

## 吸収性改善を目的としたエステル誘導体の体内動態と加水分解

今井 輝子

## Hydrolysis by Carboxylesterase and Disposition of Prodrug with Ester Moiety

Teruko IMAI

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,  
5-1 Oe-honmachi, Kumamoto City 862-0973, Japan

(Received December 27, 2006)

Prodrug is a useful approach for improving the bioavailability of therapeutic agents through increased passive transport. Carboxylesterases (CESs, EC.3.1.1.1.) that show ubiquitous expression profiles play an important role in the biotransformation of ester-containing prodrugs into their therapeutically active forms in the body. High levels of CESs are found in the liver, small intestine and lungs where prodrugs are firstly hydrolyzed before entering the systemic circulation. Rat intestine single-pass perfusion experiments have shown that CES is involved in the intestinal first-pass hydrolysis. Extensive pulmonary first-pass hydrolysis has been observed in accordance to the substrate specificity of CES1 isozyme. Hydrolysis in the human liver and lungs is mainly catalyzed by hCE1 (a human CES1 family isozyme), whereas that in the small intestine is predominantly mediated by hCE2 (a human CES2 family isozyme). hCE2 preferentially hydrolyzes substrates with a small acyl moiety such as CPT-11, due to conformational steric hindrance in its active site. In contrast, hCE1 is able to hydrolyze a variety of substrates due to spacious and flexible substrate binding region in its active site. In addition, hCE1 has been found to catalyze transesterification. Caco-2 cells mainly expresses CES1 isozyme but not CES2 isozyme. Because of the differences in substrate specificity between CES1 and CES2 enzymes, Caco-2 cell monolayer is not suitable for predicting intestinal absorption of prodrugs. These findings indicate that identification of substrate specificity of CES isozymes and development of an *in vitro* experimental method are essential to support rational design of prodrug.

**Key words**—prodrug; carboxylesterase; hydrolysis; fast-pass effect; Caco-2 cell

## 1. はじめに

薬物の粘膜吸収性を改善するためには、大きく分けて2つのアプローチがある。1つは薬物の化学構造そのものを変える方法、もう1つは化学構造を変えずに、製剤的に工夫する方法である。前者の方法の中に、薬物自体の構造を保存したまま、水酸基などの反応性置換基にアルキル基やアシル基などの小さな修飾基を結合させるプロドラッグ化がある。プロドラッグの概念は1958年にAlbertによって提唱され、その後、Drug Delivery System (DDS) の考えが出てから「医薬品としての有用性を増大するための分子修飾体」として、特に1970年頃から注目

された。これまでに、膜透過促進を目的とした経口投与剤あるいは経皮投与剤が多数開発されている。

プロドラッグは親薬物の体内動態が既に明らかにされているものを分子修飾するため、理論的には戦略的なデザインが可能である。しかしながら、DDS的戦略の基に有能な置換基を探索し、その置換基を目的化合物に結合させても、思い通りの効果が上げられないことが多い。その原因の1つは、プロドラッグから親薬物への生体内変換を制御する酵素についての情報が少なく、プロドラッグ自身の体内動態の予測が難しいことにある。さらに、小動物で確認されたプロドラッグの効果が、他の動物種やヒトにおいて得られないこともある。筆者らは数年前から、プロドラッグの効率的なデザインを目指して、生体内変換に係わる酵素の臓器分布、種差及び基質特異性について検討してきた。本稿では、プロドラッグの生体内変換に関与する酵素、特にカルボ

熊本大学大学院医学薬学研究部 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)

e-mail: iteruko@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

キシルエステラーゼについて紹介し、経口投与後のプロドラッグの体内動態について説明する。また、ヒト小腸吸収モデルとして繁用されている Caco-2 細胞によるプロドラッグ吸収性評価の危険性について紹介する。

## 2. 理想的なプロドラッグの体内動態

生体に投与されたプロドラッグの生体内変換が親薬物の体内動態にどのような影響を与えるかについては、Fig. 1 の血中濃度プロファイルで説明できる。プロドラッグの代謝には、親薬物へ変換する場合と、代謝物 A を経て代謝物 B に代謝される経路が考えられる。Figure 1(A) はプロドラッグを投与後の活性薬物（親薬物）の十分な量を生体内で維持する理想的なプロドラッグである。この場合、プロドラッグから親薬物への生成速度  $k_1$  は代謝物 A の生成速度  $k_2$  及び親薬物の代謝速度  $k_3$  よりも著しく速くなければならない。一方、プロドラッグ化により肝抽出率が高まり、プロドラッグ自身の代謝が増大した場合、すなわち、 $k_2$  が  $k_1$  を上回る場合には親薬物濃度は低下し、代謝物濃度が増大する (Fig. 1(B))。また、 $k_3$  が  $k_1$  よりも大きい場合には、Fig. 1(C) のように、代謝物 B が増える。薬物によっては、プロドラッグが親薬物に変換したのち、さらに初回代謝を受けることがあるが、Fig. 1(C) はその

