

論文の内容の要旨

論文題目

「抗ヒスタミン薬 Fexofenadine の体内動態を制御するトランスポーターの同定ならびにトランスポーターの輸送阻害を原因とする薬物間相互作用の予測」

氏名 松島 総一郎

【背景・目的】

Fexofenadine (FEX)は、眠気などの副作用の少ない第二世代抗ヒスタミン薬の一種で、アレルギー性鼻炎や慢性蕁麻疹などの治療に汎用されている。FEX は、ほとんど体内で代謝されず、経口投与後、循環血に入ったもののうち約 2/3 が胆汁排泄、残り約 1/3 は尿排泄により消失する。一方、FEX は中性域で両性イオンであり、水溶性が比較的高いことを考慮すると、肝臓・腎臓における輸送には一連のトランスポーターの関与が想定され、これらが FEX

の体内動態を決定づける要因であると考えられる。一方、FEX は、併用薬やジュース類などと薬物間相互作用を起こすことが数多く報告されている(表 1)。こ

Compounds	AUC	腎クリアランス
Itraconazole	↑*2.0-2.7	→
Ketoconazole	↑*2.6	
Azithromycin	↑*1.7	
Erythromycin	↑*1.8-2.1	
Ritonavir	↑*2.7	
Ritonavir+Lopinavir	↑*4.1	
Verapamil	↑*1.0-2.5	→
Diltiazem	→	→
Omeprazole	→	
Cimetidine	→	↓*0.61
Probenecid	↑*1.5	↓*0.27
Rifampicin	↓*0.37-0.53	→
Grapefruit Juice	↓*0.37-0.67	→
Orange Juice	↓*0.31	→
Apple Juice	↓*0.27	→
St.John's wort	→	→

表1 FEXと併用薬や飲料との臨床における相互作用

のうち、AUC が上昇する相互作用の多くは、小腸の P-gp による FEX の管腔側への排出の阻害と考えられているが、他に、FEX の肝取り込みの阻害も一因となりうる。FEX の肝取り込み過程には、当研究室での検討から organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) が主に寄与する事が示されている(図 1)。そこでまず本研究では、臨床で実際に相互作用が観察されている併用薬を含め、種々の化合物の OATP1B3 を介した FEX の取り込みに対する阻害効果を観察し、臨床での相互作用の可能性について定量的に検討した。

一方、胆管側膜に発現し薬物を輸送するトランスポーターには、主にアニオン系化合物を輸送する multidrug resistance associated protein 2 (MRP2)、中性やカチオン性化合物を基質とする multidrug resistance 1 (MDR1)、アニオン系化合物など広範な基質を輸送し、特に硫酸抱合体に親和性の高い

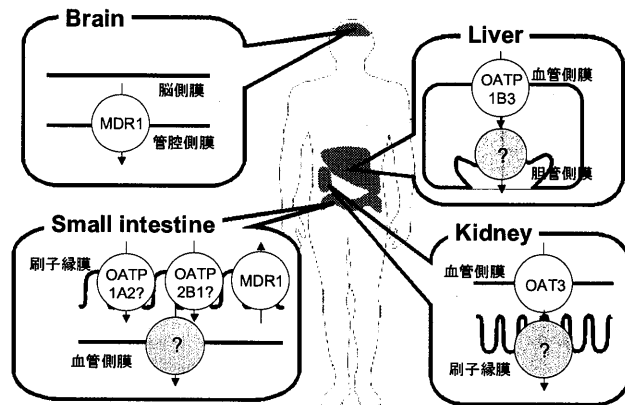


図1 FEXの体内動態に関わるトランスポーター群

breast cancer resistance protein (BCRP)、そして胆汁酸とごく一部の薬物を輸送する bile salt export pump (BSEP)などが発現している。当教室の検討で、Mrp2 を遺伝的に欠損した Eisai hyperbilirubinemic rats, Mdr1a/1b (-/-) mice, Bcrp (-/-) mice を用い、FEX の胆汁排泄を *in vivo* で評価したが、どの系においても変化が観察されなかったことから、FEX の胆汁排泄に関与するトランスポーターは、現時点で不明である。この結果について私は、①Mice と Rats で種差が存在し、Mice では Mrp2 が関与する。②Bsep の寄与がある、という仮説をたて、MRP2, BSEP の FEX に対する基質認識性や寄与について、*in vitro* 実験系および各種 knockout mice を用いて検討した。

