

## 審査の結果の要旨

氏名 慈

磊

セファロスポリン系抗生物質は $\beta$ -ラクタム系抗生物質に属し、セファマイシン類やオキサセフェム類と共にセフェム系抗生物質と総称される。セファロスポリン系抗生物質はベータラクタム環（四員環ラクタム）とヘテロ六員環を持ち、これまでにベータラクタム環の3位とヘテロ六員環の7位のそれぞれに種々側鎖を持つ多様なセファロスポリン系抗生物質が開発されてきた。セファロスポリン系抗生物質はグラム陰性菌・陽性菌に対する抗菌作用を示し、抗菌スペクトルによって第一世代～第四世代セフェムに分類される。ほとんどのセファロスポリン抗生物質の生体内からの排泄経路は尿排泄であるが、cefoperazone, cefpiramide や cefodizime のように一部のセファロスポリン抗生物質は主に肝臓から排泄される。従来からの解析により、これらセファロスポリン抗生物質の生体内運命の決定には、トランスポーターが深く関与していることが明らかにされてきた。

本研究で取り上げた ceftizoxime は腎排泄が主な排泄経路であり、糸球体濾過の他に近位尿細管において尿細管分泌を受けることが知られている。興味深いことに、72人の患者における ceftizoxime の体内動態について母集団薬物動態学解析が行われた結果、ceftizoxime の腎クリアランスは二峰性分布が存在し、排泄能力の低い患者が全体の37%という高い割合で存在することが報告されている。一般に、医薬品の尿細管分泌にはトランスポーターが関与することから、ceftizoxime の腎排泄に関わるトランスポーターに高頻度で個人間変動が存在することが予想される。腎尿細管上皮細胞側底膜におけるセファロスポリン系抗生物質の取り込み過程には、有機アニオントランスポーター（OAT1 と OAT3）が関与していることが示唆されている。OAT1 と OAT3 機能に影響を与える一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）が存在することは知られているが、そのアリル頻度は非常に低く、取り込み過程における個人間変動では二峰性分布を説明することは難しい。本研究では、ceftizoxime の腎クリアランスが二峰性分布を示すメカニズムを明らかにするために、ceftizoxime の腎排泄に関わるトランスポーターの同定（第1章）とコーディング領域における一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）の解析（第2章）が行われた。本研究で取り上げられた ABC トランスポーターである multidrug resistance associated protein 4 (MRP4)は広範な基質選択性を示し、cGMP, cAMP 等の cyclic nucleotides、ステロイドの抱合体等内因性物質を基質とする他、種々薬物を基質とすることが明らかにされている。腎臓では近位尿細管の刷子縁膜に発現し、腎臓中から尿細管管腔中への排出に働いていること

が示唆されているトランスポーターである。更に、第三章ではラットの腎スライスを用いて、ceftizoxime の腎尿管上皮細胞の側底膜取り込み過程について研究が行われた。OAT1 と OAT3 以外に、ほかのトランスポーターは ceftizoxime の側底膜取り込みに関与していることが示唆された。

## 1 セファロスポリンの尿管分泌における MRP4 の関与

Human MRP4 と mouse Mrp4 の cDNA を組み込んだ組み替えアデノウィルスを開製し、HEK293 細胞を宿主細胞として過剰発現系を構築した。ウィルス感染細胞から調製した細胞膜ベシクルでは、MRP4 の典型的な基質である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) の ATP 依存的な取り込みが確認されている。注射剤であるセファロスポリン系抗生物質は、cefepime、cefsulodin と cefaloridin を除き、hMRP4 機能を強く阻害した。Cefalexin、cefaclor、cefadroxil など経口剤として用いられるセファロスポリン系抗生物質の阻害能は低いことが明らかになった。更に、ceftizoxime、cefazolin、cefotaxime と cefmetazole については、MRP4 を強制発現させた膜ベシクルでのみ ATP 依存的な輸送が観察され、これらのセファロスポリン系抗生物質が MRP4 の基質となることが明らかとなった。Ceftizoxime については、mMrp4 の基質になることも確認されている。

