

審査の結果の要旨

氏名 野崎 芳胤

薬物療法において複数の薬剤を併用することが一般的であるが、併用薬により薬物の排泄経路が阻害され、血中消失の遅延による薬理作用の増強や副作用を発生するおそれがある。そのため、このような薬物間相互作用を事前に予測する評価法の確立することが必要である。肝代謝および胆汁排泄における薬物間相互作用の評価系としては、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をヒト組織を用いた実験法が確立されている。一方で、腎排泄過程を介した薬物間相互作用の評価は動物実験が中心であり、ヒト組織の利用は立ち遅れている。

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。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、この薬物間相互作用のメカニズムと考えられた。申請者は修士課程において MTX の腎取り込み過程をラット腎切片を用いて解析し、rat Organic anion transporter 3 (rOat3) と reduced folate carrier (RFC-1) が関与していること、さらに salicylate などの NSAIDs が MTX の腎取り込み過程を臨床非結合型濃度で部分的に阻害するものの、その阻害の程度は弱く、臨床での薬物間相互作用を取り込み側の阻害のみでは説明できないことを明らかにしている。本研究では、ヒト組織(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が行われた。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排泄されるため、刷子縁膜を介した腎排泄過程阻害も薬物の消失遅延を引き起こす。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おり、膜ベシクル実験系を用いて臨床上相互作用が報告されている薬物の阻害効果が測定されている。また、排泄に関わるトランスポーターを明らかにするために、遺伝子ノックアウトマウス、変異ラットを用いた *in vivo* 実験が行われた。

(1) ヒト腎切片への有機アニオンの取り込み

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、ヒト腎切片への取り込みが解析された。hOAT1 の典型的基質である *p*-aminohippurate (PAH)、2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)、hOAT3 の典型的基質 benzylpenicillin (PCG) および dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) について、ヒト腎切片へ飽和性の取り込みが観察された。速度論的解析の結果、PAH および 2,4-D の K_m 値は *in vitro* hOAT1 発現系から算出された K_m 値と、PCG の K_m 値は hOAT3 発現系から算出された K_m 値と比較的近い値を示した。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が寄与していることが示唆されている。

(2) ヒト腎切片を用いた薬物間相互作用の定量的解析

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値はhOAT3に対するKmと比較的近い値を示した。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MTXの飽和性輸送の大部分を阻害するのに対して、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評価した結果、salicylate、indomethacin、probenecidは臨床非結合型濃度で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。diclofenac、ketoprofen、ciprofloxacinは臨床濃度でMTXの腎取り込みを阻害しないことが明らかにされた。

(3) ベシクル輸送実験を用いた薬物間相互作用の解析

human Bcrp、Mrp2、Mrp4の過剰発現細胞から膜ベシクルを調製し、輸送実験が行われ、Bcrp、Mrp2、Mrp4はいずれもMTXを良好な基質とすることが明らかとなった。輸送のKm値はそれぞれ5.2、1.5、0.1 mMと求められた。種々NSAIDsのhuman Bcrp、Mrp2、Mrp4に対する阻害実験が行われた。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。これに対して、Mrp2に対しては阻害効果を示さず、Bcrpに対する阻害効果は一部観察されたが、臨床非結合型濃度ではその阻害効果は非常に弱いことが明らかにされた。

(4) 遺伝子欠損動物を用いたMTXの腎排泄過程の解析

MTXの腎排泄過程におけるトランスポーターを明らかにするために、Bcrpノックアウト(KO)マウス、Mrp4 KOマウス、Mrp2を先天的に欠損したEisai hyperbilirubinemic rat (EHBR)を用いた*in vivo*実験が行われた。 $[^3\text{H}]$ MTXを静脈内持続投与し、定常状態における速度論的パラメータが算出された。Bcrp KOマウスでは全身クリアランス($\text{CL}_{\text{tot, plasma}}$)および腎クリアランス($\text{CL}_{\text{renal, plasma}}$)が有意に低下し、また腎臓濃度基準の分泌クリアランス($\text{CL}_{\text{sec, kidney}}$)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 $\text{CL}_{\text{tot, plasma}}$ 、 $\text{CL}_{\text{renal, plasma}}$ 、 $\text{CL}_{\text{sec, kidney}}$ が有意に低下していた。一方、Mrp4 KOマウスではMTXの $\text{CL}_{\text{renal, plasma}}$ および $\text{CL}_{\text{sec, kidney}}$ 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。

(5) 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分画を調製し、Bcrp、Mrp2、Mrp4 の発現が Western blot により検討された。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、その発現は刷子縁膜分画濃縮されていた。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。

以上のように、申請者はヒト腎切片を用いた輸送実験法を確立し、これを用いてトランスポーターを介した腎取り込み過程における薬物間相互作用の定量的評価を行った。腎薬物輸送において、これまでにこのような定量的解析法はなく、今後本実験系はヒトにおける有機アニオン化合物の腎取り込み過程解析評価系、あるいは腎取り込み過程を介した薬物間相互作用の定量的予測系として利用されることが期待される。申請者は実際に本実験系を用いて、抗癌剤 MTX と NSAIDs の薬物間相互作用を定量的に解析し、一部の NSAIDs が MTX の腎取り込み過程を臨床濃度で阻害することを明らかとした。この結果は、より安全な化学療法を達成する上で重要な知見となるに違いない。刷子縁膜を介した腎排泄過程の阻害も薬物の消失遅延につながりうる。申請者は遺伝子欠損動物を用いて MTX の腎排泄に関わるトランスポーターの寄与の算出を試み、Bcrp に加え新たに Mrp2 が寄与していることを明らかにした。Mrp2 は薬物の胆汁排泄に関わっていることが広く知られているが、腎排泄過程における重要性はほとんど明らかとなっていなかった。申請者の結果は腎排泄過程における Mrp2 の重要性を示唆するものであり、薬物の腎排泄過程の解明に大きく貢献するものと言える。また、一部の NSAIDs が臨床濃度で Mrp4 を阻害することを明らかとした。Mrp4 はプリンヌクレオシドやセファロスポリンなどの腎排泄に関わっていることから、このような阻害剤との併用により Mrp4 を介した薬物の排泄が遅延する可能性がある。本研究は今後の薬物間相互作用研究の展開に大きな影響を与えるものと考えられた。

このように本研究は薬物動態領域の研究発展に大きく貢献するのみならず、より安全な化学療法を目指す上でその研究意義は大きく、よって博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。