

審査の結果の要旨

氏名 田 迎

一般的に、薬物の解毒に関与する主な臓器としては、肝臓と腎臓が挙げられるが、それぞれにおける解毒能力は、種々の薬物代謝酵素ならびに薬物トランスポーターの協調的な機能の総体として決定される。これまで代謝酵素については、数多くの遺伝子多型および薬物間相互作用と薬物動態との関連が臨床研究を通じて明らかにされてきた。近年、薬物トランスポーターについても、遺伝子多型と薬物動態の関連や、トランスポーターを介した薬物間相互作用を実証するための種々のヒト臨床試験によって、薬物動態を決定付ける要因としての重要性が認知されつつある。最近では、米国 FDA を中心とした **International Transporter Consortium** により、**Nature Reviews Drug Discovery** に「トランスポーター白書」と位置付けられる総説が発表されており、創薬プロセスの中で薬物相互作用試験の必要性の有無を判断する **decision tree** の提案などがされており、創薬の上で考慮すべき必要不可欠な因子の1つになっている。

これら分子の機能・発現の個人差は、薬物動態の個人差を生み出す要因として重要であることはいままでもない。これまで、遺伝子多型によりヒトを層別化することで、薬物動態の個人差の原因の一部を説明しうることが明らかにされてきている。しかしながら、同じ遺伝子型の群内においても依然として大きな個人差が見られるケースが多い。この原因の1つとして、薬物代謝酵素・トランスポーターの発現量の個人差が考えうる。例えば、種々の転写因子を介して、喫煙や食品中に含まれる物質など種々の環境要因や病態・年齢など様々な要因により mRNA 発現量が制御されることが知られている。非遺伝的要因による発現量の個人差を調べるためには、臓器をサンプリングして発現量を直接測定するしか方法がなく、ヒトにおいては適用が不可能である。従って、ヒト *in vivo* の状態での各分子の機能を、現実的に可能な低侵襲条件下でフェノタイピングできる方法論の開発が切望されている。

代謝酵素の領域においては、個々の CYP について分子種選択的な基質および阻害剤が同定されており、かつヒトにおいて臨床で投与可能な薬物群が知られている。さらに、ヒトに個々の代謝酵素の機能を反映する複数のプローブ薬を同時にカクテル投与した後、尿中に出現するそれぞれの代謝物の量を測定することで、ヒトにおける複数の代謝酵素の機能を一度にフェノタイピングすることも可能となっている。しかしながら、薬物トランスポーターについては、個々の取り込み・排出トランスポーター機能を反映した体内動態を示す選択的基質・阻害剤でかつヒトに臨床で投与可能な薬物群の探索は進んでおらず、ヒト *in vivo* でフェノタイピングするための手段がないのが現状である。

ヒト腎臓においては、血管側に **organic anion transporter (OAT)1, OAT3** と呼ばれる基質多選択的なトランスポーターが発現しており、有機アニオンの血液側から腎細胞への取込みを

担う重要な役割を担っていることが明らかとなっている。過去の検討から、トランスポーター基質について、トランスポーターによる取り込みが、腎クリアランス全体の律速段階になっているケースが多いことが想定されている。OAT 類は、頻度の高い遺伝子多型がほとんど存在しない一方で、ヒト腎臓における OAT 類の mRNA 発現量には大きな個人差があるという報告もされていることから、in vivo フェノタイピングによる機能評価は、腎クリアランスの個人差を考慮する上で有効な手段になりうると思った。

そこで本研究では、ヒト腎臓の OAT1, OAT3 の機能をヒト in vivo でフェノタイピングすることを目的として、それぞれのトランスポーターに対する選択的基質および選択的阻害剤となり、かつヒト臨床で適用可能な薬物を in vitro 実験や動物実験により探索すると共に、ヒト臨床研究を通じて、その妥当性について評価することを試みた。

1. in vitro 実験による OAT1, OAT3 選択的プローブ基質・阻害剤の選択性の検証

ヒト臨床において適用可能な OAT1, OAT3 の選択的基質となるプローブ基質薬物の候補として adefovir, PCG がそれぞれ用いられるかについて、OAT1, OAT3 発現 HEK293 細胞を用いた取り込み実験を行った。その結果、adefovir, PCG は、それぞれ OAT1, OAT3 を介した輸送のみが観察され、選択的な基質であることが示唆された。またヒト臨床研究において用いる阻害剤として、OAT1 の選択的阻害剤の候補として PAH が考えうるが、OAT3 の選択的阻害剤については、ヒト臨床での適用を考慮した場合見つけられなかったため、OAT1, OAT3 両方に対して強い阻害能を示す probenecid を次の臨床研究では用いることを考えた。PAH の OAT1, OAT3 に対する阻害定数(Ki)は、それぞれ $6.47 \pm 1.51 \mu\text{M}$ 、 $142 \pm 27 \mu\text{M}$ となり、PAH は、低濃度で OAT1 選択的な阻害をかけうることが示された。一方で、probenecid の OAT1, OAT3 に対する Ki 値は、それぞれ $3.99 \pm 0.80 \mu\text{M}$ 、 $3.53 \pm 0.73 \mu\text{M}$ となり、OAT1, OAT3 ほぼ同程度の阻害能で阻害することが明らかとなった。ヒト腎スライスを用いた、プローブ基質の取り込みに対する PAH, probenecid の阻害効果について検討を行ったところ、adefovir の取り込みに対して、PAH, probenecid による阻害強度はほぼ同じであったが、PCG の取り込みに対する PAH, probenecid の Ki 値は、それぞれ $499 \pm 226 \mu\text{M}$ 、 $3.00 \pm 0.61 \mu\text{M}$ となり、PAH の方が probenecid と比較してはるかに阻害能が弱いことが示された。これらの結果から、ヒト腎臓において、adefovir, PCG が OAT1, OAT3 選択的プローブとなりうることが示唆された。

