

## [別紙 2]

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 伊 藤 元 貢

経口抗インフルエンザ薬である oseltamivir は、服用後の異常行動との因果関係の有無について特に我が国において最も注目されている薬物の一つである。これまで数多くの臨床及び基礎研究が報告されているものの、疫学調査からは未だ異常行動と服用との関連性について明確な結論は得られていない。また、動物モデルを用いた薬理試験においても異常行動と関連する有害事象は確認されていないのが現状である。Oseltamivir 服用後の有害異常が oseltamivir ないしその活性型分子である Ro64-0802 の中枢作用と仮定した場合、その作用標的分子の探索もさることながら、両化合物の末梢滞留性及びに中枢移行性を制御する分子機構の解明も極めて重要であると言える。しかしながら、oseltamivir の中枢移行性を担う P-糖タンパク (P-gp) や oseltamivir の代謝を担う carboxylesterase (CES) 1A1 については過去に明らかとされてきたが、Ro64-0802 の体内動態を制御するトランスポーターに関する理解は十分ではなかった。

申請者の伊藤は、oseltamivir 服用後の有害事象が極めて低頻度 (< 0.01 %) である点及び若年性のインフルエンザ罹患者に特に多く報告事例があることに注目し、両化合物の体内動態制御因子の機能変動が複数組み合わせることで、極めて限られた服用者集団においてのみ薬剤の末梢滞留性及び中枢移行性が亢進するのではないかと仮説を立てた。そして、*in vitro/in vivo* の種々の検討を行い両化合物の体内動態制御因子の同定を行った。さらに遺伝子変異を伴う機能変化に着目してコンピューターシミュレーションを行い、oseltamivir 及び Ro64-0802 の中枢暴露の個体間変動に関する解析を行った。

#### 1. Ro64-0802 の腎及び血液脳脊髄液関門における排泄過程に関与する分子機構の解明

Ro64-0802 はプロドラッグである oseltamivir から体内で合成された後、更なる代謝を受けることなくそのほとんどが尿中へと排泄される。Oseltamivir 経口投与後の Ro64-0802 の血漿中濃度は probenecid の併用によって有意に増加するが、これは Ro64-0802 の尿細管分泌過程を担うトランスポーターの機能阻害であると解釈できる。実際に、Ro64-0802 の腎取り込みに関与する分子として Organic anion transporter (OAT) 1 の関与が過去の報告から示唆されていた。しかし、申請者は Ro64-0802 が OAT1 の基質とはなるものの、他の OAT1 基質に比べて良好な基質ではない点に注目し、他のトランスポーターが Ro64-0802 の腎取り込みに関与しているのではないかと仮説を立て、詳細な解析を行った。申請者はまず、*in vitro/in vivo* の様々な手法を用いて、網羅的に両化合物の代謝及び膜透過過程に関与する代謝酵素・トランスポーターのスクリーニングを行った。その結果、Ro64-0802 を基質とするトランスポーターとして OAT3 をはじめとする複数のトランスポーターを明らかとした。その中で特に OAT3 は、probenecid に対する親和性が高いトランスポーターである。実際に OAT3 は臨床投与量下の probenecid の併用下において fexofenadine の腎クリアランスの低下に関与している分子として過去に報告がなされている。申請者は、Ro64-0802 の腎取り込みに関与するトランスポーターとして既知である OAT1 と OAT3 の相対的寄与率を算出し、Ro64-0802 の腎取り込みはほぼ OAT3 によって行われている(> 97%)

ことを明らかとした。実際に発現系における OAT3 を介した Ro64-0802 の取り込みに対する probenecid の  $K_i$  値は probenecid の臨床投与量下における最大非結合型血漿中濃度(12 - 52  $\mu\text{M}$ ) を下回る  $5.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$  であり、ヒト腎スライスにおける飽和性コンポーネントの  $\text{IC}_{50}$  値と比較してもほぼ一致した。申請者はさらに、排泄トランスポーターである Multidrug resistance associated protein (MRP) 4 と代謝酵素 CES 1A1 の共発現系を構築し、MRP4 が Ro64-0802 を基質とすることを明らかとした。また、OAT3、MRP4 の発現臓器である腎臓近位尿細管上皮細胞及び脈絡層上皮細胞において、Ro64-0802 のベクトル輸送に両トランスポーターが関与していることをそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いて明らかとした。マウスにおいては probenecid の併用下において、Ro64-0802 の腎クリアランスは低下しなかったが、このことはヒトと異なりマウスでは Ro64-0802 の尿細管分泌が占める腎クリアランスへの寄与が小さいためであると考えられる。過去の報告によれば、マウスにはヒトと異なり血漿中にて顕著な oseltamivir の加水分解酵素活性が検出されている。申請者は、oseltamivir の代謝過程のみならず Ro64-0802 の尿細管分泌過程においても、ヒトとマウスで種差があることを明らかとした。

## 2. Oseltamivir 及び Ro64-0802 の体内動態制御因子の遺伝子変異に伴う機能変化が及ぼす、両化合物の末梢並びに中枢暴露分布に関する検討

これまでの論文報告及び申請者の解析結果に基づくと、oseltamivir の主要な代謝臓器である肝代謝にはヒト CES1A1、Ro64-0802 のヒト腎取り込みには OAT3 が関与していること、P-gp が oseltamivir の、Oat3、Mrp4 が Ro64-0802 の脳移行性を制限していると言える。そこで申請者は上記 4 種類の因子に関して遺伝子変異に伴う機能変化を考慮し、oseltamivir 及び Ro64-0802 の末梢並びに中枢暴露の個体間変動がどのような分布を示すかについてコンピューターシミュレーションによる解析を行った。