一方、FEX の腎クリアランスは、probenecid, cimetidine によって減少することが報告されている(表 1)。過去の当研究室の検討から、probenecid は、organic anion transporter 3 (OAT3)を介した FEX の輸送を阻害している事が示唆されたが、cimetidine については全く不明であった。近年、multidrug and toxin compound extrusion family (MATE family)のトランスポーターが同定され、ヒトにおいては MATE1, MATE2 が腎の刷子縁膜側に発現し、種々のカチオン性化合物と一部の両性化合物を基質にし、特に cimetidine に対して、非常に高い親和性を持つ事が

示された。従って、FEX の刷子縁膜側を介した輸送に MATE が関与する可能性を考え、MATE 発現系を用いて、FEX の認識性と cimetidine の阻害効果について観察した。

【方法・結果】

1. FEX のヒト肝取り込みにおける種々の薬物の阻害効果の検討

OATP1B3 発現 HEK293 細胞を用いて FEX の取り込みを評価し、それに対する種々の薬物の阻害効果を観察した。また、消化管からの吸収を考慮した生理学的モデルに基づき、文献値から門脈中蛋白非結合型濃度の最大値を算出し、*in vitro* 実験で得られた阻害定数(K_i)と比較した。 $1+(門脈中蛋白非結合型濃度の最大値)/K_i \geq 1.50$ を超えた化合物として cyclosporin A, rifampicin, azithromycin, probenecid があげられ、これらについては、FEX の肝取り込みを臨床において阻害する可能性があることが示唆された。

2. FEX の胆管側膜を介した排出メカニズムに対する検討

MRP2, BSEP の FEX に対する基質認識性の検討

極性を有する MDCKII 細胞の basolateral 側に OATP1B3、apical 側に MRP2 又は BSEP を発現させた共発現系を用い、両方向の経細胞輸送を測定した。その結果、対照細胞、単独発現系(OATP1B3, MRP2, BSEP を個々に発現させた系)では、方向性のある輸送は観察

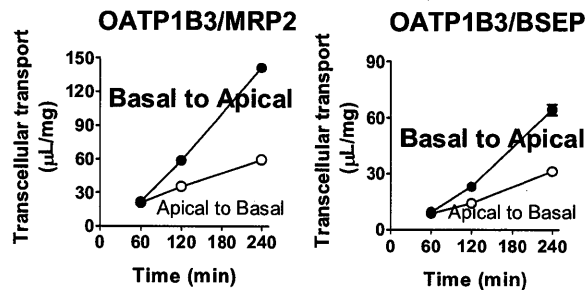


図2 OATP1B3/MRP2、OATP1B3/BSEP 共発現系におけるFEXのベクトル輸送

されなかったのに対し、OATP1B3/MRP2 共発現系、OATP1B3/BSEP 共発現系においては、FEX の basal 側から apical 側への輸送が反対方向の輸送に比べて有意に大きくなった(図 2)。また、BSEP 発現細胞から調製した膜ベシクルを用いて輸送を評価した所、ATP 依存的な輸送が観察され、その輸送は飽和性を示した。これらの結果から FEX が MRP2, BSEP の基質になる事が示唆された。