例である。また、徐放化を目指してプロドラッグから親薬物への変換を遅くした場合には、Fig. 1(B) あるいは (C) の状態を生じる可能性がある。

## 3. プロドラッグの生体内変換に関する酵素

プロドラッグは Fig. 1(A) に示すように、速い速度で生体内変換する必要がある。そのため、生体に豊富に存在する水解酵素 (hydrolase) の活性を利用することが多い。したがって、薬物の修飾部位はカルボキシル基、水酸基、アミノ基、スルフヒドリル基などに限定され、薬理効果に関与する官能基を修飾するのが常法である。プロドラッグの生体内変換にはエステル結合やアミド結合を広く加水分解するカルボキシルエステラーゼ (CES) が関与することが多い。

CES は肝臓を始めとして小腸上皮細胞、腎臓、肺、鼻粘膜、脳、脂肪組織、筋肉、血漿など生体を構成する多くの臓器に発現しており、生体内の脂質代謝にも重要な役割を果たすと考えられている。<sup>1)</sup> 中でも肝臓において最も高い活性が認められるが、小腸上皮細胞、肺、腎臓や血漿における活性も比較的高いことから、CES の基質特異性がプロドラッグの体内動態に大きく影響を与える。

CES はヒト CES1 酵素、hCE1 (別称 CES1A1, HU1) のアミノ酸配列に基づく相同性から、大き

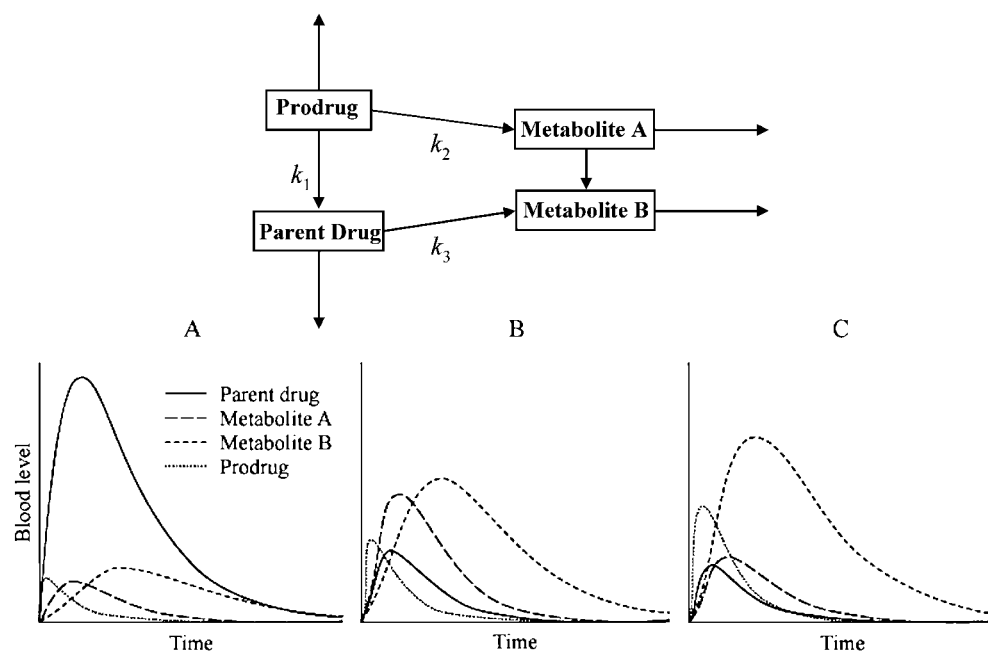


Fig. 1. Simulation Curve of Blood Concentration after Oral Administration of Prodrug

A:  $k_1 \gg k_2, k_1 \gg k_3$  (Ideal prodrug), B:  $k_2 > k_1, k_1 > k_3$ , C:  $k_1 > k_2, k_3 > k_1$ .

く5つのグループに分けられている。その系統樹を Fig. 2 に示す。<sup>2)</sup> CES4 ファミリーは, *cauxin* と呼ばれる蛋白質で, ネコ尿中に見い出された分泌型の CES であり,<sup>3)</sup> 最近, 数種の動物種の腎臓における発現が認められている。これらのファミリーの中で, プロドラッグの生体内変換に係わるのは主に CES1 と CES2 ファミリーである。<sup>4,5)</sup> CES1 と CES2 ファミリーの分子質量及び発現臓器を Table 1 に示す。CES1 酵素の中で CES1C ファミリーは血漿中に存在する分泌型の CES である。このファミリーはマウスやラットのげっ歯類に高発現するが, ヒトやサルには存在しないため, ヒトやサルの血漿エステラーゼ活性は極めて低い。<sup>6)</sup> また, CES1 酵素は広く多くの臓器に分布するのに対して, CES2 酵素は腎臓, 小腸, 肝臓などの限られた臓器にしか発現しないという特徴がある。<sup>4)</sup>

CES1 と CES2 ファミリー酵素はいずれも C 末端の HXEL 配列が小胞体膜の KDEL 受容体に結合して, 小胞体内腔側にぶら下がった状態で存在する。<sup>7)</sup> そのため, プロドラッグは細胞に取り込まれたのち, 小胞体内腔側で加水分解されることになる。CES は Ser, Glu, His の3種のアミノ酸から構成される触媒トライアドを形成して, 加水分解を触媒する。活性中心近傍には遷移状態のエステルを安定

