

## 審査の結果の要旨

氏名 松島 総一郎

副作用の少ない第二世代の抗ヒスタミン薬である Fexofenadine (FEX)は、薬物動態学の分野において、以下の理由で、最も注目されている薬物の一つである。すなわち、①臨床において、FEX と併用薬や飲料との間の薬物間相互作用に関する事例が数多く報告されている。②FEX の肝臓から胆汁中への排出メカニズムは、これまでの *in vivo* における各種遺伝子欠損動物を用いた結果、未だ不明である。③FEX の腎クリアランスを低下させる薬物間相互作用が報告されているが、FEX の腎臓から尿中へ排出されるメカニズムについては未解明である。という3点が挙げられる。このような背景から申請者は、FEX の体内動態を制御する肝・腎のトランスポーターの同定ならびに薬物間相互作用の分子メカニズムの解明を目指して、*in vitro/in vivo* 両面からの種々の検討を行った。

## 1. FEX の肝取り込みに対する各種併用薬の阻害効果

既に当研究室において、FEX の肝取り込みには Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3)が主に寄与する事が明らかになっている。そこで申請者は、薬物間相互作用メカニズムの一つとして、FEX の肝取り込み過程の阻害という仮説を実証するため、OATP1B3 発現 HEK293 細胞を用いて FEX の取り込みに対する種々の薬物の阻害効果を観察した。また、過去に当研究室から提唱した、消化管からの吸収を考慮した数理モデルに基づき、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。その結果、 $1+(門脈中蛋白非結合型濃度の最大値)/K_i \geq 1.50$  を超えた化合物として cyclosporin A, rifampicin, azithromycin, probenecid が挙げられ、これらは、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。しかし、その他の化合物においても臨床において薬物間相互作用を起こす化合物は多く含まれており、肝取り込みだけで薬物間相互作用メカニズムのすべてを説明する事は難しい事が考えられた。

## 2. 肝臓に発現する排出トランスポーターが FEX の体内動態に与える影響に関する検討

FEX の胆管側膜を介した排出メカニズムについては未だ解明されていない。当研究室の過去の検討から、Multidrug resistance associated protein 2 (Mrp2)を欠損したラットである EHBR (Eisai hyperbilirubinemic rat)、Multidrug resistance 1 (Mdr1)、Breast cancer resistance protein (Bcrp)のノックアウトマウスを用いて FEX の胆汁排泄クリアランスを評価したが、対照群と比較して FEX の胆汁排泄に差が観察されなかった経緯がある。この結果について申請者は、①マウスとラットで種差が存在し、マウスでは Mrp2 が関与する。②胆汁酸の胆汁排泄に重要な役割を果たす Bile salt export pump (Bsep)の寄与がある、という2つの仮説をたて、MRP2, BSEP の FEX に対する基質認識性や *in vivo* での寄与について、*in vitro* 実験系および Mrp2 ノックアウトマウスを用いて検討した。基質認識性に関しては、当研究室で構築された OATP1B3/MRP2 共発現系、OATP1B3/BSEP 共発現系を用いることで、FEX が MRP2, BSEP の基質になる事を初めて明らかにした。Mrp2 ノックアウトマウスを用いた検討の結

果から、Mrp2については、全体の2割程度の寄与は認められるが、他のトランスポーター群の関与の方が大きい事が示唆された。興味深いことに Mrp2 ノックアウトマウスにおける FEX の肝臓から血管側への backflux が対照群に比べ上昇している事が示唆された。これまでの報告から Mrp2 ノックアウトマウスにおいて、血管側膜上に発現する Mrp3、Mrp4 の発現量が上昇することが報告されており、次に申請者は Mrp3、Mrp4 の FEX の体内動態に対する寄与について検討した。Mrp3、Mrp4 発現膜ベシクルを用いた検討から、MRP3 は FEX を基質とするが、MRP4 においては基質としないことが示された。また、Mrp3 ノックアウトマウス、Mrp4 ノックアウトマウスを用いた検討から、Mrp3 が FEX の肝臓から血中への backflux に関与し、Mrp4 の関与は少ない事が示唆された。これらの結果は、MRP3 が生理的条件下で、肝臓から血中への FEX の backflux に関与し、バイオアベイラビリティの上昇や体内滞留性の向上など重要な役割を果たす可能性が示唆された。

