが、prazosin と imatinib の elacridar 併用時の K_p 値と PSC-833 併用時の K_p 値の比および *in vitro* BCRP CFR を BCRP 特異的基質において見られた相関上にプロットしたところ、prazosin と imatinib のプロットが BCRP 特異的基質で認められた相関の範囲内に位置した。このことから、P-gp/BCRP 両基質である prazosin と imatinib においても、BCRP 特異的基質と同様に、中枢移行に関与する BCRP 機能と *in vitro* BCRP CFR は相関関係にあり、その BCRP 機能は kinetics model によって説明できる可能性が示唆された。これは、P-gp knockout マウス、BCRP knockout マウスおよび P-gp/BCRP knockout マウスを用いて、P-gp 基質および BCRP 基質の脳移行に関与する P-gp、BCRP のそれぞれの寄与について kinetics model を用いて解析した先行研究の結果³⁸⁾と一致する。

以上より、本章においては P-gp/BCRP 両基質の脳移行および CSF 移行に関与する BCRP 機能を、PSC-833 および elacridar を用いて評価可能であることが示された。また、P-gp/BCRP 両基質の脳移行および CSF 移行に関与する BCRP 機能は、BCRP 特異的基質と同様に、BCRP 発現 MDCKII細胞を用いた *in vitro* 経細胞輸送実験の結果と相関することが示された。

結論

本研究において、薬物の中枢移行を制限する排出トランスポーターの1つである BCRP 機能の定量的な評価を行うことを目的とし、BCRP 特異的基質を用いて、ラットの脳および CSF 移行性を評価し、中枢移行に関与する BCRP 機能と *in vitro* 経細胞輸送実験における BCRP 機能を比較した。さらに P-gp/BCRP 両基質における BCRP 機能を定量的に解析し、BCRP 特異的基質を用いて得られた結果と比較することで、P-gp/BCRP 両基質における BCRP 機能を評価した。

第I章 *in silico* 物理化学的性質および *in vitro* トランスポーター基質性評価

評価化合物の物理化学的性質および *in vitro* における P-gp、BCRP の基質性を評価した。*In silico* による物理化学的性質予測の結果、今回用いた評価化合物がある程度の脂溶性を有することから、passive diffusion により BBB を透過し、*in vivo* において脳と血液間で化合物が平衡状態になると期待された。P-gp または BCRP を発現させた MDCKII細胞を用いて *in vitro* 経細胞輸送実験を行い、評価化合物の基質性を分類した。その結果、複数の化合物が P-gp によって輸送されない BCRP 特異的基質に分類された。

第II章 BCRP 特異的基質のラット中枢移行性評価

第I章において取得した BCRP 特異的基質を用いて、ラットにおける脳および CSF 移行性を評価した。脳および CSF 移行性の指標として各評価化合物の $K_{p,total,brain}$ 、 $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を算出した。これらの K_p 値は、*in vitro* BCRP CFR が増加するに従って低下する傾向にあった。さらに、BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,CSF}$ は $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ と比較して高い数値を示し、*in vitro* BCRP CFR が高い化合物において $K_{p,uu,CSF}$ と $K_{p,uu,brain}$ の乖離が大きくなる傾向が認められた。以上より、本章においては、BCRP 基質性が高いほど中枢移行性が低下する傾向が認められた。一方で、BCRP 特異的基質の脳移行性は CSF 移行性よりも低い傾向にあることが認められた。

第III章 BCRP 特異的基質の中枢移行における BCRP 機能評価

BCRP 特異的基質の中枢移行に対する BCRP 阻害の影響を評価することで、化合物の中枢移行における BCRP の機能を定量的に解析した。阻害剤として elacridar を併用した際の $K_{p,uu,brain}$ 、 $K_{p,br/mu}$ および $K_{p,uu,CSF}$ を評価したところ、elacridar 併用によるこれらの K_p