化するオキシアニオンホールも存在する。<sup>1)</sup> CES の加水分解は Fig. 3 に示すように, 活性中心の Ser 残基に基質のアシル基が結合すると同時にアルコール基が脱離する第1ステップと, アシル-酵素中間体に H<sub>2</sub>O が攻撃してアシル基が脱離し, 酵素が元の状態に戻る第2ステップを経て終了する。この加水分解に加えて, 活性中心近傍にアルコールが存在すると, H<sub>2</sub>O の代わりにアルコールがアシル-酵素中間体を攻撃して, エステル体を生成する。このエステル形成触媒能は CES2 に比べて, CES1 で高く, 特に, 脂溶性のアルコールとのエステル形成反応を触媒し易いことから, 第1ステップで生成したアル

Table 1. Classification of Expressed CES in Mammal

Isozyme	Molecular weight	Expressed organ
CES1A	58000—62000 (trimer/monomer)	Liver, brain, lung, kidney, macrophage
CES1B	58000—64000 (monomer)	Liver, kidney
CES1C	70000—80000 (trimer/monomer)	Plasma (secreted type)
CES2	58000—60000 (monomer)	Intestine, kidney, liver

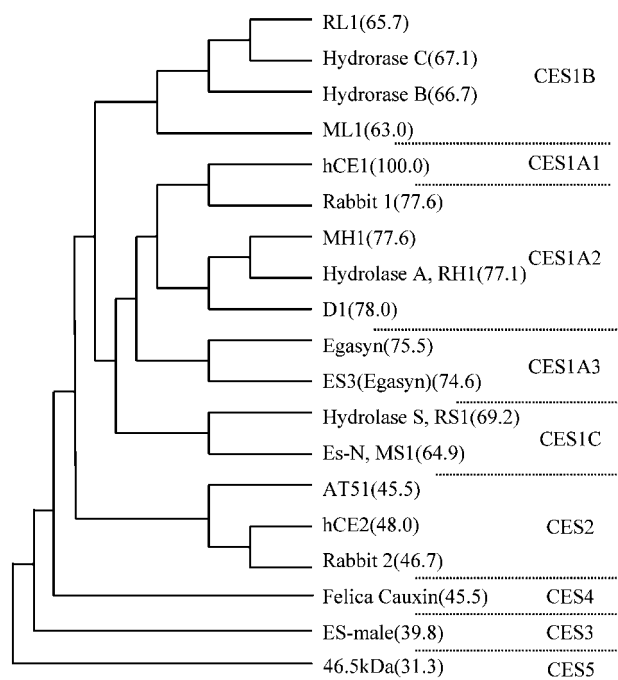


Fig. 2. Phylogenetic Tree of the CES Superfamily

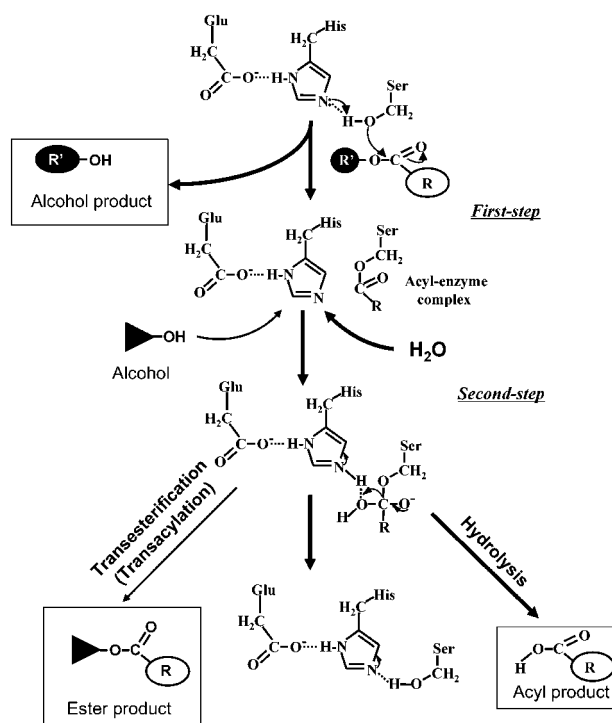


Fig. 3. The Two-step Hydrolysis of CES

コールが再度、アシル-酵素中間体を攻撃する可能性があり、CES1 酵素の基質特異性を複雑にしている。<sup>8)</sup>

#### 4. CES1 酵素と CES2 酵素の基質特異性の相違

CES1 と CES2 ファミリー酵素の基質特異性の相違については、ヒトアイソザイムである hCE1 と hCE2 でよく検討されている。Figure 4 に示すように、hCE1 の基質には、Methylphenidate, Temocapril, Cocaine (methyl ester), Flurbiprofen hydroxyethyl ester などアルコール基に比べてアシル基が嵩高い構造のことが多い。ACE 阻害薬の Imidapril, Delapril, Quinapril など hCE1 に特異的な基質である。<sup>13)</sup> これに対し、hCE2 に特異性の高い基質は、CPT-11, Cocaine (benzoyl ester) のようにアルコール置換基に比べてアシル基が小さい基質であり、hCE2 はアシル基が嵩高い化合物を加水分解し難い特徴がある。<sup>9-14)</sup> これまでに CES の X-線構造解析に関しては、CES1 酵素の hCE1<sup>15)</sup> とウサギ肝臓 CES (Rabbit 1)<sup>16)</sup> で解析されている。X-線解析の結果から、CES1 酵素の活性中心は Rigid site と Flexible site から構成され、活性中心が広いために、さまざまな構造の基質を加水分解すると考えられている。CES2 酵素の構造解析はなされていないが、アミノ酸配列から考えると、Flexible site を構