### 3. FEX の腎排泄過程における薬物間相互作用メカニズムに関する検討

FEX の腎クリアランスは、probenecid、cimetidine によって減少することがヒト臨床研究を通じて報告されている。過去の当研究室の検討から、probenecid は、organic anion transporter 3 (OAT3) を介した FEX の腎取り込みを阻害す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とし、特に cimetidine に対して、非常に高い親和性を持つ事が示された。申請者は、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 に対する基質認識性と cimetidine の阻害効果について観察した。まず、ヒト腎スライス法を用いて、FEX の血管側膜を介した取り込みに対する probenecid、cimetidine の阻害効果を観察した所、probenecid は臨床での使用濃度の範囲(10 $\mu$ M)で有意に取り込みを減少させたのに対し、cimetidine は、100  $\mu$ M までほとんど阻害が観察されず、臨床での使用濃度の範囲内では取り込みを減少させなかったことから、cimetidine は FEX の取り込み過程以外のプロセスに影響を与えている事を明らかにした。次に human MATE1 (hMATE1)、hMATE2、rat MATE1 (rMATE1) 発現系を用いて FEX の取り込みを評価した所、hMATE1、rMATE1 発現系で有意な取り込みが観察された。また、cimetidine による hMATE1 を介した取り込みに対する阻害効果を観察した所、臨床濃度で、約半分の阻害を示した事から、この事から cimetidine による FEX の MATE1 を介した腎排出輸送の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。

以上のように、申請者は、①臨床で FEX の AUC を上昇させる併用薬の中で、probenecid と azithromycin が FEX の肝取り込みを阻害しうること、②FEX に対する基質認識性に関して、従来明らかになっていたものに加え、MRP2、MRP3、BSEP、MATE1 が FEX を基質にする事を初めて明らかにし、胆管側膜を介した FEX の排泄には Mrp2 が一部関与し、肝臓から血中への backflux には Mrp3 が関与すること、③cimetidine と FEX の薬物間相互作用は、腎の刷子縁膜を介した hMATE1 による腎排泄の阻害により起こる可能性があること、を本研

究を通じて明らかにした。①については、これまで多くの研究者が FEX と併用薬との薬物間相互作用が小腸の P-gp による排出の阻害によってのみ起こると信じていたが、本研究のように *in vitro* 実験系の結果から、定量的に薬物間相互作用を検討しようとする研究は数少なく、複数の薬物について肝取り込み過程の阻害とその他の原因の可能性を論理的に分別しており、興味深い知見であると考えている。②については、FEX の体内動態に関与する新たに複数のトランスポーターが関与する事を示唆した興味深い結果といえる。特に、MRP3 の薬物動態における寄与については、未変化体の薬物に限れば、現在のところ当研究室で明らかにした methotrexate 以外には報告がなく、新規な結果である。③については、FEX の腎の刷子縁膜を介した相互作用メカニズムを説明するために、まだあまり解析が進んでいない新規トランスポーター MATE ファミリーに着目し、cimetidine の相互作用点となりうる可能性を複数の実験から示している点で、新しい相互作用メカニズムの提唱につながる研究であるといえる。

このように、本研究は単に FEX という体内動態的に興味深い特性を示す 1 化合物の体内動態を調べたということに留まらず、複数のトランスポーターについて *in vitro* 実験や *in vivo* ノックアウト動物を用いた検討を組み合わせることで薬物動態に与える寄与について詳細に議論をしている。また薬物間相互作用についても定量的な視点から可能性について慎重に議論がされており、極めて論理的な薬物動態研究を遂行していると言える。この研究成果は、新たな薬物動態に関与するトランスポーター群を明らかにしたことで、FEX のみならず、今後新薬の開発過程一般においてもヒトにおける体内動態、個人間変動、薬物間相互作用の予測をする上で十分に活用する知見を数多く含んでいる。よって、申請者は、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。