値の変動率は、in vitro BCRP CFR と直線性の相関関係にあることが示された。この結果は、第III章において採用した kinetics model による解析と一致しており、BCRP 特異的基質の脳移行性は kinetics model によって定量的に説明できることが示された。Elacridar 併用による BCRP 特異的基質の $K_{p,uu,CSF}$ 変動率は、 $K_{p,uu,brain}$ および $K_{p,br/mu}$ 変動率と比較して nebicapone を除く全化合物において低い傾向にあった。このことから、BCRP は基質の CSF 移行よりも脳移行を強く制限していることが示唆された。

第IV章 P-gp/BCRP 両基質の中枢移行における BCRP 機能評価

P-gp/BCRP 両基質の中枢移行に関与する in vivo における BCRP 機能を評価した。中枢移行性に関与する P-gp と BCRP の機能を分離評価するため、P-gp 阻害剤である PSC-833 と P-gp/BCRP 阻害剤である elacridar を用いた。P-gp 特異的基質として知られる quinidine および BCRP 特異的基質である dantrolene を用いた検討結果から、PSC-833 および elacridar を用いて、P-gp/BCRP 両基質の中枢移行性に関与する BCRP 機能を評価できることが示唆された。これらの阻害剤を用いて P-gp/BCRP 両基質である prazosin と imatinib の評価を行ったところ、脳移行に BCRP が関与しているが、CSF 移行に関しては見かけ上 BCRP の寄与が低いことが示唆された。PSC-833 および elacridar を用いて評価した prazosin および imatinib の脳および CSF 移行に関与する BCRP 機能と in vitro BCRP CFR の関係は、BCRP 特異的基質で見られた相関上に位置することから、P-gp/BCRP 両基質においても、BCRP 特異的基質と同様に、in vivo における BCRP 機能は in vitro BCRP CFR と相関し、その BCRP 機能が kinetics model によって説明できる可能性が示唆された。

以上、本研究は BCRP 基質の中枢移行に関与する in vivo における BCRP 機能を定量的に明らかにしたものであり、創薬研究において BCRP 基質となる医薬品候補化合物の中枢移行性を評価する上で有用な基礎的知見と考える。

謝辞

終わりに臨み、本研究に終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました恩師 高野 幹久教授をはじめ、湯元 良子 准教授、川見 昌史 助教に深甚なる謝意を表します。

本論文を作成するにあたり、ご指導をいただきました広島大学大学院医系科学研究科 古武 弥一郎 教授、森川 則文 教授、森岡 徳光 教授、横大路 智治 准教授、広島国際大学薬学部 小田 啓祐 講師に深く感謝申し上げます。

本研究の貴重な機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻を賜りました住友ファーマ株式会社前臨床研究ユニット ユニット長 宮脇 出 博士、薬物動態担当プロジェクトディレクター 渡邊 貴夫 博士、前臨床研究ユニット グループマネージャー 川口 裕子氏、研究企画推進部 只野 純 氏に深く感謝申し上げます。

共同研究者として、本研究に多大なるご協力をいただきました住友ファーマ株式会社前臨床研究ユニット 梅村 康士 氏に深く感謝申し上げます。

メディシナルケミストとして本研究にご協力いただいた住友ファーマ株式会社化学研究ユニット グループマネージャー 城 智也 博士、化学研究ユニット 柴田 一 博士に深く感謝申し上げます。

本研究の実施にあたりご協力、ご支援をいただきました住友ファーマ株式会社前臨床研究ユニット薬物動態第1グループの皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、研究を行うにあたって暖かく支えてくれた家族に心から感謝致します。

