

## 論文の内容の要旨

論文題目 ピタバスタチンの肝取り込み及び排泄トランスポーターの同定、  
寄与率の評価及び薬物間相互作用の予測

氏名 平野 雅

### [序論]

薬物の肝臓における代謝・排泄機構は、血管側から肝臓中への取り込み、肝臓内での代謝及び肝臓から胆汁中への排泄の各過程に支配されている。ヒト肝臓においても血管側膜、胆管側膜上にそれぞれ複数のトランスポーターの発現が認められている。

ピタバスタチンは強力に血清コレステロールを低下させる新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）である。ラットに標識体ピタバスタチンを経口投与することにより薬効標的臓器である肝臓に選択的に分布すること、ラット及びヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験においてピタバスタチンはほとんど代謝されないこと、またラットを用いた胆汁排泄試験において大部分が未変化体のまま胆汁排泄されることが報告されている。

本研究では、ピタバスタチンの肝取り込み及び排泄過程における分子メカニズムを明らかにするために、肝取り込みにおけるトランスポーターの同定、肝取り込みトランスポーターの寄与率の算出、肝排泄トランスポーターの同定を行い、また薬物間相互作用の可能性を評価するために、肝取り込みトランスポーターを介した薬物間相互作用の予測を行った。

## [本論]

### I. ピタバスタチンのヒト肝取り込み過程におけるトランスポーターの輸送特性及び肝細胞における取り込みトランスポーターの寄与率の評価

ヒト肝細胞においては、血管側に種々の取り込みトランスポーターの発現が認められている。その中でも特に、**Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B1** 及び **OATP1B3** はほぼ肝選択的な発現を示し、非常に広範な有機アニオン性化合物を認識することが報告されている。そこで有機アニオン性薬物の肝取り込み過程におけるトランスポーターの関与を、**OATP1B1**、**OATP1B3** 及び **OATP2B1** に焦点をあてて明らかにし、肝取り込み活性全体に占める両トランスポーターの寄与率を定量的に算出することを目的とした。方法としては、各トランスポーター発現細胞及びヒト肝細胞を用いて、既に報告されている **estrone-3-sulfate(E-sul)** 及び **cholecystokinin octapeptide(CCK-8)**、ならびに **OATP** ファミリートランスポーターの代表的基質である **estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide(E<sub>2</sub>17 $\beta$ G)**、新規評価化合物であるピタバスタチンの輸送特性を定量的に評価した。

トランスポーター発現細胞を用いた結果から、**E-sul** は **OATP1B1** 選択的に、**CCK-8** は **OATP1B3** 選択的に、**E<sub>2</sub>17 $\beta$ G** 及びピタバスタチンは **OATP1B1** 及び **OATP1B3** の両方に認識されることが確認された。ヒト肝細胞においても、ピタバスタチンは **E<sub>2</sub>17 $\beta$ G**、**E-sul** 及び **CCK-8** と同様にヒト肝細胞への取り込みが観察された。

肝取り込みトランスポーターの寄与率を定量的に評価することを目的として、ヒト肝細胞及びトランスポーター発現細胞を用いて、ヒトにおけるピタバスタチンの肝取り込みを担うトランスポーターの同定を行うとともに、寄与率の評価方法を考案し適用した。まずトランスポーター発現細胞と肝細胞における **OATP1B1**、**OATP1B3** 及び **OATP2B1** の発現量を **Western blot** 法を用いて直接的に比較することにより寄与率を評価した結果、**OATP2B1** の寄与は非常に小さく **OATP1B1** の寄与が大きいことが示唆された。次にヒト肝細胞とトランスポーター発現細胞において基準化合物 (**E-sul**(**OATP1B1** 選択的基質)および **CCK-8**(**OATP1B3** 選択的基質))の取り込み活性の相対的な比を用いて寄与率を評価する方法を確立し、ピタバスタチン及び **E<sub>2</sub>17 $\beta$ G** はともに **OATP1B1** の寄与が大きいことが示唆された。また肝細胞へのピタバスタチンの取り込みに対する **E<sub>2</sub>17 $\beta$ G** (**OATP1B1** 及び **OATP1B3** 阻害剤)及び **E-sul** (**OATP1B1** 及び **OATP2B1** 阻害剤) の阻害効果を観察し、ピタバスタチンの輸送は **E<sub>2</sub>17 $\beta$ G** 及び **E-sul** によりほぼ完全に阻害されたことから、肝取り込みに **OATP1B1** の寄与が大きいという結果が支持された。

以上より、肝取り込み過程における寄与率の評価法を複数考案し、ピタバスタチンにおいてすべての結果が肝取り込み過程における **OATP1B1** の重要性を示すに至った。