2. OAT1, OAT3 のプローブ薬としての adefovir, PCG の利用に関する妥当性検証のためのヒト臨床研究

adefovir, PCG がそれぞれ OAT1, OAT3 の選択的基質薬物となること、また PAH, probenecid が、OAT1 選択的ならびに OAT1, OAT3 両方の阻害剤となることが示されたことから、ヒト in vivo でもプローブ基質・阻害剤として用いられるかについて検証するため、ヒト臨床研究を行った。健康人ボランティア 24 名を 4 群に分けて adefovir, もしくは PCG と、PAH もしくは probenecid を併用投与したときの adefovir, PCG の血中濃度推移の変動を観察した。その

結果、**adefovir** を基質薬物として投与した群については、**PAH**, **probenecid** 共に阻害剤の投与量依存的に血漿中 **AUC** の上昇が確認された。従って、**in vitro** 試験からの予想通り、**adefovir** は、**OAT1** 選択的なプローブ薬物として用いる可能性が考えられた。一方、**PCG** を基質薬物として投与した群については、**probenecid** については、投与量依存的な血漿中 **AUC** の上昇が認められたが、予想に反して、**PAH** と併用投与した場合においては、**PCG** の血漿中 **AUC** が減少した。この結果から、**probenecid** は、**PCG** の腎取り込み過程を阻害するものの、**PAH** は、**OAT3** を介した輸送で腎へ取り込まれる **PCG** の輸送を阻害せず、逆に再吸収過程を阻害した結果、腎クリアランスが上昇したことが推察された。

3. PCG の腎再吸収メカニズムに関する in vitro 実験による検討

PAH により阻害される **PCG** の腎再吸収メカニズムを探るべく、**in vitro** 実験を行った。腎臓の **apical** 側に存在するトランスポーターは複数同定されてはいるものの、薬物の再吸収に関わることが明確に示されているものはほとんどない。そこで候補として腎臓 **apical** 側に発現が確認されている **OAT4** と **URAT1** に着目し、発現細胞を用いた検討を行った。その結果、**PCG** は **URAT1** の基質にはならないが、**OAT4** の基質となることが明らかとなった。また、**PAH** は **OAT4** を介した **PCG** の輸送を阻害したことから、**PCG** が **OAT4** により再吸収され、**PAH** により阻害で再吸収が低下した結果、予期せぬクリアランスの上昇につながった可能性が推察された。但し正確に **PAH** の近位尿細管中の濃度を推定するのが困難であることから、**OAT4** が腎再吸収メカニズムであると断定するにはさらなる検討が必要であると考えられた。

以上のように申請者は、腎取り込みトランスポーター **OAT1**, **OAT3** の機能をヒト **in vivo** で見積もり可能なプローブ基質薬物としてそれぞれ **adefovir**, **PCG** が、また **OAT1** 選択的阻害剤として **PAH** が利用可能であることを、遺伝子発現細胞やヒト腎スライスを用いた **in vitro** 実験により実証した。さらに、ヒト臨床研究の結果、**adefovir** は、**OAT1** 選択的プローブとして用いることが示唆される結果を得たが、**PCG** については、**OAT3** の選択的基質でありながら、**PAH** との併用試験の結果、腎クリアランスにおける再吸収の関与が認められたことから、**PCG** が **OAT3** の選択的なプローブ薬物であると断定できないという結果を得た。

本研究は、個々のヒトトランスポーターの機能を **in vivo** で直接推定可能なプローブ薬物の探索を目指した研究であり、トランスポーター研究領域の最前線のトピックであることから非常に重要性の高い研究である。また、ヒト腎スライスを用いた **in vitro** 実験を通じて妥当性を確認した後、その結果を踏まえてヒト臨床研究を実施して候補となるプローブ薬物の長所・短所を明確にしており、研究デザインにもトランスレーショナルリサーチとしての一貫性が認められ、今後、他のトランスポーターを標的としたプローブ探索研究の雛形としても利用可能であり、極めて意義深い研究であるといえる。

よって、申請者を、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。