申請者は、OAT3 の変異体 I175V 並びに A389V では細胞膜上に発現する機能タンパクあたりの輸送活性が野生型に比べ約 90% 低下することを、過剰発現系を用いた *in vitro* 実験より明らかにした。また、CES 依存的な oseltamivir の加水分解酵素活性がマウス脳からは検出されない一方で霊長類であるカニクイザル脳 S9 から認められることを明らかとした。そこで、CES1A1 依存的な oseltamivir の加水分解がヒト脳内においても生じていると仮定し、遺伝子変異に伴う機能変化を遺伝子頻度に従って組み込み、かつ血流速度や血中でのタンパク結合率といった種々のヒト PK パラメータに一定の CV 値に準じたばらつきを加味しながら、モンテカルロシミュレーションにより 50,000 件の異なる PK パラメータ群を算出し、仮想的な服用者集団を作りだした。そして、両化合物の末梢及び中枢暴露を示す数学モデルに代入することで 50,000 人規模の臨床試験に相当する計算を行った。その結果、本検討において oseltamivir の脳内暴露は CES1A1 や P-gp の単独ないし両方の遺伝子変異の影響によって平均値から 4~6 倍に増加しうるが、その増加頻度は比較的高い可能性 (50,000 人中数百~千人規模) が示された。一方で、Ro64-0802 の脳内暴露は主に OAT3、MRP4 の遺伝子変異によって平均値から 10 倍程度に増加し、その頻度は oseltamivir の場合に比べ低いものである (50,000 人中数人規模) 可能性が示された。臨床投与量の 2 倍に相当する 150mg の oseltamivir 単回経口投与後の oseltamivir 及び Ro64-0802 の最大脳脊髄液中濃度はそれぞれ 7.7nM、67nM であると報告されている。これに対し、oseltamivir 及び

Ro64-0802 のラット海馬スライスの異常発火を惹起する  $EC_{50}$  はそれぞれ 20  $\mu$ M、0.6  $\mu$ M 程度であると報告されている。薬物の脳脊髄液中濃度が脳実質内濃度の指標になると仮定した場合、特に Ro64-0802 については脳内濃度が 10 倍高い服用者集団ではラット海馬スライスにおいて異常発火を惹起した濃度になると考えられる。申請者の解析によって初めて、遺伝子変異による機能変化が複数組み合わせることによってきわめて低頻度であるが臨床投与量であっても中枢作用が生じる可能性が示唆された。

### 3. Oseltamivir 及び Ro64-0802 の中枢作用に関する検討

申請者は、oseltamivir 及び Ro64-0802 投与後の中枢作用に関して種々の解析を行った。マウス海馬脳波や両化合物の作用発現における神経ネットワークの有無の必要十分性、またサル大脳及び小脳凍結切片を用いた結合実験などを介して *in vivo* 及び *in vitro* 両方の観点から薬効ないし標的因子の探索を試みたが明確な作用は認められなかった。しかしながら、ヒトにおいても重篤であると考えられている副作用の一つであり、oseltamivir 投与後に観察される唯一の *in vivo* 毒性マーカーとして報告された体温低下作用について申請者は更なる検討を加えた。過去の報告によると、oseltamivir 投与後の体温低下は oseltamivir ではなく Ro64-0802 の作用であると推測されていた。しかし申請者は薬物動態学の視点から、体温低下作用の発現時における血漿及び脳・脳脊髄液中の薬物濃度を測定することを通じて、少なくともげっ歯類においては Ro64-0802 ではなく oseltamivir が体温低下作用を有することを明らかとした。

このように本研究は、我が国において最も注目を集めている薬の一つである oseltamivir について、単に薬物動態を制御するトランスポーターの同定のみには留まるものではない。Oat3 や Mrp4 が過去に報告のある血液脳関門に加え、腎臓や血液脳脊髄液関門といった複数の臓器において発現し、効率的なベクトル輸送を行うことで Ro64-0802 を中枢及び血液コンパートメントから排泄しているという発見は、薬物動態学的に新しい知見であると言える。また、Ro64-0802 の腎取り込み機構や体温低下作用の解析のように、申請者は過去の報告と異なる結果が得られた場合において独自のアプローチを通じて極めて論理的な説明をしている。さらに本研究は、遺伝子変異の組み合わせによって両化合物の中枢暴露の個体間変動の大きさを初めて定量的に解析した点で示唆に富んでいると言える。すなわち申請者は、oseltamivir 及び Ro64-0802 の体内動態を支配するトランスポーター群を明らかにすることで、遺伝子変異が複数重なることによって両化合物の血中及び脳内暴露が平均値から大きく外れる個体が存在することを示した。これまで個体間変動が議論される場合には平均値で議論されることがほとんどであるが、こうしたリスク評価では、ばらつきを含めて考慮することが必要である。このような研究手法は、将来の新薬の開発過程においてもヒトにおける安全性予測をする上で十分に活用しうる知見を含んでいると言える。

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。