

審査の結果の要旨

氏 名 今 岡 知 己

Adefovir, cidofovir, tenofovir は B 型肝炎ウイルス、エイズウイルスに対する抗ウイルス薬として開発され、adefovir と tenofovir はプリン塩基、cidofovir はピリミジン塩基の誘導体である。これらの薬物は細胞内でリン酸化を受け、活性体へと変換される。生体内からは腎排泄が主要な排泄経路であり、糸球体ろ過の他に近位尿細管における能動的な分泌（尿細管分泌）を受けることが知られている。Adefovir, cidofovir, tenofovir はいずれも生理的 pH では負電荷を有している有機アニオン化合物であり、有機アニオントランスポーター-organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6) と multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) の基質であることが既に報告されている。特に、adefovir と cidofovir は dose-limiting toxicity として腎機能の低下が知られている。活性体である 2 リン酸化体はミトコンドリアのゲノム複製を行う DNA polymerase γ の阻害能を有することから、ミトコンドリア毒性が adefovir の腎毒性を誘発する要因となっていると考えられている。

申請者は adefovir の腎毒性について、親化合物の細胞内濃度を支配する腎近位尿細管上皮細胞内への取り込みおよび管腔側への排出の両過程に関与するトランスポーター群、更に、細胞内において 2 リン酸化体のミトコンドリアへの暴露を決定する要因となるリン酸化過程ならびにミトコンドリア膜を介した膜輸送過程を解明するべく研究に取り組んだ。

1. Adefovir の腎排泄メカニズムの解析

ヒト腎スライス法を用いて、adefovir の血液側からの取り込み過程についての解析が行われた。Adefovir のヒト腎スライスへの取り込みは飽和性を示した (K_m 値は 131 μ M)。遺伝子発現系を用いた輸送実験の結果によると、adefovir は側底膜側有機アニオントランスポーターである OAT1 と OAT3 の基質となることから、OAT1、OAT3 選択的阻害剤である *p*-アミノ馬尿酸 (PAH) とベンジルペニシリン (PCG) による阻害実験が行われた。その結果、adefovir の腎への取り込みは OAT1 選択的阻害剤である PAH によって濃度依存的に阻害されるもの、PCG によっては阻害されない。この結果は、OAT1 が主に腎取り込み過程に関与していることを示唆している。Adefovir, cidofovir, tenofovir の尿管腔中への排泄過程に関わるトランスポーターとして、MRP4 を仮定し、MRP4 を過剰発現した膜ベシクルを用いて輸送実験が行われた。MRP4 発現膜ベシクルでは、adefovir および tenofovir については ATP 依存的な取り込みが観察されたが、cidofovir の ATP 依存的な輸送は観察されなかった。この膜ベシクルへの ATP 依存的な取り込みでは飽和性は観察されていないが、コントロールベシクルでは ATP 依存的な取り込みが見られないこと、浸透圧依存性を示すこと、MRP4 基質である DHEAS により阻害されることから、MRP4 による能動輸送を反映しているものと考察されている。Mrp4 の in vivo での重要性を明らかにするために、Mrp4(-/-)マウスを用いて、定常状態において adefovir, cidofovir, tenofovir の血漿中濃度、尿排泄速度、腎臓中濃度が測定

された。マウスにおいても、全身クリアランスの大部分は腎クリアランスによって説明され、腎クリアランスは糸球体ろ過速度よりも大きく、尿細管分泌の関与が示唆された。Adefovir、tenofovir の腎臓内濃度は Mrp4(-/-)マウスでは野生型に比べ有意に高く、Mrp4(-/-)マウスでは腎臓内濃度基準の腎排泄クリアランスが有意に低下することを見出している。また、腎臓中の adefovir 1リン酸化体及び2リン酸化体いずれも Mrp4(-/-)マウスにおいて野生型マウスに比べ顕著に上昇した。一方で、cidofovir に関しては、Mrp4(-/-)マウス、野生型マウスで動態学的パラメータに差異は認められなかった。これらの結果から adefovir および tenofovir の腎排泄メカニズムに関して、血液側からの取り込み過程には OAT1 が、管腔中への排泄過程には MRP4 が少なくとも一部は関与していることが明らかにされた。一方で、cidofovir については取り込み過程については、adefovir、tenofovir と共有しているものの、排出側には別のトランスポーターが関与していることが明らかとなった。