## II. ピタバスタチンの排泄過程を担うトランスポーターの同定

ピタバスタチンは、ラット及びヒト肝臓でほとんど代謝されず未変化体のまま胆汁排泄されると考えられるため、ピタバスタチンの胆汁排泄に関与するトランスポーターを同定することを目的とした。肝胆管側膜に発現する主なトランスポーターとして、**breast cancer resistance protein(BCRP)**、**bile salt export pump(BSEP)**、**multidrug resistance protein(MDR1)**、**multidrug resistance associated protein 2(MRP2)**が知られている。すでに同じ薬効を示すプラバスタチンは主に **MRP2** を介して胆汁排泄されることが当研究室での検討から明らかとされている。従って、まずピタバスタチンが **MRP2** の基質となることを明らかにするため、ラット **Oatp1b2/Mrp2** 共発現細胞を用いて経細胞輸送を測定したところ、ピタバスタチンがラット **Mrp2** の基質となることが明らかとなった。次に **Mrp2** の寄与を *in vivo* 実験にて評価する目的で、遺伝的に **Mrp2** を欠損している **Eisai hyperbilirubinemic rat(EHBR)** 及びそのコントロールである **SD** ラットに標識体ピタバスタチンを定速静脈内投与したところ、血漿中濃度、胆汁排泄速度及び胆汁排泄クリアランスに有意な差は認められなかったことから、基質にはなるが胆汁排泄における **Mrp2** の寄与は小さいことが想定された。次に **BCRP** の関与について検討するため、ヒト及びマウス **BCRP** 発現膜ベシクルを用いてピタバスタチンの取り込みを評価したところ、ヒト及びマウス **BCRP** の基質になることが明らかとなった。そこで胆汁排泄における **Bcrp** の寄与を *in vivo* 実験にて評価する目的で、**Bcrp** ノックアウトマウス及び野生型マウスにピタバスタチンを定速静脈内投与したところ、**Bcrp** ノックアウトマウスの胆汁排泄速度及び胆汁排泄クリアランスは野生型の 10 分の 1 未満であったことから、ピタバスタチンの胆汁排泄には主に **Bcrp** が関与していることが示唆された。一方、ヒトにおける排出トランスポーターの関与を調べる目的で、ヒト **OATP1B1** 及び **MDR1**、**MRP2** 並びに **BCRP** を共発現させた細胞を用いて経細胞輸送を測定しところ、ピタバスタチンは **basal** 側から **OATP1B1** によって細胞に取り込まれた後、**MDR1**、**MRP2** 及び **BCRP** によって効率的に **apical** 側に輸送されていることが示された。

同じスタチンであるプラバスタチンでは、**EHBR** を用いた研究から主に **Mrp2** が胆汁排泄に関与していることが明らかとされているが、以上の結果からアニオンとして初めてピタバスタチンがマウスにおいて主に **Bcrp** を介して胆汁中に排泄されることが明らかとなった。

## III. OATP1B1 を介したピタバスタチンの肝取り込み過程における薬物間相互作用の予測

本論 I の結果より、ピタバスタチンの肝取り込みには **OATP1B1** の寄与が大きいことが示唆された。そこで、ピタバスタチンの **OATP1B1** を介した肝取り込み過程における薬物間相互作用の可能性を評価するために、当研究室の伊藤らが過去に報告したモデルを用いて肝臓入り口付近の最大血中蛋白非結合型濃度 ( $I_{u,in,max}$ ) を計算し、*in vitro* 実験で得られた阻害定数 ( $K_i$  値) との比較から薬物間相互作用の程度を予測する方法を用いた。阻害剤としてスタチン系薬剤とすでに相互作用が報告されている薬物に加え、併用が予想される薬物を選択した。**OATP1B1** 発現細胞におけるピタ

バスタチンの取り込みに対する各種薬物の  $K_i$  値を算出した後、 $I_{u,in,max}$  を用いて、併用による AUC の上昇率の最大値として、 $1 + I_{u,in,max} / K_i$  の値を算出した。すでにヒト臨床においてピタバスタチンは cyclosporin A、gemfibrozil 及び fenofibrate において薬物間相互作用が検討されている。今回の結果はこれらの臨床報告を支持するものであった。また他のいくつかの薬物についても、OATP1B1 を介した薬物間相互作用を起こす可能性があることが示唆され、併用にあたり注意する必要があると考えられた。

#### [結論]

トランスポーター発現細胞及びヒト肝細胞を用いて、評価化合物の肝取り込みにおける各トランスポーターの寄与率を算出する方法として 3 つの異なるアプローチを提案し、それらを用いてピタバスタチンは主に OATP1B1 を介して肝に取り込まれることを示した。またピタバスタチンは同じスタチンであるプラバスタチンの排泄経路(MRP2)と異なり、マウスにおいては主に Bcrp を介して胆汁排泄されること、ヒトにおいては複数のトランスポーターを介して胆汁排泄される可能性があることが明らかとなった。ピタバスタチンの肝臓におけるトランスポーターの分子メカニズムが明らかにされたことにより、本薬剤の薬物動態的特性を説明付けることができた。さらに OATP1B1 を介したピタバスタチンの薬物間相互作用の可能性を予測し、数種類の薬剤に関しては临床上注意して併用を行う必要があることが示唆された。