実験の部

【実験材料】

Dantrolene sodium salt hemiheptahydrate は和光純薬株式会社(大阪)から購入した。Daidzein は東京化成工業株式会社(東京) から購入した。Nebicapone は Alsachim 社 (Illkirch-Graffenstaden, France)から購入した。Prazosin hydrochloride は東京化成工業株式会社(東京) から購入した。Imatinib mesylate は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した。Quinidine は Sigma-Aldrich 社(St. Louis, USA) から購入した。Antipyrine は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した。DSP5、DSP6、DSP7、DSP8 は住友ファーマ株式会社(大阪)の化学研究ユニットにて合成された。DSP1、DSP2、DSP3、DSP4、DSP 9 は Enamine 社(Kyiv, Ukraine) にて合成された。Elacridar は Toronto Research Chemicals 社(Toronto, Canada)から購入した。PSC-833 は MedChemExpress 社(New jersey, USA) から購入した。Sulfaphenazole は Sigma-Aldrich 社(St. Louis, USA) から購入した。Bezafibrate は Sigma-Aldrich 社(St. Louis, USA) から購入した。MDR1 発現 MDCKII 細胞とそのコントロール MDCKII 細胞は Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, Netherlands)より入手した。BCRP 発現 MDCKII細胞とそのコントロール MDCKII細胞は Solvo Biotechnology (Budapest, Hungary) より入手した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

【物理化学的性質の予測】

ADMET Predictor 10.3 (Simulations Plus)を用いて評価化合物の acidic pKa、basic pKa、 $\log P$ 、 $\log D_{7.4}$ を予測した。

【in vitro 経細胞輸送実験】

1. 細胞透過実験

MDR1またはBCRP発現MDCKII細胞および対応するコントロールMDCKII細胞を 3.35×10^4 cells/insert (MDR1発現MDCKII細胞) または 6.36×10^4 cells/insert (BCRP発現MDCKII細胞)の密度で播種した。その後、CO₂インキュベーター内で37°C、5%CO₂の条件下において3-4日間培養し、細胞透過実験に用いた。

細胞透過実験を実施するにあたり、Hanks' balanced salt solution (HBSS) を用いて20分間プレインキュベーションを実施し、Trans epithelial electrical resistance (TEER)を測定することで単層膜の形成を確認した。その後、ドナー側に1 $\mu\text{mol/L}$ または10 $\mu\text{mol/L}$ の化合物を添加し、120分間インキュベーションを行った後に、ドナー側およびアクセプター側の評価化合物濃度をLC-MS/MSを用いて測定した。化合物のドナー側およびアクセプター側のサンプルを採取後、150 μM のlucifer yellowをドナー側

に添加し、アクセプター側のサンプルを採取後、蛍光プレートリーダー(PerkinElmer)により、lucifer yellow濃度を測定した(励起波長: 428 nm、蛍光波長: 531 nm)。

2. LC-MS/MS 測定試料の調製

ドナー側またはアクセプター側から採取したサンプル 50 μ L に対して 50%メタノールを 50 μ L を添加し、さらに IS として sulfaphenazole または bezafibrate を含むメタノール 250 μ L を添加した後に、遠心分離 (3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分)を行った。得られた上清をフィルター濾過し、濾液を移動相で希釈したのちに LC-MS/MS で測定した。

3. 評価化合物濃度測定のための LC-MS/MS 条件

● LC 条件

カラム: Cadenza CD-C18 3 μ m, 2.0 mm x 50 mm

移動相

移動相 A: 0.1%ギ酸水

移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	3	3.5	3.51	6
移動相 A (%)	95	10	10	95	95
移動相 B (%)	5	90	90	5	5

流速: 0.4 mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

● MS/MS 条件

イオン化法: Electrospray ionization

イオン検出モード: Multiple reaction monitoring

モニターイオンの Q1、Q3 における m/z を Table 10 に示す。

4. 膜透過係数、efflux ratio、CFR の算出

Apical 側から basolateral 側への輸送(A to B)および basolateral 側から apical 側への経細胞輸送(B to A)の輸送における膜透過係数(P_{app})を以下の式より算出した。

