

## 審査結果の要旨

氏名 設楽悦久

肝類洞側膜には、種々の薬物トランスポーターが発現しており、多くの薬物及び内因性化合物の肝への取り込みに寄与している。肝から排泄される多くの薬物は、これらトランスポーターを介して肝細胞内に取り込まれた後で、代謝を受ける。したがって、トランスポーターを介した肝への薬物取り込みは、最終的な排泄経路が代謝であっても、肝からの消失速度を決定する重要な因子の一つとなりうる。このため、複数の薬物を併用したときに、トランスポーターを介した肝細胞への取り込みレベルで薬物間相互作用を生じる可能性がある。しかしながら、これまでのところ、そのようなメカニズムで生じる薬物間相互作用の臨床での報告例はない。そこで、これまでに定量的な解析に基づいたメカニズムの解明がされていない薬物間相互作用を取り上げ、それらに対するトランスポーターの関与について研究がなされた。

### 1-1. 凍結ヒト肝細胞におけるトランスポーターの機能の解析

薬物取り込みを評価する目的での凍結ヒト肝細胞の有用性を検討する目的で、organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリートランスポーターの典型的基質である estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide (E<sub>2</sub>17 $\beta$ G)の取り込み特性について凍結前のヒト肝細胞およびトランスポーター発現細胞との比較検討が行われた。

異なるドナーから得られた5ロットの肝細胞における凍結前後での E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の取り込みを比較したところ、凍結後においても取り込み機能を維持しているロットがある一方で、低下がみられるロットがあった。一方、E<sub>2</sub>17 $\beta$ G の取り込みに対する K<sub>m</sub> 値を算出したところ、ロット差が見られたが、いずれも OATP2 および OATP8 発現細胞を用いたときに得られた K<sub>m</sub> 値の報告値と近かった。これらの結果より、凍結ヒト肝細胞においては新鮮なヒト肝細胞に比べて取り込み活性が低くなっているロットがあるものの、基質との親和性で評価したトランスポーターの性質は維持されていることが示唆された。したがって、取り込み初速度の絶対値が十分に高いロットの凍結肝細胞を用いれば、薬物取り込みに対する他の薬剤の影響をみることは可能であることが示された。本研究により、薬物間相互作用のメカニズムを解析する目的では有用な実験系となることが明らかとなった。

### 1-2. 高脂血症治療薬 cerivastatin (CER) と免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA) の相互作用のメカニズム解析

CER は cytochrome P450 (CYP) 2C8 と 3A4 を介した二つの異なる代謝経路を持つため、他の薬剤によって一方の代謝経路が阻害を受けた場合であっても、他方が維持されており、重篤な相互作用を受けにくいと考えられていた。しかしながら、CsA との併用により血中濃度が上昇する相互作用が報告された。本研究では、特に CsA によるトランスポーターに対する影響に着

目して、この相互作用のメカニズムの解明を目的とした検討がなされた。

凍結ヒト肝細胞において CER の飽和性取り込みがみられ、これが CsA によって濃度依存的な阻害を受けることが示された。OATP2の発現細胞を用いたときも、同様の結果が得られた。CsA による取り込み阻害の  $IC_{50}$  値と CsA の臨床における門脈中非結合型濃度の計算値との比較から、臨床における相互作用の原因が取り込み阻害だという可能性があることが示された。一方で、CsA はヒト肝ミクロソームを用いた CER の代謝をほとんど阻害しなかった。

以上より、臨床で生じた CER と CsA の相互作用が、トランスポーターを介した取り込みの阻害で説明できる一方で、代謝過程の阻害はほとんど関与していないことが示された。

### 1-3. ラットを用いた CER と CsA の相互作用メカニズムの解明( *in vivo* と *in vitro* の比較検討 )

凍結ヒト肝細胞および OATP2 発現細胞を用いた検討により、トランスポーターを介した取り込み阻害が CER と CsA の相互作用の一因となる可能性があることが示された。しかしながら、このことは、CsA のヒトにおける門脈中非結合型濃度を実測することが困難であるため、血中濃度の予測値を用いて推測するしかない。そこで、ラットを用いて *in vitro* および *in vivo* 実験で得られた結果を直接比較することで、相互作用の原因が取り込み阻害であることを証明することを目的として、本研究が行われた。