2.Adefovir の腎毒性メカニズムの解析

申請者は OAT1 発現 HEK293 細胞において、adefovir 処理によってミトコンドリア毒性が生じることを細胞内 ATP レベル及び mtDNA ゲノムのコピー数の減少によって確認した。adefovir のリン酸化に関わる酵素として、ATP の再生に関わる酵素群 adenylate kinase (AK2-4) を候補として仮定し、各酵素の過剰発現系を OAT1 過剰発現 HEK293 細胞を宿主細胞として構築し、adefovir の細胞毒性に関する感受性を比較した。本実験で用いた adenylate kinase のうち AK2 は細胞質とミトコンドリアの外膜と内膜との間の膜間スペース、AK3 と AK4 はミトコンドリアマトリックスに局在する。MTT 法により細胞毒性を比較すると、AK2/OAT1、AK4/OAT1 発現細胞、若干ではあるが AK3/OAT1 細胞において OAT1 発現細胞、コントロール細胞に比べ、adefovir の細胞毒性は上昇した。細胞内の adefovir およびリン酸化体の割合を測定したところ、AK2/OAT1 細胞ではそれぞれ 29% (adefovir)、26% (adefovir-p)、45% (adefovir-pp) であり、AK3/OAT1 細胞では 52%、23%、25%、AK4/OAT1 細胞では 50%、15%、35%であった。コントロール細胞(OAT1)では 64%、13%、23%であることから、AK2 では親化合物の割合が減少しており、リン酸化が促進されていた。AK3/OAT1 ならびに AK4/OAT1 細胞では、細胞毒性が増強されるものの親化合物の減少は AK2 過剰発現ほど顕著ではなかった。この結果は、AK 各分子種の細胞内局在の違いにより説明されると考察されている。以上の結果をあわせると、AK2、AK3、AK4 のいずれも adefovir のリン酸化に関与すると考えられる。特に AK3、AK4 過剰発現により毒性が増強されたことは、adefovir ないし adefovir-p がミトコンドリアマトリックスへ移行していることを示唆している。ミトコンドリアマトリックス内の膜電位は-180mv と細胞質側よりも負であり、adefovir およびそのリン酸化体のように生理的 pH でアニオンである化合物の膜透過性は低いことが想定される。そこで、申請者はトランスポーターの存在を仮定し、単離ミトコンドリアを用いて輸送実験が行われた。dATP、dCTP の輸送に対する adefovir、adefovir-pp の阻害効果を検討したところ、2mM adefovir では dATP、dCTP のミトコンドリアを介した輸送が促進され、一方

で 2mM adefovir-pp においては dATP、dCTP の輸送が阻害された。Adefovir、adefovir-pp はミトコンドリア膜における dATP-、dCTP の輸送担体と相互作用することを見出した。

本研究により、adefovir の腎取り込み機構に OAT1 が中心的に機能し、管腔への排泄には MRP4 が関与していることが示唆された。取り込み過程とは異なり、有機アニオンの管腔側排出メカニズムはほとんど明らかにされておらず、ABC トランスポーターである MRP4 が一部ではあるが管腔側排出輸送に関わることを示した本研究の意義は大きいものである。MRP4 を介した薬物間相互作用や SNPs による MRP4 の機能低下は adefovir の腎組織滞留性を上昇させ、腎毒性増強因子となり得ることが考えられる。反対に、OAT1 を阻害する医薬品を添加することで、adefovir や tenofovir の血中滞留性増加による治療効率の向上と、腎臓への蓄積を阻害することで腎毒性を予防できるものと期待される。このように、動態学的観点から、申請者の研究は医療に貢献するものと考えられる。Adefovir などの逆転写酵素阻害薬の薬効ターゲットは細胞質内のウイルス逆転写酵素であり、ミトコンドリアへの活性代謝物の暴露を最小限にすることで、抗ウイルス薬の副作用を回避した創薬が可能になると期待される。現在、薬物によって惹起される肝毒性、腎毒性の発現予測・回避は創薬過程で注目されている。申請者の得た研究成果はより安全な医薬品の創製に貢献できるものと考え、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。