

## 論文の内容の要旨

### 腎排泄過程を介した薬物間相互作用の定量的評価系の確立

野崎 芳胤

**[序論]** 薬物療法においては複数の薬剤を併用することが一般的であるが、その組み合わせによっては薬物の消失遅延を引き起こし、薬効の増強ならびに副作用を発生するおそれがある。このような薬物間相互作用を事前に予測することは、薬物療法における安全性を確保するために必須である。肝代謝および肝排泄を相互作用部位とする薬物間相互作用については、ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞、ヒト胆管側膜ベシクルなどヒト組織を用いた評価系が確立されている。

一方で、腎排泄過程を介した薬物間相互作用の解析は、動物実験が中心であり、ヒト組織を用いた評価系の確立は立ち後れているのが現状である。

葉酸アナログである Methotrexate (MTX) は抗癌剤としてのみならず、低投与量でリウマチなどにも適用される薬剤であるが、過去に probenecid、penicillin 系抗生物質、非ステロイド性抗炎症治療薬 (NSAIDs) との併用により MTX の消失遅延とそれに起因する副作用の発生が臨床報告されている。MTX は腎排泄型薬剤であり、本相互作用は併用薬による MTX の尿細管分泌過程阻害が一因と考えられた (図. 1)。私は修士課程で MTX の腎取り込み過程をラット腎切片にて解析し、rat Organic anion transporter 3 (rOat3) および reduced folate carrier (RFC-1) が関与していること、さらに salicylate などの NSAIDs による阻害効果は、臨床非結合型濃度で部分的であり、

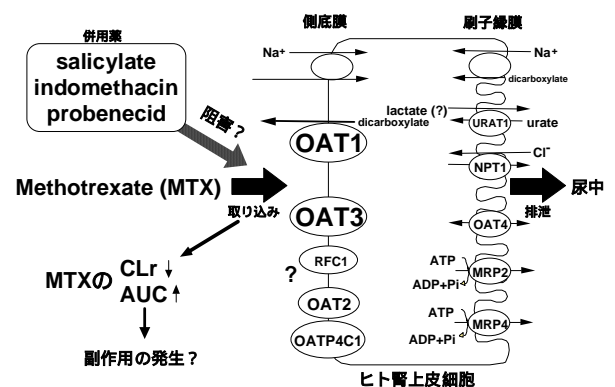


図. 1 MTXの尿細管分泌過程を介した薬物間相互作用の模式図

臨床で報告されている薬物間相互作用を取り込み過程のみで説明することは難しいことを明らかにした。しかし、腎取り込みに関わるトランスポーターの寄与率に種差がみられる場合もあり、本相互作用を定量的に解析する上でヒト腎組織を用いることが不可欠と考えた。そこで本研究ではヒト腎切片を有機アニオン輸送評価系として確立し、これを用いて本相互作用の定量的解析を試みた。

また、側底膜を介して腎に取り込まれた薬物は刷子縁膜を介して尿中へと排泄されるため、刷子縁膜側の腎排泄過程の阻害も消失遅延を引き起こす可能性を有している。MTXの排泄にはABCトランスポーターファミリーに属するBreast cancer resistance protein (Bcrp)、Multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)、Mrp4の関与が示唆されている。そこで各トランスポーターを過剰発現させた細胞から調製した膜ベシクルを用いてATP依存的な輸送を測定し、臨床上相互作用が報告されている薬物の阻害効果を評価した。また、おのおのの寄与率を遺伝子ノックアウトマウス、変異ラットを用いたin vivo実験により評価し、薬物間相互作用部位としての可能性を検討した。

本研究は腎取り込み・排泄の両輸送過程に対する併用薬の阻害効果を定量的に解析することで、本相互作用が腎排泄過程阻害により引き起こされるものであるかを検証するとともに、腎排泄過程における薬物間相互作用の定量的解析法を提示していきたいと考えている。

## [方法および結果]

**ヒト腎切片を用いた有機アニオンの腎取り込み過程の評価** 腎側底膜側有機アニオントランスポーターhOAT1、hOAT3の典型的な基質を用いて、輸送実験を行った。hOAT1の典型的な基質であるp-aminohippurate (PAH)、2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)、hOAT3の典型的な基質benzylpenicillin (PCG)およびdehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)のヒト腎切片への取り込みは飽和性輸送を示し、速度論的解析の結果、PAHおよび2,4-DのKm値(それぞれ14–48、0.7–4.4 μM)はin vitro hOAT1発現系から算出されたKm値と、PCGのKm値(14–90 μM)はhOAT3発現系から算出されたKm値と比較的に近い値を示した。PAHおよびPCGをそれぞれhOAT1、hOAT3の選択的阻害剤として用いた結果、ヒト腎切片へのPAH、2,4-Dの取り込みはPAHにより、PCG、DHEASの取り込みはPCGにより強く阻害されたことから、PAHおよび2,4-Dの腎取り込みにはhOAT1が、PCGおよびDHEASの取り込みにはhOAT3が関与するという結果を強く支持する。ヒト腎組織切片でOAT1、OAT3の機能評価が可能であることを確認した。