*In vivo* の検討においては、CsA の定常状態血中濃度の上昇にともなって、CER のクリアランスが低下することが示された。また、肝への取り込みも同様に低下することが示された。一方、遊離肝細胞を用いた検討からは、ヒト凍結肝細胞の結果と同程度に取り込み阻害が起こることが示され、代謝阻害はみられなかった。*In vitro* の結果から得られた  $IC_{50}$  値を基に CsA 併用時の肝クリアランスを予測したところ、実際に *in vivo* の実験で得られた実測値とほぼ一致した。したがって、ラットにおいては CER と CsA の相互作用は肝への取り込み阻害のみによって説明できることが示された。

### 1-4. CER とフィブラート系高脂血症治療薬 gemfibrozil (GEM) の相互作用のメカニズム解析

重篤な副作用を引き起こした CER と GEM の組み合わせについても、同様の解析が行なわれた。GEM は血中で代謝物として存在している割合が多いことから、GEM の主要な代謝物の影響についても検討がなされた。

OATP2 発現細胞を用いた CER の取り込みに対する GEM および代謝物の影響をみたところ、GEM およびグルクロン酸抱合体(GEM-1-O-glu)が顕著な阻害効果を持つことが示された。阻害効果は GEM-1-O-glu の方が強かった。一方、代謝に対する影響をみたところ、CYP2C8 による代謝に対して GEM および GEM-1-O-glu が阻害効果を持つことが示された。この場合もまた GEM-1-O-glu の方が強い阻害効果を示した。

肝取り込みおよび代謝過程に対する  $IC_{50}$  値は臨床における循環血中の非結合型濃度に比べて高い値であったことから、実際の相互作用につながる可能性は低いと考えられた。しかしながら、GEM-1-O-glu は、ラットにおいてトランスポーターを介して肝に取り込まれ、肝内濃度が高く

なることが報告されており、ヒトでも同様のことが起きると仮定すれば、肝内で高濃度になった GEM-1-O-glu が代謝過程を阻害する可能性があると考えられた。GEM-1-O-glu は血中蛋白非結合型分率も GEM に比べて高いことから、肝内に取り込まれやすいと考えられる。したがって、GEM-1-O-glu による代謝阻害が CER と GEM の相互作用の原因であることが示唆された。

CER と GEM の相互作用は、トランスポーターを介した取り込み過程を直接阻害することによって相互作用が生じる CER と CsA の場合とは異なる機序であるが、この場合もまたトランスポーターが重要な役割を果たしていることが示された。

## 2. ラット Oatp1 および Oatp2 に対する各種化合物の阻害効果の比較検討

肝臓には多くのトランスポーターが発現しており、薬物及び内因性化合物の肝取り込みに寄与している。これらのトランスポーターはそれぞれが複数の基質を認識する一方で、一つの基質に対して複数のトランスポーターが取り込みに関与している。したがって、薬物の肝取り込みのメカニズムを解明するためには、その薬物の肝取り込みに寄与しているトランスポーター群の同定と、取り込みに関与するそれぞれのトランスポーターの寄与率を解明することが不可欠である。トランスポーターの寄与を求める方法の一つとして、個々のトランスポーターに特異的に働く阻害剤の存在下および非存在下での取り込みを評価し、その差を取ることによって単一のトランスポーターを介した取り込みを見積もる方法がある。本研究は、この方法に用いる特異的阻害剤の探索を目的として行われた。

OATP ファミリートランスポーターの阻害剤となる可能性のある複数の化合物を用いて Oatp1 および Oatp2 に対する阻害効果を比較検討した。この結果、Oatp1 に対して選択性の高い阻害効果を現す化合物として、幾つかの NSAIDs および quinidine、Oatp2 に選択性の高い化合物として quinine, rifampicin および digoxin が見いだされた。これらの化合物を阻害剤として用いることによって、ラットにおける肝取り込みのメカニズムをある程度解明できることが示された。

以上の検討により、トランスポーターを介した相互作用の定量的予測をする実験系としての凍結ヒト肝細胞の有用性について評価を行い、この実験系を用いて CER と CsA の相互作用のメカニズムを明らかにした。また、臨床で大きな問題となった CER と GEM のメカニズムも解明した。これらは、臨床で生じた相互作用のメカニズムとしては新しいものであり、今後の医薬品開発に有用な情報になると考えられる。また、いずれの相互作用においてもトランスポーターが重要な役割を果たしていることが示された。一方、ラットにおけるトランスポーターに対する選択的な阻害剤の探索では、阻害効果の差が小さいものの、幾つかの選択的阻害剤を見だし、薬物の肝取り込みのメカニズムを明らかにする上で重要な知見となった。薬物間相互作用を未然に防ぐという視点から、本研究は医薬品開発を行う上で重要なものであると考えられる。本研究のオリジナリティ、重要性を考慮して、博士（薬学）の学位を与えるに値すると認めた。