$$P_{app} = \frac{dX}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

ここで、 dX/dt は時間当たりの化合物量変化、すなわち化合物の輸送速度を示す。A はメンブレンインサートの表面積を、 C_0 はドナーの初期濃度を示す。

また、B to A の P_{app} を A to B の P_{app} で補正した *efflux ratio* を以下の式より算出した。

$$Efflux\ ratio = \frac{P_{app,B-to-A}}{P_{app,A-to-B}}$$

MDR1 または BCRP 発現 MDCKII細胞の *efflux ratio* をコントロール MDCKII細胞の *efflux ratio* で補正した *corrected flux ratio (CFR)* を以下の式より算出した。

$$CFR = \frac{Efflux\ ratio_{MDR1\ or\ BCRP-MDCK}}{Efflux\ ratio_{control-MDCK}}$$

ここで、 $efflux\ ratio_{MDR1\ or\ BCRP-MDCK}$ は MDR1 または BCRP 発現 MDCKII細胞の *efflux ratio* を、 $efflux\ ratio_{control-MDCK}$ はコントロール MDCKII細胞の *efflux ratio* を示す。

Table 10. MRM transitions for test compounds

Compound	Q1	Q3
Dantrolene (negative)	313.0	228.0
Daidzein	255.1	199.0
Nebicapone (negative)	272.0	153.0
Prazosin	384.2	247.0
Imatinib	494.3	394.0
Quinidine	325.1	172.1
Antipyrine	189.0	104.0
DSP1	285.1	215.1
DSP2	329.0	215.1
DSP3 (negative)	379.0	171.0
DSP4	253.2	159.0
DSP5	440.2	420.1
DSP6	392.1	324.1
DSP7	406.1	324.1
DSP8	389.2	242.2
DSP9	262.2	162.0
Bezafibrate	362.0	138.9
Bezafibrate (negative)	360.0	274.1
Sulfaphenazole	315.0	158.0
Sulfaphenazole (negative)	313.0	156.0

【非結合型分率の測定】

1. 平衡透析法

平衡透析法は 96-well Equilibrium DIALYZER (Harvard Apparatus)または Multi-Equilibrium Dialyzer System (Harvard Apparatus)を用いて実施した。Nebicapone、DSP3、DSP5、DSP6、DSP7、DSP8 のラット血清中タンパク結合率は、5倍および20倍希釈したラット血清(住化テクノサービス株式会社)における結合率から算出した。上記以外の化合物のラット血清中タンパク結合率は、希釈していないラット血清を用いて評価した。ラット脳タンパク結合率は、ラット脳(住化テクノサービス株式会社)を4倍量のPBSと共にホモジナイズしたラット脳ホモジネートと、ラット脳ホモジネートを5倍希釈した脳ホモジネートにおけるタンパク結合率から算出した。

生体試料に 1 $\mu\text{mol/L}$ または 10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度になるよう評価化合物を添加した。平衡透析デバイスに、評価化合物を含む生体試料と PBS を添加し、37°C条件下にて攪拌しながらインキュベーションした(96-well Equilibrium DIALYZER: 22 時間, Multi-Equilibrium Dialyzer System: 1 時間)。その後、ドナー側、アクセプター側の試料を採取し、LC-MS/MS を用いて測定した。

2. LC-MS/MS 測定試料の調製

ドナー側から採取したサンプル 10 μL に対して PBS を 40 μL を添加し、さらに IS として sulfaphenazole または bezafibrate を含むメタノール 300 μL を添加した。アクセプター側から採取したサンプル 40 μL に対して、blank matrix を 10 μL 添加し、さらに IS として sulfaphenazole または bezafibrate を含むメタノール 300 μL を添加した。これらのサンプルに対して遠心分離 (3,000 rpm、4°C、10 分)を行い、得られた上清をフィルター濾過し、濾液を移動相で希釈したのちに LC-MS/MS で測定した。

3. 評価化合物濃度測定の LC-MS/MS 条件

● LC 条件 1

カラム: Cadenza CD-C18 3 μm , 2.0 mm x 50 mm

移動相

移動相 A: 0.1%ギ酸水

移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	3	3.5	3.51	6
移動相 A (%)	95	10	10	95	95
移動相 B (%)	5	90	90	5	5

