

## 審査の結果の要旨

氏名 田原晴信

医薬品の研究開発において、ヒトにおける薬理作用・動態特性・安全性を予測するためにマウス・ラット・イヌ・サルなどの動物種が使用されている。動物実験からヒトの有効性を外挿するためには、実験動物とヒト間の薬物動態学的因子（代謝酵素、トランスポーターなど）と薬理学的因子（受容体、酵素など）の種差を考慮する必要がある。従来から薬物動態学的因子として、血中の蛋白結合、代謝・排泄過程に関する種差の解析が行われており、実験動物で得られた動態パラメータをヒトへ外挿する方法論の一つとして、アロメトリー式を用いた予測法が用いられている。この方法は各動物の個体あたりのクリアランス (CL) 値がアロメトリー式で表せるという経験則に基づいている。腎 CL を記述するためのアロメトリー式の指数項は、ネフロン数と体重の関係より得られる指数項と近似しているため、腎 CL の種差は主にネフロン数の違いを反映しており、尿細管あたりの排泄能力において種差は小さいものと考えられてきた。しかし、あくまでこの予測法は経験則であり、例外の存在を否定することは困難である。H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である famotidine は、主に尿細管分泌により尿中へ排泄される弱塩基性の薬物で、ヒトでは probenecid の併用投与により famotidine の血漿中濃度の上昇および腎 CL の低下が生じる。しかし、ラットではこの薬物間相互作用を再現することが出来ず、famotidine の腎尿細管分泌において probenecid 感受性トランスポーターの寄与率に種差の存在が示唆されていた。医薬品の探索研究において、ヒト体内動態の優れた化合物を選択することは一つの使命であり、ヒト体内動態および薬物間相互作用を予測することが重要となる。そのためには、*in vitro* でトランスポーターの基質選択性の種差を把握し、適切な実験動物を用いて相互作用試験を検証することが、より精度の高いヒト薬物間相互作用の予測に繋がるものと考えられる。そこで、腎臓の近位尿細管側底膜に発現する有機アニオントランスポーター (OATs) の種差に関する知見を得て、さらにヒトと類似した輸送特性を示す動物種としてサルに着目し、その輸送特性を明らかにすることを目的として研究が行われた。

第一章では腎取り込み関与する OAT1、OAT3 の輸送特性のヒトおよびラット間の種差を明らかにするために、代表的な基質の輸送特性を比較している。第二章では H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用の種差のメカニズムを明らかにするために、OATs および OCTs 安定発現細胞を用いて H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の輸送特性の種差を明らかにした。その結果に基づいて、H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用の種差の要因として、OAT3

の輸送活性および OCT1 の発現分布の種差によることが示唆された。そこで、第三章ではサル（サル）の有用性を示すために、サル OATs の輸送特性およびサル OCTs の発現分布を評価し、さらにサルにおける H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用を評価し、その妥当性を検証している。

## 1、ラット・ヒト間での有機アニオントランスポーター機能の比較

OAT1 および OAT3 は近位尿細管の側底膜に局在し、薬物の尿細管分泌において血液から近位尿再管への取り込み過程に関与している。OATs の輸送特性の種差を明らかにするために、ヒトとラット OAT1 および OAT3 の基質選択性および輸送活性の比較が行なわれた。OAT1 および OAT3 の代表的な基質の取り込みにおける濃度依存性を調べた結果、いずれも飽和性の取り込みが認められた。これら化合物の  $K_m$  値をラットとヒト間で比較した結果、OAT1 および OAT3 いずれも同程度の値であった。更に、輸送活性をラットとヒト間で比較すると、OAT1 では良好な相関性が認められたのに対して OAT3 では相関性が低く、OAT3 を介した輸送活性に種差が認められた。

## 2、H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用における種差のメカニズム解析

～OATs/OCTs 発現細胞における H2 受容体拮抗薬の輸送および probenecid の阻害作用～

H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用の種差のメカニズムを解明するために、ヒトおよびラット OATs/OCTs 安定発現細胞を用いて、H2 受容体拮抗薬の輸送特性および probenecid の阻害作用が検討された。