成するループの 1 つが欠損しており、CES1 酵素に比べると、活性中心の Flexibility が劣るものと考えられる。上述したように、CES2 酵素である hCE2 が嵩高いアシル基を持つ化合物を加水分解しないのは、活性中心の立体的な障害のために、加水分解の第 1 ステップであるアシル基と CES セリン残基との結合が妨げられ、限られた大きさのアシル基しか反応できないのではないかと考えられている。<sup>8)</sup>

ところで、経口投与後のプロドラッグの体内動態を理解するためには、小腸と肝臓での加水分解能を把握する必要がある。臓器特異的な加水分解には、CES1 と CES2 の臓器分布が関連している。hCE1 と hCE2 の両方の基質になり得る R-Valeryl-propranolol を用いて、ヒト肝臓及び小腸マイクロソームの加水分解に対する化学的阻害及び抗体阻害実験を行った。<sup>8)</sup> その結果、肝臓マイクロソームにおける加水分解の 90% 以上を CES が触媒し、その内の 5% は hCE2、95% は hCE1 が触媒することが明らかにされた。また、小腸マイクロソームの加水分解活性に関しては 95% が CES 活性で説明でき、その活性のすべてを hCE2 が担っている。したがって、ヒト小腸ではアシル基の嵩高い化合物はほとんど加水分解されないのに対し、ヒト肝臓はアシル基の嵩高い化合物を優先的に加水分解し、小腸に比べて幅広い基

Substrate	hCE1 kcat/Km (mM/min)	hCE2 kcat/Km (mM/min)	Reference
Cocaine	0.5	0	4
Methylphenidate	<i>l</i> -form: 7.7 <i>d</i> -form: 2.1	0	11
Temocapril	370	75	13
Flurbiprofen hydroxyethyl ester	<i>R</i> -form: 42.5 <i>S</i> -form: 7.1	0.22 0.54	8
Cocaine	0.5	18.4	9,10
CPT-11	0.73	47	12
Heroin	69.0	314	10
<i>p</i> -Nitrophenylacetate	10	60	14

Fig. 4. Structure-activity of Substrate with hCE1 and hCE2

質認識特性を示すことが明らかにされている。<sup>8)</sup>

### 5. 小腸粘膜におけるプロドラッグから親薬物への変換

経口投与された薬物はまず、小腸を通過し、門脈を経て肝臓に取り込まれる。小腸は経口投与されたすべての薬物分子がかならず通過しなくてはならないため、小腸における初回代謝はプロドラッグの生体内変換に大きく寄与する。Figure 5 に Isovaleryl-propranolol (Isovaleryl-PL) を用いて、ラット小腸 *in situ* single pass 還流実験を行った結果を示す。<sup>17)</sup> Isovaleryl-PL はラット小腸を1回通過する際に、99%以上が加水分解されており、小腸エステラーゼ活性が非常に高いことが分かる。興味深いことに、小腸で生成した Propranolol (PL) は血液中には14%しか吸収されず、86%は小腸管腔に分泌された。一方、修飾基の Isovaleric acid は小腸管腔側よりも、血管側に約3倍移行している。この移行性の相違は、PL が弱塩基性薬物、Isovaleric acid が弱酸性化合物であることに起因する。すなわち、小腸粘膜内で加水分解生成した PL 及び Isovaleric acid は粘膜内に高濃度に存在し、pH 分配仮説に基づいて受動拡散で血管及び小腸管腔に移行する。したがって、弱塩基性の PL は低 pH の小腸管腔に効率的に

分泌されるのに対し、弱酸性の Isovaleric acid は優先的に血管側に移行するものと考えられる。このように、小腸粘膜でプロドラッグが加水分解される場合には、加水分解生成した親薬物の膜輸送特性に従って血管及び小腸管腔に移行する。例えば、受動拡散で移行する薬物の場合には、親薬物が酸性薬物であれば吸収増大が期待できる。また、塩基性薬物の場合でも、側基底膜に存在するトランスポーターで輸送される場合には、吸収増大が期待できる。<sup>5)</sup>