流速: 0.4 mL/min

カラム温度: 40°C

● LC 条件 2

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II 3 μm, 2.0 mm x 75 mm
Kinetex Biphenyl 100A 2.6 μm, 2.1 mm I.D. x 50 mm

移動相

移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウムまたは 0.1%ギ酸水

移動相 B: アセトニトリルまたは 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	0.5	6	8	8.01	9.5
移動相 A (%)	95	95	5	5	95	95
移動相 B (%)	5	5	95	95	5	5

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

● MS/MS 条件

イオン化法: Electrospray ionization

イオン検出モード: Multiple reaction monitoring

モニターイオンの Q1、Q3 における m/z を Table 10 に示す。

4. CSF 中タンパク結合率の推定

ラットにおける CSF 中タンパク結合率は、ラット血清中タンパク結合率より推定した。CSF 液中アルブミン濃度は血漿中アルブミン濃度の 0.3% であることから³¹⁾、CSF 中非結合型分率($f_{u,c}$)はラット血清中非結合型分率($f_{u,s}$)より以下の式を用いて推定した³²⁾。

$$f_{u,c} = \frac{1}{1 + 0.003 \times \left(\frac{1}{f_{u,s}} - 1 \right)}$$

【動物実験】

動物実験には 7-8 週齢の Crl:CD(SD) 系雄性ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を用いた。動物の飼育室は温度・湿度を一定に保ち、12 時間の明暗サイクルを設定した。動物は、固形飼料(CE-2、日本クレア株式会社)と滅菌水を自由摂取させ、検疫・馴化したのちに 1 群 2~3 匹で実験に使用した。

【中枢移行性評価試験の投与量設定】

1. 投与液の調製

評価化合物は、生理食塩水または 0.02 N HCl, polyethylene glycol (PEG)-400, (50/50)で構成される溶媒に溶解した。

2. PK 試験および LC-MS/MS 測定試料の調製

評価化合物をラットに急速静脈内投与し、5, 15, 30 分および 1, 2, 4, 6, 24 時間後に採血を行い、速やかに血漿に分離した。20 μ L の血漿に対してメタノールを 20 μ L を添加し、さらに IS として bezafibrate を含むメタノール 200 μ L を添加した。これらのサンプルに対して遠心分離 (3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分)を行い、得られた上清をフィルター濾過し、濾液を移動相で希釈したのちに LC-MS/MS で測定した。

3. 評価化合物濃度測定のための LC-MS/MS 条件

● LC 条件 1

カラム: Cadenza CD-C18 3 μ m, 2.0 mm x 50 mm

移動相

移動相 A: 0.1%ギ酸水

移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	3	3.5	3.51	6
移動相 A (%)	95	10	10	95	95
移動相 B (%)	5	90	90	5	5

流速: 0.4 mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

● LC 条件 2

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II 3 μ m, 2.0 mm x 75 mm

Kinetex Biphenyl 100A 2.6 μ m, 2.1 mm I.D. x 50 mm

移動相

移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウムまたは 0.1%ギ酸水

移動相 B: アセトニトリルまたは 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	0.5	6	8	8.01	9.5
移動相 A (%)	95	95	5	5	95	95
移動相 B (%)	5	5	95	95	5	5

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

- MS/MS 条件

イオン化法: Electrospray ionization

イオン検出モード: Multiple reaction monitoring

モニターイオンの Q1、Q3 における m/z を Table 10 および Table 11 に示す。

Table 11. MRM transitions for transporter inhibitors

Compound	Q1	Q3
Elacridar	564.4	252.2
PSC-833	608.2	100.0

4. PK 解析および投与量設定

得られたラット PK 結果から PKplus 2.0 (Simulations Plus)を用いて、1-コンパートメントモデル解析または 2-コンパートメントモデル解析を行い、各評価化合物および阻害剤の投与量を設定した。