hOAT3 発現細胞における相対輸送活性は cimetidine (1) > famotidine (0.37)、ranitidine (0.24) であり、rOat3 発現細胞では ranitidine (1.9) > cimetidine (1) >> famotidine (0.13) の序列であった。OAT3 を介した H2 受容体拮抗薬の輸送活性にも種差が認められ、OAT3 を介した famotidine の輸送活性がラットで低いことが示された。rOct1 発現細胞における相対輸送活性は cimetidine (1)、famotidine (0.75)、ranitidine (0.87) と同程度であったが、r/hOCT2 発現細胞では cimetidine (1) 比べ、ranitidine (0.02/0.14) および famotidine (0.09/0.12) の輸送活性は非常に低かった。H2 受容体拮抗薬の取り込みに対する probenecid の阻害作用について検討した結果、r/hOCT2 および rOct1 を介した cimetidine および famotidine の取り込みは probenecid により阻害されなかったが、OAT3 を介した取り込みは強く阻害され、probenecid の  $K_i$  値は 3-6  $\mu$ M であった。

以上の結果から、famotidine と probenecid の薬物間相互作用の種差は、OAT3 を介した輸送特性に種差が認められること、ヒト腎臓に OCT1 が発現していないことに起因するものと考えられた。ヒトで薬物間相互作用が生じた時の probenecid の血漿中非結合型濃度 (20-50

$\mu\text{M}$ ) は、probenecid の hOAT3 に対する  $K_i$  値を上回っていることから、famotidine の腎分泌 CL の低下は hOAT3 の阻害作用に基づくことが示唆された。

### 3、サルを用いた H2 受容体拮抗薬と probenecid の薬物間相互作用試験(*in vitro-in vivo* 評価)

ラットに代わる実験動物としてサルが適していると考えられるが、サルの薬物トランスポーターの多くは未解明である。本研究ではサル腎臓より mkOAT1 および mkOAT3 をクローニングし、それらの輸送特性の種差を検討すると共に、カニクイザルを用いた H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物相互作用試験が行なわれ、サルの有用性を *in vitro* および *in vivo* から検証している。

サル腎臓より PCR 法によりクローニングした mkOAT1 および mkOAT3 のアミノ酸配列は、ヒトと比べて 97 および 96% と高い相同性を示した。Western blot 法および免疫染色法により、ヒトと同様に mkOAT1 および mkOAT3 の腎臓への発現および近位尿細管の側底膜への局在が認められた。mkOAT1 および mkOAT3 の安定発現細胞を用いて、OATs の代表的な基質の輸送活性を hOATs と比較した結果、OAT1 および OAT3 いずれにおいても良好な相関性が認められた。mkOAT3 発現細胞を用いて H2 受容体拮抗薬の輸送活性を比較した結果、相対輸送活性は cimetidine (1) > famotidine (0.32)、ranitidine (0.33) の序列であり、hOAT3 の序列と一致した。Cimetidine および famotidine の mkOAT3 を介した取り込みは probenecid により強く阻害され、 $K_i$  値は 3-6  $\mu\text{M}$  と hOAT3 と同程度であった。次に種差の要因である OCT1 の組織分布について検討した結果、ヒトと同様に mkOCT1 は主に肝臓に、mkOCT2 は腎臓に発現していることが示された。

以上の *in vitro* データに基づいて、カニクイザルを用いた H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用試験を実施した。カニクイザルに famotidine を静注後の血漿中曝露は、probenecid の併用投与により約 2 倍に、腎 CL および腎分泌 CL は約 1/3 および 1/10 に低下した。一方、cimetidine の血漿中動態は probenecid の併用投与によっても変化しなかった。この時の probenecid の血漿中非結合型濃度は 10-36  $\mu\text{M}$  であり、mkOAT3 に対する  $K_i$  値 (3-6  $\mu\text{M}$ ) を上回っていることから、famotidine の分泌 CL の低下は、mkOAT3 の阻害作用によることが示唆され、逆に cimetidine ではヒトと同様に OCT2 を介した腎排泄が示唆された。いずれの薬物も臨床で認められた薬物相互作用をサルで反映する結果であった。以上の結果から、ヒト腎排泄における薬物間相互作用を予測する上で、サルが良いモデル動物となることが *in vitro* と *in vivo* 試験から検証することができた。

本研究は、H2 受容体拮抗薬と probenecid との薬物間相互作用の種差の機構解明を通じて、一般に種差が小さいと考えられている腎トランスポーターについても、より高い精度の予測を行うため

には、ラットに加えてヒトと類似の基質選択性を示すサルが有用であることを実証した。本研究は薬物動態領域の研究発展ならびにより安全な医薬品の創製に大きく貢献するものであり、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。