Mrp2 (-/-) mice を用いた *in vivo* 実験による FEX の体内動態への Mrp2 の寄与の検討

FVB mice(n=5)と Mrp2 (-/-) mice(n=6)に FEX を定速静注し、定常状態における血漿、胆汁、尿、肝臓、腎

	C _{ss,plasma} (nM)	CL _{plasma} (µL/min/kg)	CL _{bile,plasma} (µL/min/kg)	CL _{bile,liver} (µL/min/kg)	Bile Flow (µL/min/30g)	Liver/Plasma Ratio
Wild Type	414±54	29.8±3.9	9.48±0.82	0.250±0.053	1.92±0.21	40.7±6.8
Mrp2 (-/-)	597±49*	20.1±1.4*	3.38±0.38**	0.198±0.022	1.59±0.14	16.2±2.0*

*P<0.05,**P<0.01

表2 FEXのFVB mice及びMrp2(-/-) miceにおける薬物動態パラメーター

臓、脳の濃度を測定することで、FEXの薬物動態パラメーターを評価した(表2)。その結果、全身クリアランス (CL_{plasma})、肝クリアランス ($CL_{bile,plasma}$)は、それぞれ有意に低下したが、肝臓中濃度基準の胆汁排泄クリアランス($CL_{bile,liver}$)は、2割ほど低下したものの有意ではなかった。さらに、肝臓対血漿濃度比は、有意に低下した。これらの結果から、miceにおける Mrp2 の寄与はわずかにあるものの、他のトランスポーターの寄与が大きく、さらに、Mrp2 (-/-) miceにおいて、FEXの血管側への backflux が上昇している事が示唆された。Mrp2 (-/-) miceにおいて、血管側膜に発現する Mrp3 の発現量が上昇する事が報告されている。また、血管側膜には Mrp4 の発現も認められ、胆汁うっ滞時に発現量が上昇し、胆汁酸を輸送する事が知られており、Mrp3, Mrp4 が FEX の血管側への backflux に関与する可能性がある。このことから、次に MRP3, MRP4 が FEX の体内動態に影響を与えるかについて検討した。

MRP3, MRP4 の FEX に対する基質認識性の検討

MRP3, MRP4 発現膜ベシクルを用いて輸送を評価した所、MRP3 発現ベシクルにおいてのみ ATP 依存的な輸送が観察され、その輸送には、飽和性が観察された($K_m=28.2\pm 9.9\mu M$)(図3)。これらの結果から FEX が MRP3 の基質になる事が示された。

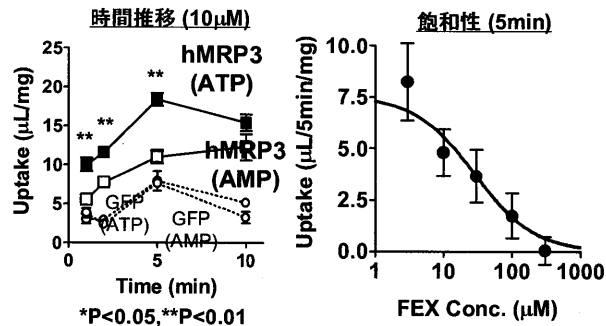


図3 human MRP3発現ベシクルを用いた ATP依存的な取り込み及び飽和性の検討

Mrp3(-/-) mice および Mrp4 (-/-)

mice を用いた *in vivo* 実験による FEX の体内動態への Mrp3, Mrp4 の寄与の検討

FVB mice(n=7)と Mrp3 (-/-) mice(n=6)に FEX を定速静注し、定常状態における血漿、胆汁、尿、肝臓、腎臓、脳の濃度を測定することで、FEX の薬物動態パラメーターを評価した(表3)。その結果、

	$C_{ss,plasma}$ (nM)	CL_{plasma} ($\mu L/min/kg$)	$CL_{bile,plasma}$ ($\mu L/min/kg$)	$CL_{bile,liver}$ ($\mu L/min/kg$)	Bile Flow ($\mu L/min/30g$)	Liver/Plasma Ratio
Wild Type	382±46	33.6±3.8	9.32±1.01	0.235±0.025	1.61±0.10	37.9±3.4
Mrp3 (-/-)	214±11**	56.1±3.1**	25.9±1.1**	0.495±0.023**	2.66±0.22**	48.0±2.1*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