さらに、*in situ* single pass 実験において加水分解に係わる酵素を同定した。前述したように、小腸上皮細胞の小胞体には CES2 酵素が存在するが、*in vivo* 吸収過程にはサイトゾールや刷子縁膜上に存在する種々の酵素 (aminopeptidase, retinyl ester hydrolase, alkaline phosphatase など) も加水分解に関与する。しかしながら、小腸ホモジネート 9000g 上清 (S9) やマイクロソーム画分を用いた *in vitro* 実験では、刷子縁膜に発現する酵素の活性を見積もることができない。そこで、小腸構造が保持された条件下での加水分解に対する CES の寄与率を求めめるため、CES の特異的阻害剤、bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP)<sup>18)</sup> でラット小腸を前処理して、Isovaleryl-PL の *in situ* single pass 還流実験を行った。その結果、BNPP の前処理は小腸 CES 活性を約 90% 阻害し、BNPP 処理後の Isovaleryl-PL の加水分解クリアランスは 23% まで減少した。したがって、ラット小腸粘膜での加水分解に CES は約 85% 寄与すると推定された。一方、ラット小腸 S9 における Isovaleryl-PL の加水分解においても、BNPP は約 85% 阻害しており、*in situ* single pass 還流実験における CES の寄与率と一致した。これは、*in vivo* 小腸での加水分解における CES の寄与率について、小腸 S9 を用いた実験から予測可能なことを示している。ヒト小腸 S9 の *in vitro* 加水分解実験では、BNPP の阻害率は 95% 以上であり、ヒト小腸では、*in vivo* においても CES が 95% 程度まで寄与するものと予測される。したがって、ヒト小腸の加水分解を考慮したエステル型プロドラッグは、hCE2 の基質特異性を基に設計可能と期待される。

さらに、小腸加水分解について空腸と回腸を比較したところ、ヒトにおいては、活性に大きな差は認められず、CYP とは異なり、小腸の全領域で同程度の活性を示すことが明らかとなった。一方、ラッ

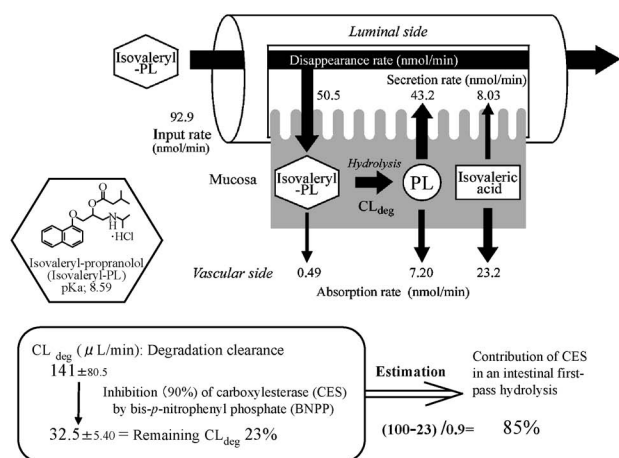


Fig. 5. Absorption of Isovaleryl-propranolol (Isovaleryl-PL) in Rat Jejunal Single-pass Perfusion

Input and absorption rate of Isovaleryl-PL, absorption and secretion rate of PL and Isovaleric acid are listed. Rat jejunal loop (10 cm) was perfused with 300 μM Isovaleryl-PL. The perfusion flow rate was 2.8 and 0.3 ml/min for the mesenteric vein and the jejunal lumen, respectively.  $CL_{deg} = AUC_{M,i}/AUC_{P,i} \times Q_i + AUC_{M,b}/AUC_{P,i} \times Q_b = \text{degraded amount}/AUC_{P,i}$ . Where  $AUC_{P,i}$  and  $AUC_{M,i}$  are areas under the curve of Isovaleryl-PL and PL in the intestinal lumen at the steady state, respectively.  $AUC_{M,b}$  is the area under the curve of PL in the mesenteric vein.  $Q_i$  and  $Q_b$  are flow rate of luminal and vascular perfusate.

ト小腸に関しては、空腸の活性が回腸よりも若干高く、CYPと同様に小腸上部から下部に沿って活性が低下する傾向が認められた。このように、ヒトやラットの小腸では、全領域に亘ってかなり速い速度で加水分解が進行するものと考えられる。一方、非臨床で用いられるビーグル犬では、小腸にCESの発現がほとんどみられないことから、開発されたエステルやアミド型プロドラッグを臨床試験に用いる場合に注意が必要である。

## 6. 肺における加水分解

プロドラッグの体内動態を考える上で、肝臓、小腸に加え、肺の加水分解は重要である。マウス、ラット、ビーグル犬、ヒトにおいて、肺にはCES1ファミリーが分布する。<sup>1,4)</sup> 肺における代謝を考慮する必要がある薬物は、肺に取り込まれ易い構造の化合物に限られるので、塩基性で疎水性の高い薬物などが相当する。PLは非常に肺に移行し易い薬物であり、ビーグル犬では50—60%が初回通過で肺に取り込まれ、<sup>19)</sup> ラットでは肺還流実験開始5分で25%が蓄積すると報告されている。<sup>20)</sup> Butyryl-PLはPLよりも疎水性が高いため、PLよりさらに肺への取り込みが大きいと予測される。そこで、ビーグル犬とラットにButyryl-PLを静脈内投与したのちの血中濃度推移を比較した。<sup>21)</sup> Figure 6に血液中濃度時間曲線下面積(AUC)を示す。ビーグル犬では投与したButyryl-PLの血中濃度は極めて低く、PLとして全身循環に存在したのに対し、ラット血液中にはButyryl-PLの濃度がPLよりも高く、Butyryl-PLが血液中に安定に存在する結果が得られた。しかしながら、血漿中でのButyryl-PLの安定性はラ