【中枢移行性評価試験】

1. 投与液の調製

評価化合物は、0.03 N HCl、polyethylene glycol (PEG)-400、PEG-60 hydrogenated castor oil、PEG-40 stearate、N,N-dimethylformamide (50/31.5/6.75/6.75/5)で構成される溶媒に溶解した。

2. PK 試験および LC-MS/MS 測定試料の調製

Figure 5 に示す手順で排出トランスポーター阻害剤および評価化合物をラットに投与した。阻害剤は急速静脈内投与後に定速静脈内投与を行い、サンプル回収時まで継続した。阻害剤非併用群に対しては、阻害剤の媒体を投与した。評価化合物の投与は阻害剤の投与開始から 1 時間後に急速静脈内投与を行った後に 3 時間定速静脈内を行い、投与終了後に CSF、血漿、大腿筋、脳を採取した。大腿筋および脳は、5 倍量のホモジネートを調製し、測定試料とした。20 µL の測定試料に対してメタノールを 20 µL を添加し、さらに IS として bezafibrate を含むメタノール 200 µL を添加した。これらのサンプルに対して遠心分離 (3,000 rpm、4°C、10 分)を行い、得られた上清をフィルター濾過し、濾液を移動相で希釈したのちに LC-MS/MS で測定した。

3. 評価化合物濃度測定のための LC-MS/MS 条件

- LC 条件

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II 3 μm, 2.0 mm x 75 mm
Kinetex Biphenyl 100A 2.6 μm, 2.1 mm I.D. x 50 mm

移動相

移動相 A: 10 mM 酢酸アンモニウムまたは 0.1%ギ酸水

移動相 B: アセトニトリルまたは 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント:

時間 (分)	0	0.5	6	8	8.01	9.5
移動相 A (%)	95	95	5	5	95	95
移動相 B (%)	5	5	95	95	5	5

流速: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

● MS/MS 条件

イオン化法: Electrospray ionization

イオン検出モード: Multiple reaction monitoring

モニターイオンの Q1、Q3 における m/z を Table 10 に示す。

4. K_p 値の算出

以下の式に従い、各 K_p 値を算出した。

$$K_{p,total,brain} = \frac{C_b}{C_p}$$

$$K_{p,br/mu} = \frac{C_b}{C_m}$$

$$K_{p,uu,brain} = \frac{C_b \times f_{u,b}}{C_p \times f_{u,s}}$$

$$K_{p,uu,CSF} = \frac{C_c \times f_{u,c}}{C_p \times f_{u,s}}$$

ここで、 C_b は脳内総薬物濃度、 C_p は血漿中総薬物濃度、 C_m は大腿筋中総薬物濃度、 C_c は CSF 中総薬物濃度、 $f_{u,b}$ は脳内非結合型分率、 $f_{u,s}$ は血清中非結合型分率、 $f_{u,c}$ は CSF 中非結合型分率を示す。

論文目録

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

Yuki Katagiri, Hiroko Kawaguchi, Koji Umemura, Jun Tadano, Izuru Miyawaki, Mikihisa Takano. Investigation of the role and quantitative impact of breast cancer resistance protein on drug distribution into brain and CSF in rats. *Drug Metab Pharmacokinet* 2022; 42: 100430.

参考文献

1. 中尾 朗. アンメット・メディカル・ニーズに対する医薬品の開発・承認状況－2022年の動向－. 政策研ニュース 2022; 66: 53-62.
2. World Health Organization. GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2019 SUMMARY TABLES. 2020
3. Gribkoff VK, Kaczmarek LK. The need for new approaches in CNS drug discovery: Why drugs have failed, and what can be done to improve outcomes. *Neuropharmacology* 2017; 120: 11-19.
4. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005; 2: 3-14.
5. Chishty M, Reichel A, Siva J, Abbott NJ, Begley DJ. Affinity for the P-glycoprotein efflux pump at the blood-brain barrier may explain the lack of CNS side-effects of modern antihistamines. *J Drug Target* 2001; 9: 223-8.
6. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol* 2016; 133: 39-59.
7. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 2012; 9: 23.
8. Luissint AC, Federici C, Guillonneau F, Chrétien F, Camoin L, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Guanine nucleotide-binding protein Gai2: a new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 860-73.
9. Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is

selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* 1990; 265: 18035-40.