表3 FEXのFVB mice及びMrp3(-/-) miceにおける薬物動態パラメーター

CL_{plasma} ,

$CL_{bile,plasma}$ は、それぞれ有意に上昇したが、 $CL_{bile,liver}$ も有意に上昇した。一方、肝臓対血漿濃度比は、有意に上昇したことから、Mrp3 が FEX の血液側への backflux に関与することが示唆された。興味深いことに、Mrp3(-/-) mice では、

胆汁流量の有意な上昇が見られた。胆汁流量は、胆汁中のグルタチオンと胆汁酸の濃度に依存することから、Bsep/Mrp2 の活性がどちらかまたは両方が上昇している可能性があり、同時に FEX の胆汁排泄にも寄与する可能性がある。一方、C57/BL6 mice (n=4) と Mrp4 (-/-) mice (n=3) において同様の検討を行った所、どの薬物動態パラメーターにおいても有意差はなく、FEX の体内動態への Mrp4 の関与は低い事が示唆された。

3. FEX の腎排泄における薬物間相互作用メカニズムの検討

ヒト腎スライスを用いた FEX の腎取り込みの評価と probenecid, cimetidine の阻害効果

ヒト腎スライスを用いて、probenecid, cimetidine が FEX の腎取り込みに影響を与えうるか否かについて検討した(図 4)。FEX のヒト腎スライスへの取り込みは飽和性を示し、 K_m 値は $157 \pm 7 \mu\text{M}$ だった。probenecid, cimetidine の阻害効果

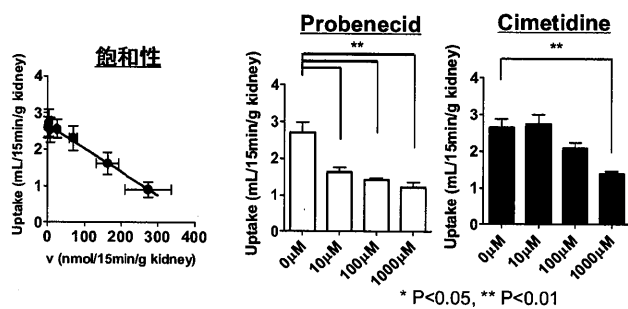


図4 ヒト腎スライスにおけるFEXの取り込みの飽和性と Probenecid, Cimetidineの阻害効果

を観察した所、臨床における血漿蛋白非結合型濃度の最大値(probenecid: $24 \mu\text{M}$, cimetidine: $5.2 \mu\text{M}$)において、probenecid は有意に FEX の取り込みを阻害したのに対し、cimetidine は阻害しなかった。この事から cimetidine による FEX の腎クリアランスの低下は、刷子縁膜を介した排出の阻害による可能性が示唆された。

MATE の FEX に対する基質認識性の検討

ヒト MATE1, MATE2 ならびにラット Mate1 発現系を用いて FEX の輸送を評価した(図 5)。その結果、rMate1, hMATE1 発現系において有意な取り込みが観察された。また、hMATE1 発現系において FEX の取り込みの飽和性が観察された(図 5)。さらに、hMATE1 発現系を用いて、FEX の取り込みに対する cimetidine