ット血漿では半減期4 min、イヌ血漿では半減期70 minと血液中ではイヌの方が極めて安定である。Butyryl-PLの消失クリアランスを算出すると、ラットでは5.8 l/h/kgと心拍出量(17.8 l/h/kg)よりも小さく、肝血流速度(3.6 l/h/kg)の約1.6倍であった。一方、イヌでは65.6 l/h/kgと心拍出量(7.2 l/h/kg)の9倍に相当する非常に大きな値を示した。各臓器の加水分解活性を検討した結果、ラットでは肝臓以外の臓器での加水分解活性が低く、Table 2に示すように、肝臓において血流律速な加水分解が進行し、さらに、血液中の加水分解がButyryl-PLの消失クリアランスを説明するものと考えられた。このように、Butyryl-PLは肺に移行し易いにも係わらず、ラット肺での加水分解はButyryl-PLの消失に影響しないものと考えられ

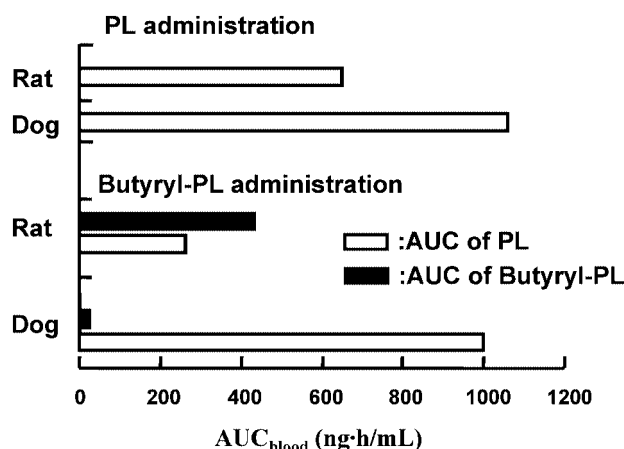


Fig. 6. AUC<sub>blood</sub> of PL and Butyryl-PL after Intravenous Administration of PL and Butyryl-PL to Rats and Dogs  
Dose for rat and dog is 2.5 mg/kg and 2.0 mg/kg equivalent to PL, respectively.

Table 2. Enzyme Kinetic Parameters of Rat Liver Microsomes and Dog Liver, Lung, and Kidney 9000 g Supernatants for Butyryl-PL and Its Organ Clearance (CL<sub>org</sub>) Estimated from *In vitro* Data

Tissue	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)	V <sub>max</sub> (nmol/min/mg protein)	CL <sub>int</sub> (l/hr/kg)	CL <sub>org</sub> (l/hr/kg)	Blood flow (Q, l/hr/kg)
<b>Rat</b>					
Liver	180 ± 21.8	709 ± 19.3	304 ± 27.5	3.3	3.6
<b>Dog</b>					
Liver	62.5 ± 0.60	292 ± 10.0	901 ± 37.3	1.9	1.9
Lung	65.3 ± 10.4	120 ± 14.4	50.1 ± 7.01	4.5	7.2
Kidney	132 ± 22.6	180 ± 30.7	34.7 ± 4.10	0.9	1.3

Protein content of rat liver microsomes is 1280 mg/kg. Protein content of S9 fraction of dog liver, lung, and kidney is 3220 mg/kg, 425 mg/kg, and 423 mg/kg, respectively. Unbound fraction of butyryl-PL in blood ( $f_b$ ) was 0.09. CL<sub>int</sub> was calculated by  $V_{max}/K_m \times (\text{protein content})$ . CL<sub>org</sub> for liver and kidney was calculated by  $Q \times f_b \times CL_{int} / (Q + f_b \times CL_{int})$ , and that for lung was calculated by  $f_b \times CL_{int}$ .

た。一方、イヌで得られた非常に大きな消失クリアランスは Table 2 に示すように、肝臓及び腎臓における血流律速の加水分解に加え、肺における初回代謝が重要な役割を果たしていると考えられた。ビーグル犬に Butyryl-PL を動脈内投与し、静脈内投与時の Butyryl-PL の AUC と比較した結果、肺において約 50% が初回加水分解されることが明らかとなった。<sup>21)</sup> 肺には多くの動物種で CES1 ファミリーが発現するが、その CES1 アイソザイムの基質特異性によって加水分解の程度が大きく異なり、Butyryl-PL のように肺に移行し易い化合物でも、ラット及びイヌで得られたような全く異なる体内動態を示すことが判明した。

### 7. 膜透過促進を目的とした経口投与プロドラッグ製剤の例

疎水性増大に基づいて吸収性を改善したプロドラッグの例は多い。抗生物質や ACE 阻害剤がその例である。これらのプロドラッグの多くはカルボキシル基を修飾したものであり、小腸で加水分解を受けずに肝臓で加水分解される構造である。例えば、ACE 阻害剤の Temocapril や Derapril は 2 つのカルボン酸の 1 つをエチルエステル化したもので、小腸に存在する hCE2 によってほとんど加水分解を受けないが、肝臓に発現する hCE1 では加水分解され易い。<sup>13)</sup> 恐らく、ヒト小腸では加水分解を受けずに、Temocapril として吸収され、肝臓に移行して加水分解を受ける。さらに、hCE1 はヒト肺に発現するため、肝臓で初回代謝を免れても肺で加水分解を受け、血中にはほとんどが親薬物の Temocaprilat として存在すると考えられる。インフルエンザウィルスに有効である Oseltamivil も Temocapril と同様にカルボン酸のエチルエステル体であり、小腸では加水分解されず、肝臓及び肺に発現する hCE1 によって加水分解される。<sup>22)</sup> このように、経口投与プロドラッグは小腸粘膜で加水分解されると小腸管腔へも移行するため、プロドラッグとして成功した例の多くは、小腸で加水分解を受けない構造、すなわち、カルボン酸のエステル体である。しかしながら、カルボン酸エステルの場合にも構造によっては、肝臓でほとんど加水分解を受けないことがあるため注意を要する。例えば、Aceclofenac はカルボン酸のカルボキシメチルエステルであるが、分子末端にカルボン酸があるため、肝臓においても加水分解活性が