10. Halestrap AP. Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* 2013; 3: 1611-43.
11. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12079-84.
12. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11: 1156-66.
13. Li Y, Yuan H, Yang K, Xu W, Tang W, Li X. The structure and functions of P-glycoprotein. *Curr Med Chem* 2010; 17: 786-800.
14. Linnet K, Ejning TB. A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18: 157-69.
15. Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 36: 179-94.
16. Nicolai J, Chapy H, Gillent E, Saunders K, Ungell AL, Nicolas JM, Chanteux H. Impact of In Vitro Passive Permeability in a P-gp-transfected LLC-PK1 Model on the Prediction of the Rat and Human Unbound Brain-to-Plasma Concentration Ratio. *Pharm Res* 2020; 37: 175.
17. Uchida Y, Wakayama K, Ohtsuki S, Chiba M, Ohe T, Ishii Y, Terasaki T. 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: 578-88.

18. Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 720-5.
19. Jani M, Ambrus C, Magnan R, Jakab KT, Beéry E, Zolnerciks JK, Krajcsi P. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch Toxicol* 2014; 88:1205-48.
20. Dallas S, Salphati L, Gomez-Zepeda D, Wanek T, Chen L, Chu X, Kunta J, Mezler M, Menet MC, Chasseigneaux S, Declèves X, Langer O, Pierre E, DiLoreto K, Hoft C, Laplanche L, Pang J, Pereira T, Andonian C, Simic D, Rode A, Yabut J, Zhang X, Scheer N. Generation and Characterization of a Breast Cancer Resistance Protein Humanized Mouse Model. *Mol Pharmacol* 2016; 89: 492-504.
21. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 2011; 117: 333-45.
22. Vlaming MLH, Lagas JS, Schinkel AH. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 14-25.
23. Zhou L, Schmidt K, Nelson FR, Zelesky V, Troutman MD, Feng B. 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 Metab Dispos* 2009; 37: 946-55.
24. Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, Schinkel AH, Sugiyama Y. Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 995-1002.

25. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3-26.
26. Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem Neurosci* 2010; 1: 435-49.
27. Food and Drug Administration. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. 2020.
28. Bicker J, Fortuna A, Alves G, Soares-da-Silva P, Falcão A. Elucidation of the Impact of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on the Brain Distribution of Catechol- O-Methyltransferase Inhibitors. *Drug Metab Dispos* 2017; 45: 1282-91.
29. Li J, Volpe DA, Wang Y, Zhang W, Bode C, Owen A, Hidalgo IJ. Use of transporter knockdown Caco-2 cells to investigate the in vitro efflux of statin drugs. *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 1196-202.
30. Kodaira H, Kusuhara H, Fujita T, Ushiki J, Fuse F, 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: 935-44.
31. Habgood MD, Sedgwick JE, Dziegielewska KM, Saunders NR. A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *J Physiol* 1992; 456: 181-92.
32. Fridén M, Ljungqvist H, Middleton B, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M. Improved measurement of drug exposure in the brain using drug-specific correction

for residual blood. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 150-61.