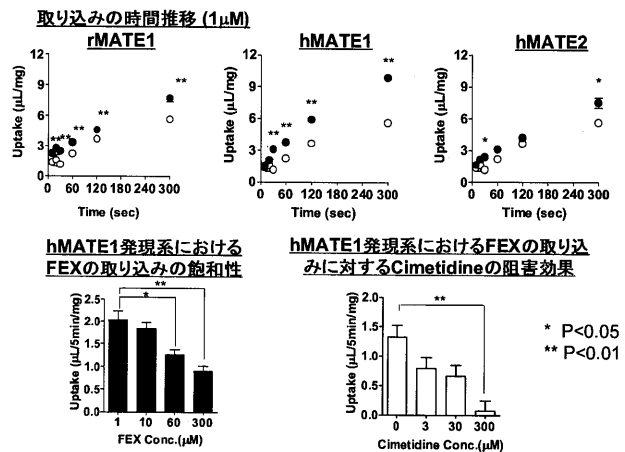


図5 MATE familyのfexofenadineに対する基質認識性

の阻害効果を観察した所、3 μ M の cimetidine により、FEX の取り込みが阻害剤非存在時の 60 %にまで低下した(図 5)。この事から cimetidine による FEX の MATE1 を介した輸送阻害が薬物間相互作用の原因の一つになる事が示唆された。

【考察・まとめ】

FEX は様々な薬物や飲料と相互作用する事が報告されていた。そこで本研究では、その相互作用のより詳細な解析をすべく、①ヒト肝取り込みの阻害効果、②胆汁排泄・腎排出トランスポーターの基質認識性、③knockout mice を用いた *in vivo* におけるトランスポーターの寄与の検討を行った。まず、併用薬が FEX の肝取り込みを阻害することによる薬物間相互作用は多くはないことを明らかにした。次に、基質認識性については、従来明らかになっていたものに加え、MRP2, MRP3, BSEP, MATE1 が FEX を基質にする事を明らかにした。胆管側を介した輸送は、これまでほとんどの胆汁排泄型の薬物は、Mrp2, Mdr1, Bcrp のいずれかで説明できていたが、FEX に関してはこれらで説明できない。従って、既知のトランスポーターの中で、BSEP, MATE1 は有力な候補となりうる。Mrp3 (-/-) mice の検討で、胆汁流量の上昇と FEX の $CL_{\text{bile,liver}}$ の上昇が同時に観察された事から、Bsep, Mrp2 の関与の可能性が高まった。今後、直接的な証明のためには、Bsep や MATE1 の knockout mice を用いた検討が必要である。

本研究で興味深い事に、Mrp3 が FEX の肝臓中から血管側への輸送に関与する事を初めて明らかにした。Mrp3 は、胆汁うっ滞時における胆汁酸の排出やグルクロン酸抱合体の排出が生理的な役割であると考えられてきたが、薬物自体の排出にも関与する事が明らかになったことで、薬物の体内滞留性を決定したり、薬物間相互作用に関与する可能性がある。これまで Mrp3 の薬物自身の輸送について検討した例は少なく、今後さらに検討を加える事で、Mrp3 が薬物の体内動態に重要な影響を与えている事が明らかになるかもしれない。

最後に、FEX と cimetidine との薬物間相互作用は、腎の刷子縁膜で起こり、そこに MATE1 が関与する可能性を初めて明らかにした。これまでに ofloxacin や AZT の腎排泄が cimetidine によって阻害される事が示唆されており、これらのメカニズムも MATE が関与するかもしれず、今後の検討が期待される。

本研究によって、FEX に対して、ヒトにおける肝臓・腎臓における様々なトランスポーターの「候補」を明らかにしたが、それらの「候補」がどのようにヒトにおける FEX の体内動態制御に関与するか、また薬物間相互作用に影響するかは、不明である。今後、候補トランスポーターの SNPs などの機能変動やそ

れらに対する阻害剤、誘導剤を用いた *prospective clinical study* を行い、その結果を組み込んだ薬物動態モデルを構築することで、各トランスポーターのヒトにおける寄与が明らかになると思われる。幸いにも FEX は、重篤な副作用の少ない薬物であるので、FEX の体内動態に対して、大きな影響を及ぼすトランスポーターに対しては、そのトランスポーターの *probe drug* としての可能性も考えられる。