非常に低い。<sup>23)</sup>

### 8. ヒト小腸上皮細胞モデル Caco-2 細胞を用いたエステル型プロドラッグの吸収性予測の限界

Caco-2 細胞は、ヒト結腸悪性腫瘍から単離された human colon carcinoma cell line であり、薬物を経口投与後の吸収性と Caco-2 細胞透過性が良好な相関を示すため、<sup>24)</sup> *in vivo* での吸収を簡便に予測するための腸管上皮細胞モデルとして繁用されている。Caco-2 細胞はフィルター上で培養すると、単層膜を形成して小腸上皮細胞と同様の形態を示し、刷子縁膜上の酵素や Phase I, Phase II 酵素及び各種トランスポーターも発現する。Caco-2 細胞にも CES ファミリー酵素が発現するが、意外なことに、その発現パターンは Fig. 7 に示すように、ヒト肝臓と類似し、ヒト小腸とは全く異なる。<sup>25)</sup> すなわち、通常、ヒト小腸に発現する hCE2 の発現は極めて少なく、CES1 ファミリーの hCE1 が高発現している。本来、ヒト結腸には小腸と同様に hCE2 が発現し、<sup>1,4)</sup> 癌化あるいは cell line 化によっても hCE1 発現が顕著に増加する例はほかにない。<sup>26)</sup> 現在のところ、Caco-2 細胞における hCE1 発現の原因は不明である。

Table 3 にヒト小腸ではほとんど加水分解されない Temocapril の Caco-2 細胞 S9 における加水分解を示す。フラスコ、トランスウェルのどちらで培養しても、また、継代数にも関係なく、Caco-2 細胞 S9 における Temocapril 加水分解の  $K_m$  値は、肝臓

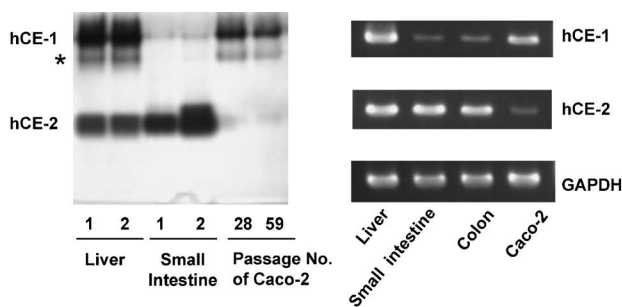


Fig. 7. Expression of hCE1 and hCE2 in Human Liver, Small Intestine, Colon and Caco-2 Cell

The organ microsomes were obtained from Gentenst (1) and Tissue Transformation Technologies (2), respectively. Polyacrylamide gel electrophoresis of liver and small intestine microsomes (5 mg), Caco-2 cell S9 (15 mg) was followed by staining for esterase activity using  $\alpha$ -naphthylbutyrate. \*: monomeric form of hCE-1. For RT-PCR analysis, human tissue total RNA was purchased from BD Science Clontech and total RNA of Caco-2 cell was extracted. RT-PCR analysis of hCE1 and hCE2 mRNA was performed with TaKaRa Ex Taq.

Table 3. Hydrolysis of Temocapril in Caco-2 Cell S9 and Human Liver and Small Intestine Microsomes

	Temocapril		
	$K_m^a$	$V_{max}^b$	$v^c$
S9 of Caco-2 cells cultured in flask for 7 days			
P28	441±8.61	15.9±1.62	5.35±0.375
P59	526±19.0	14.7±4.67	5.07±1.56
S9 of Caco-2 cells cultured in transwell for 21 days			
P29	547±11.8	14.06±0.988	4.98±0.366
Liver microsomes			
	576±33.9	364±15.4	119±13.4
Small intestine microsomes			
	N.D.	N.D.	0.162±0.003

$a$ ):  $\mu M$ ,  $b$ ) nmol/min/mg protein,  $c$ ): nmol/min/mg protein. A hydrolysis rate ( $v$ ) of temocapril was measured at substrate concentration of 250  $\mu M$ . N.D.: not determined.