33. Nagaya Y, Nozaki Y, Takenaka O, Watari R, Kusano K, Yoshimura T, Kusuhara H. Investigation of utility of cerebrospinal fluid drug concentration as a surrogate for interstitial fluid concentration using microdialysis coupled with cisternal cerebrospinal fluid sampling in wild-type and Mdr1a(-/-) rats. *Drug Metab Pharmacokinet* 2016; 31: 57-66.
34. Bohnert T, Gan LS. Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci* 2013; 102: 2953-94.
35. Cui Y, Lotz R, Rapp H, Klinder K, Himstedt A, Sauer A. Muscle to Brain Partitioning as Measure of Transporter-Mediated Efflux at the Rat Blood-Brain Barrier and Its Implementation into Compound Optimization in Drug Discovery. *Pharmaceutics* 2019; 11: 595.
36. Kallem R, Kulkarni CP, Patel D, Thakur M, Sinz M, Singh SP, Mahammad SS, Mandlekar S. A simplified protocol employing elacridar in rodents: a screening model in drug discovery to assess P-gp mediated efflux at the blood brain barrier. *Drug Metab Lett* 2012; 6: 134-44.
37. Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y. Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res* 2001; 18: 1660-8.
38. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 333: 788-96.
39. Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* 1999; 59: 4237-41.

40. Feng B, West M, Patel NC, Wager T, Hou X, Johnson J, Tremaine L, Liras J. Validation of Human MDR1-MDCK and BCRP-MDCK Cell Lines to Improve the Prediction of Brain Penetration. *J Pharm Sci* 2019; 108: 2476-83.
41. Uchida Y. Quantitative Proteomics-Based Blood–Brain Barrier Study. *Biol Pharm Bull* 2021; 44: 465-473.
42. Feng MR. Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro and in vivo. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 647-57.
43. Tang SC, Lagas JS, Lankheet NAG, Poller B, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int J Cancer* 2012; 130: 223-33.
44. Fuchs H, Kishimoto W, Gansser D, Tanswell P, Ishiguro N. Brain penetration of WEB 2086 (Apafant) and dantrolene in Mdr1a (P-glycoprotein) and Bcrp knockout rats. *Drug Metab Dispos* 2014; 42: 1761-5.
45. Uchida Y, Zhang Z, Tachikawa M, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of rat blood-cerebrospinal fluid barrier transporters: comparison with a human specimen. *J Neurochem* 2015; 134: 1104-15.
46. Zhuang Y, Fraga CH, Hubbard KE, Hagedorn N, Panetta JC, Waters CM, Stewart CF. Topotecan central nervous system penetration is altered by a tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 2006; 66: 11305-13.
47. Shen J, Carcaboso AM, Hubbard KE, Tagen M, Wynn HG, Panetta JC, Waters CM, Elmeliegy MA, Stewart CF. Compartment-specific roles of ATP-binding cassette transporters define differential topotecan distribution in brain parenchyma and cerebrospinal fluid. *Cancer Res* 2009; 69: 5885-92.

48. Uchida Y, Goto R, Takeuchi H, Łuczak M, Usui T, Tachikawa M, Terasaki T. Abundant Expression of OCT2, MATE1, OAT1, OAT3, PEPT2, BCRP, MDR1, and xCT Transporters in Blood-Arachnoid Barrier of Pig and Polarized Localizations at CSF- and Blood-Facing Plasma Membranes. *Drug Metab Dispos* 2020; 48: 135-145.
49. Zhang Z, Uchida Y, Hirano S, Ando D, Kubo Y, Auriola S, Akanuma S, Hosoya K, Urtti A, Terasaki T, Tachikawa M. Inner Blood-Retinal Barrier Dominantly Expresses Breast Cancer Resistance Protein: Comparative Quantitative Targeted Absolute Proteomics Study of CNS Barriers in Pig. *Mol Pharm* 2017; 14: 3729-38.
50. Poller B, Wagenaar E, Tang SC, Schinkel AH. Double-transduced MDCKII cells to study human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) interplay in drug transport across the blood-brain barrier. *Mol Pharm* 2011; 8: 571-82.
51. Liu X, Cheong J, Ding X, Deshmukh G. Use of cassette dosing approach to examine the effects of P-glycoprotein on the brain and cerebrospinal fluid concentrations in wild-type and P-glycoprotein knockout rats. *Drug Metab Dispos* 2014; 42: 482-91.