**salicylate、indomethacin、probenecidによるヒト腎切片におけるMTXの取り込み阻害** ヒト腎切片へのMTXの取り込みは飽和性輸送を示し、そのKm値(49 μM)はhOAT3に対するKm(21 μM)と比較的に近い値を示した。hOAT1の選択的阻害剤であるPAH、hOAT3の選択的阻害剤で

あるPCGは濃度依存的にMTXの飽和性輸送の大部分を阻害するが、RFC-1の選択的阻害剤である還元型葉酸(5-methyltetrahydrofolate)は部分的な阻害効果を示すのみであった。したがって、有機アニオントランスポーターとRFC-1が同程度の寄与をもつラットとは対照的に、ヒトではMTXの腎取り込みに対してRFC-1の寄与は小さく、飽和性輸送の大部分をhOAT1あるいはhOAT3が占めていることが示唆された。MTXと薬物間相互作用を引き起こすことが過去臨床報告されているsalicylate、diclofenac、indomethacin、ketoprofen、probenecid、ciprofloxacinのMTXのヒト腎切片への取り込みに対する阻害効果を観察したところ、salicylate、indomethacin、probenecidは臨床非結合型濃度で十分MTXの取り込みを阻害し、阻害の程度はラットよりも大きかった(図.2)。diclofenac、ketoprofen、ciprofloxacinは臨床濃度でMTXの取り込みを阻害しなかった。

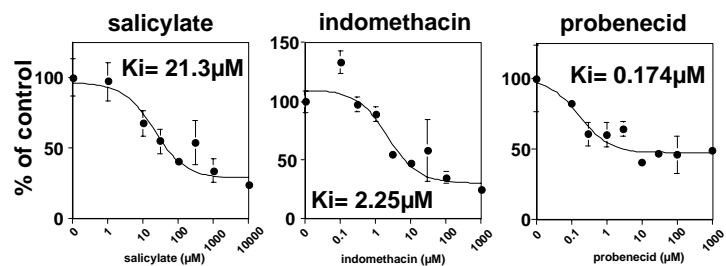


図.2 ヒト腎切片へのMTXの取り込みに対するsalicylate、indomethacin、probenecidの阻害効果

**NSAIDsはhuman MRP4を介したMTXの輸送を臨床非結合型濃度で阻害する** hBCRP、hMRP2、hMRP4の過剰発現細胞から膜ベシクルを調製し、MTXのATP依存的な輸送を観察した。hBCRP、MRP2、MRP4はいずれもMTXを良好な基質とし、そのKm値はそれぞれ5.2、1.5、0.1 mMであった。種々NSAIDsのhuman BCRP、MRP2、MRP4に対する阻害効果を観察した。MRP2に対しては阻害効果を示さなかった。BCRPに対する阻害効果は一部観察されたが、臨床非結合型濃度を考慮するとその阻害は临床上重要ではない。MRP4はNSAIDsにより強く阻害され、salicylate、indomethacinは臨床非結合型濃度でMRP4を阻害した。

**MTXはMrp2、Bcrpを介して尿中に排泄される** Bcrpノックアウト(KO)マウス、Mrp4 KOマウス、Mrp2を先天性に欠損したEisai hyperbilirubinemic rat (EHBR)を用いてMTXの腎排泄過程におけるBcrp、Mrp2、Mrp4の寄与率を評価した。[<sup>3</sup>H] MTXを静脈内持続投与し、定常状態における

表. Bcrp-ノックアウトマウス、Mrp4-ノックアウトマウス、EHBR (Mrp2欠損ラット)におけるMTXの速度論的パラメータ

	Bcrp (+/+)	Bcrp (-/-)	Mrp4 (+/+)	Mrp4 (-/-)	SDR	EHBR
CL <sub>tot, plasma</sub> (ml/min/kg)	36.7 ± 5.0	25.1 ± 0.5 *	28.5 ± 1.6	39.2 ± 3.1 *	30.5 ± 1.8	10.2 ± 1.3 ***
CL <sub>renal, plasma</sub> (ml/min/kg)	20.3 ± 2.0	13.9 ± 0.8 *	16.7 ± 0.6	18.8 ± 1.2	10.7 ± 0.5	5.84 ± 0.44 ***
GFR (ml/min/kg)	16.9 ± 1.9	14.6 ± 0.7	13.8 ± 1.3	16.1 ± 1.3	10.2 ± 1.4	9.07 ± 1.07
CL <sub>sec, kidney</sub> (ml/min/kg)	1.76 ± 0.36	0.540 ± 0.019 *	1.94 ± 0.02	1.37 ± 0.21	1.24 ± 0.21	0.125 ± 0.074 **