ミクロソームと同程度であった。CES の発現量は肝臓に比較すると低いいため、Temocapril に対する Caco-2 細胞の加水分解速度は肝臓よりも著しく遅いが、単層膜を通過する過程での加水分解には十分な活性である。Caco-2 細胞単層膜透過性を調べると、Temocapril は透過中に 90%以上が加水分解され、透過側には加水分解生成物の Temocaprilat が高濃度で検出された。したがって、Caco-2 細胞単層膜を用いて、プロドラッグの吸収性を予測すると、小腸で加水分解されない化合物まで Caco-2 細胞では加水分解され、吸収性を低く見積もる可能性がある。Temocapril の場合は、加水分解が進行してもなお、親薬物である Temocaprilat の Caco-2 細胞単層膜透過性に比べて、約 5 倍大きな透過係数を示した。<sup>25)</sup> しかしながら、薬物によっては、Caco-2 細胞単層膜透過中における加水分解によって、誤った予測を立ててしまうことも考えられ、ヒト小腸と Caco-2 細胞における加水分解を比較検討した上で、Caco-2 細胞が透過性評価に有用かどうか見極めることが重要である。

## 9. おわりに

医薬品の開発は分子間相互作用を基に理論的に設計される場合が多くなり、活性を追い求めて行くと、体内動態的には不適切な構造に生まれ変わることがある。体内動態に問題がある薬物に対して、プロドラッグ化は有用な方法である。エステル誘導体は製剤過程での安定性や体内での加水分解の個人差が懸念されるために嫌われる傾向がある。しかしな

がら、親薬物への変換酵素についての正確な情報の蓄積により、体内での加水分解を制御した理論的なプロドラッグのデザインが可能になれば、プロドラッグの利点をうまく利用した医薬品が益々開発されるのではないかと期待される。今後、理論的なプロドラッグ開発のために、生体に存在する加水分解酵素についての情報を数多く発信し、医薬品開発に役立つことを願っている。

## REFERENCES

- 1) Satoh T., Hosokawa M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 257–288 (1998).
- 2) Satoh T., Hosokawa M., *Chem.-Biol. Interact.*, **162**, 195–544 (2006).
- 3) Miyazaki M., Kamiie K., Soeta S., Taira H., Yamashita T., *Biochem. J.*, **370** 101–110 (2003).
- 4) Satoh T., Taylor P., Bosron W. F., Sanghani S. P., Hosokawa M., La Du B.N., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 488–493 (2002).
- 5) Imai T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 173–185 (2006).
- 6) Li B., Sedlacek M., Manoharan I., Boopathy R., Duysen E. G., Masson P., Lockridge O., *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1673–1684 (2005).
- 7) Potter P. M., Wolverton J. S., Morton C. L., Wierdl M., Danks M. K., *Cancer Res.*, **58**, 3627–3632 (1998).
- 8) Imai T., Taketani M., Shii M., Hosokawa M., Chiba K., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1734–1741 (2006).
- 9) Pindel E. V., Kedishvili N. Y., Abraham T. L., Brzezinski M. R., Zhang J., Dean R. A., Bosron W. F., *J. Biol. Chem.*, **272**, 14769–14775 (1997).
- 10) Zhang J., Burnell J. C., Dumauil N., Bosron W. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 314–318 (1999).
- 11) Sun Z., Murry D. J., Sanghani S. P., Davis W. I., Kedishvili N. Y., Zou Q., Hurley T. D., Bosron W. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 469–476 (2004).
- 12) Humerickhouse R., Lohrbach K., Li L., Bosron W. F., Dolan M. E., *Cancer Res.*, **60**, 1189–1192 (2000).
- 13) Takai S., Matsuda A., Usami Y., Adachi T., Sugiyama T., Katagiri Y., Tatematsu M.,



- Hirano K., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 869–873 (1997).
- 14) Senter P. D., Beam K. S., Mixan B., Wahl A. F., *Bioconjug. Chem.*, **12**, 1074–1080 (2001).
- 15) Bencharit S., Morton C. L., Hyatt J. L., Kuhn P., Danks M. K., Potter P. M., Redinbo M. R., *Chem. Biol.*, **10**, 341–349 (2003).
- 16) Bencharit S., Morton C. L., Howord-Williams E. L., Danks M. K., Potter P. M., Redinbo M. R., *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 337–342 (2002).
- 17) Masaki K., Taketani M., Imai T., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 398–404 (2006).
- 18) Mentlein R., Rix-Matzen H., Heymann E., *Biochim. Biophys. Acta*, **964**, 319–328 (1988).
- 19) Pang J. A., Blackburn J. P., Butland R. J., Corrin B., Williams T. R., Geddes D. M., *J. Appl. Physiol. Respir. Environm. Exer. Physiol.*, **5**, 393–401 (1982).
- 20) Dollery C. T., Junod A. F., *Br. J. Pharmacol.*, **57**, 67–71 (1976).
- 21) Imai T., Yoshigae Y., Hosokawa M., Chiba K., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 1234–1242 (2003).
- 22) Shi D., Yang J., Yang D., LeCluyse E. L., Black C., You L., Akhlanghi F., Yan B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 1477–1484 (2006).
- 23) Bort R., Ponsoda X., Carrasco E., Gomez-Lechon M. J., Castell J. V., *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 834–841 (1996).
- 24) Artursson P., Palm K., Luthman K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 27–43 (2001).
- 25) Imai T., Imoto M., Sakamoto H., Hashimoto M., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1185–1190 (2005).
- 26) Pavillard V., Agostini C., Richard S., Charasson V., Montaudon D., Robert J., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **49**, 329–335 (2002).