MRP4 の基質となるセファロスポリン系抗生物質のうち、ceftizoxime と cefazolin をマウスに定速静注し、定常状態における薬物の血液・腎臓中濃度、尿中排泄速度を測定し、全身クリアランス、腎クリアランスなど速度論パラメーターを求めた。両化合物ともに、腎クリアランスは糸球体濾過速度よりも大きく、尿管分泌を受けることが示された。更に、MRP4 の関与を明らかにするために、野生型マウスと Mrp4 knockout マウスとで速度論パラメーターが比較された。Ceftizoxime と cefazolin ともに定常状態の血中濃度には有意な差が見られなかった。Ceftizoxime では Mrp4 knockout マウスにおける尿中排泄速度に有意な減少が認められたが、cefazolin では有意な差は認められなかった。血液中濃度基準の全身クリアランスと腎クリアランスには、有意な差は認められなかった。しかし、ceftizoxime と cefazolin の腎臓中濃度は Mrp4 knockout マウスにおいて 1.9 倍と 3.4 倍に増加しており、Mrp4 knockout マウスにおける腎臓中濃度基準の腎排出固有クリアランスは野生型マウスの 7.5 と 34% に減少したことになる。この結果は Mrp4 がセファロスポリン系抗生物質の尿管分泌に関与している事を示唆している。

## 2 MRP4 の遺伝子多型の解析

MRP4 の遺伝子多型のうち、コーディング領域上に存在し、かつアミノ酸置換を伴う 4 つの SNPs (G171C, G187W, K304N, E757K) に注目し解析が行われた。これらの SNPs を持

つ変異体 MRP4 cDNA を組み込んだ組み換えアデノウイルスを調製し、HEK293 細胞を宿主細胞として遺伝子発現系を構築した。細胞膜上の MRP4 発現量に関しては、4つの変異体は wild type よりも低くなる傾向を示し、とくに G187W では野生型の 50%に低下していた。輸送能力に関しては、ceftizoxime については G187W では野生型の 50%であり、DHEAS については K304N と E757K が野生型の 140%、PAH については G171C で野生型の 140%であった。この結果から、MRP4 の遺伝子多型は基質依存的に影響が異なることが示唆された。G187W による ceftizoxime の輸送能力の低下は発現量の低下で説明される。この SNP は ceftizoxime の腎排泄の低下に繋がる可能性を有しているが、現在文献的に報告されているアリル頻度からすると、この遺伝子多型のみで ceftizoxime の腎クリアランスの二峰性分布説明することは困難である。

### 3 腎スライスにより ceftizoxime の取り込みの評価

腎スライスを用いて、ceftizoxime の腎取り込み過程に関わるトランスポーターについて研究が行われた。Ceftizoxime の腎スライスへの取り込みは飽和性を示し、トランスポーターによる膜透過が大部分を説明できることを明らかとなった。OAT1 と OAT3 選択的阻害剤である *p*-aminohippurate と benzylpenicillin、有機アニオントランスポーターの非特異的な阻害剤である probenecid を使って、ceftizoxime の取り込みに対する阻害作用を検討したところ、*p*-aminohippurate と benzylpenicillin ではほとんど阻害が見られず、また probenecid の阻害作用も OAT1 と OAT3 に対するものよりも弱いことが明らかになった。この結果は、従来の仮説とは異なり、OAT1 と OAT3 とは別のトランスポーターが ceftizoxime の側底膜取り込みに関与していることを示唆している。このトランスポーター機能の個人間変動が、ceftizoxime の腎クリアランスの二峰性分布を説明するという可能性も考えられる。

本研究では、in vitro での輸送実験ならびに、Mrp4 knockout マウスを用いた in vivo 体内動態解析により、一部のセファロsporin系抗生物質の腎排泄に MRP4 が関与していることを明らかにした。MRP4 の遺伝子多型解析(SNPs)により、コーディング領域の遺伝子多型が MRP4 機能(発現量、輸送活性)に与える影響を明らかにした。また、腎の取り込み過程に、OAT1 と OAT3 とは異なる有機アニオントランスポーターが発現し、ceftizoxime の取り込みに関与している事を明らかにした。これらの結果は、薬物の生体内運命を制御し、適切な動態特性を有する医薬品の開発に貢献するとともに、ファーマコジェノミクスに基づいたテーラーメイド医療への応用が期待される。本研究を、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。