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

速度論的パラメータを算出した (表)。Bcrp KOマウスでは全身クリアランス ( $CL_{tot, plasma}$ ) および腎クリアランス ( $CL_{renal, plasma}$ ) が有意に低下し、また腎臓濃度基準の分泌クリアランス ( $CL_{sec, kidney}$ ) も有意に低下していた。Mrp2 を遺伝的に欠損したEHBRでも、MTXの $CL_{tot, plasma}$ 、 $CL_{renal, plasma}$ 、 $CL_{sec, kidney}$ が有意に低下していた。一方、Mrp4 KOマウスではMTXの $CL_{renal, plasma}$  および $CL_{sec, kidney}$ に有意な変化は観察されなかった。したがってrodentではMrp2 およびBcrpがMTXの腎排泄過程に寄与していることが明らかとなった。

**ヒト腎臓におけるBcrp、Mrp2、Mrp4 の蛋白発現** マウス、ラット、ヒト腎臓よりホモジネートおよび刷子縁膜ベシクル (BBMV) を調製し、Bcrp、Mrp2、Mrp4 の蛋白発現をWestern blot法により検討した。Mrp2 およびMrp4 はいずれの動物種のホモジネートからも検出され、その発現はBBMVに濃縮されていた。Bcrpはマウスおよびラット腎臓では検出されたが、ヒトでは検出されなかった。このことからBcrpの発現には種差があり、ヒトでの発現量が低いことが示唆された。

**[考察]** ヒト腎組織切片が有機アニオン化合物の輸送能を有しており、側底膜側の薬物輸送の評価系として利用可能であることを明らかにした。MTX の腎取り込み過程には顕著な種差が観察された。ラット腎では rOat3 および RFC-1 が同程度の寄与を示すが、ヒト腎では RFC-1 の寄与はほとんどなく、その輸送の大部分が有機アニオントランスポーターである hOAT1 あるいは hOAT3 により説明されることが示唆された。その結果、ヒト腎切片への MTX の取り込みは salicylate、indomethacin、probenecid により臨床非結合型濃度で阻害され、かつ阻害の程度はヒト腎組織切片で大きいことが明らかとなった。これは NSAIDs によりほとんど阻害されない RFC-1 の寄与率がヒトでは小さいためと考えられる。これらの薬物については、腎取り込み過程の阻害が薬物間相互作用を引き起こす一因となり得る。MTX の腎取り込みに関わるトランスポーターの寄与率にラットとヒトで種差があるため、相互作用を定量的に評価するためにはヒト腎組織を用いることが必要である。

また MTX の刷子縁膜を介した腎排泄過程には Bcrp と Mrp2 が関与していることが遺伝子欠損動物を用いた解析から明らかとなったが、両トランスポーターは臨床濃度の NSAIDs で阻害されないことがベシクル輸送実験から明らかとなっている。したがって、本相互作用は刷子縁膜側の腎排泄過程阻害に起因するものではないと推察される。しかし、Bcrp の発現には種差が見られ、ヒトとラットやマウスで MTX の腎排泄に関わるトランスポーターの寄与率に種差がある可能性も否定できない。一部の NSAIDs は MRP4 を臨床濃度で阻害することから、仮にヒトでは MRP4 の寄与率が高ければ、相互作用部位となりえる。この点については更に検討することが必要である。

diclofenac、ketoprofen など過去に MTX と薬物間相互作用を引き起こすことが臨床報告されている薬物については、臨床濃度では MTX の腎取り込みおよび排泄両過程を阻害しないと予測さ

れた。現状では、これら薬物との相互作用を説明することは困難であるが、これら薬物のグルクロン酸抱合代謝物によるトランスポーターの機能阻害、また腎障害の惹起やプロスタグランジン合成阻害による糸球体ろ過速度の低下など、他の間接的なメカニズムについても今後検討する必要がある。

#### **[参考文献]**

Nozaki Y, Kusuhara H, Endou H and Sugiyama Y. Quantitative evaluation of the drug-drug interactions between methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the renal uptake process based on the contribution of organic anion transporters and reduced folate carrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Apr;309 (1):226-34.