

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肝胆系輸送に関わる薬物トランスポーターの *in vivo* 機能
評価 PET プローブ 15R-[¹¹C]TIC-Me の開発

氏 名 高島 忠之

薬物トランスポーターは薬物の消化管吸収、組織分布および排泄に働くことから、その機能変動は、薬物の体内動態の変動、薬効・副作用発現の個人差の一因となりうる。生体内の主要な異物解毒臓器の1つである肝臓には、肝実質細胞の血管側膜、胆管側膜に取り込み・排泄トランスポーター群が適切に配置されており、血液から胆汁方向への効率的な方向性輸送が達成されている。肝胆系輸送の変動要因を解明するためには、血管側・胆管側それぞれの膜上での輸送能力を定量的に分離評価することが求められる。そのためには、組織中濃度の時間推移の測定が不可欠であるが、ヒト *in vivo* においては、従来型の非標識体薬物を用いた解析では実現できない。一方、近年、Positron Emission Tomography (PET)などの分子イメージング技術により、ヒトにおける組織中の薬物濃度の時間推移の測定が可能になりつつあり、血液脳関門におけるP糖タンパクの機能評価など、薬物動態研究では、薬物の中枢移行に関わる研究を中心に、ヒトでの応用が進んできている。しかしながら、肝胆系輸送などの薬物の排泄に関わる過程については、方法論の確立、各トランスポーターに選択的基質で機能評価を可能とするPETプローブの探索が必要である。

本研究では、*in vivo* で肝胆系輸送における素過程（取り込みおよび排出）を定量的に評価する手法の開発を目的とし、スタチンやサルタン類など臨床医療上汎用される医薬品を広範に基質とする肝胆系輸送に関わるトランスポーターとして、肝取り込みトランスポーターOATPs (organic anion transporting polypeptides (OATP1B1, 1B3))および胆汁排泄トランスポーターMRP2 (multidrug resistance-associated protein 2)に着目し、候補PETプローブを用いて、これらの機能解析を行うための評価法の開発を試みた。本研究に用いた候補PETプローブは、理化学研究所等で開発されたプロスタサイクリン受容体(IP₂)に強い親和性を持つ、(15R)-16-m-[¹¹C]tolyl-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin methyl ester (15R-[¹¹C]TIC-Me)を用いた。本プローブは、すでに中枢神経機能イメージングを目的とし

たヒト試験の実績があり、本研究目的のためのヒト臨床 PET 試験もすぐに実行可能な状態にあった。15R-[¹¹C]TIC-Me は、血中などに存在するエステラーゼにより速やかに加水分解を受け、アニオン性を示すカルボン酸基を持つ 15R-[¹¹C]TIC へと変換される。その後、放射能は主に胆汁排泄、尿排泄される。東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室北村らの解析により、15R-TIC は、肝血管側膜上に存在する取り込みトランスポーター OATP1B1 と OATP1B3 の基質であること、胆管側膜上の排出トランスポーター MRP2, MDR1 (multidrug resistance 1) の基質となることが確認され、これらトランスポーターが、15R-[¹¹C]TIC の肝胆系輸送に関与していることが示唆されている。

そこで、まず始めに本研究では、げっ歯類を用いた薬物トランスポーターの *in vivo* 機能解析のための PET 基礎評価を行い、15R-[¹¹C]TIC-Me を用いて、肝胆系輸送の素過程にあたる Oatp トランスポーターを介した肝取り込み、並びに主に MRP2 を介した胆汁排泄過程の速度論パラメータを定量的に *in vivo* で評価するための方法論の確立を行った。15R-[¹¹C]TIC-Me をラットに静脈内 bolus 投与後、正常ラットでは、投与後初期では放射能が主に肝臓、腎臓に分布し、その後、排泄（投与後 90 分では投与量の 50% が胆汁排泄）され、腎排泄の寄与は小さかった。加えて、MRP2 変異欠損ラットでは、放射能の肝胆系輸送による排泄は顕著に低下した一方、尿排泄が著しく増加し、投与後 90 分までの放射能の血液中濃度-時間曲線下面積(AUC)が正常ラットの約 3 倍に増加していた。ラット組織中の放射性代謝物と親化合物の分離定量の結果、15R-[¹¹C]TIC-Me は、ラットに静脈内 bolus 投与後、速やかに 15R-[¹¹C]TIC へと変換され、その後も更に代謝が進み、少なくとも 3 種類の放射性代謝物 (M1, M2, M3) が存在し、これらの代謝物は、脱エチル体、グルクロン酸を含む構造と推定された。投与後初期の血中、組織中放射能を用いた integration plot 法により、肝取り込みクリアランスを算出したところ、正常ラットでは肝血流速度の 7 割程度であり、腎取り込みクリアランスの 6-7 倍大きいことが明らかとなった。一方、肝臓中放射能および胆汁排泄された放射能を用いた integration plot 法により求めた胆汁排泄固有クリアランスは、総放射能を用いた値 ($CL_{int,bile,RA}$) では、正常ラットと MRP2 変異欠損ラットで約 7 倍の差が見られ、代謝物 M3 に対して算出した値 ($CL_{int,bile,M3}$) は、 $CL_{int,bile,RA}$ よりも大きく、正常ラットと MRP2 変異欠損ラットでは約 8 倍の差を示しており、代謝物 M3 の胆管側への排出輸送は、主に MRP2 を介した胆汁排泄能の有用な指標になると考えられた。更に、北村らの解析により、ラット遊離肝細胞を用いた 15R-[³H]TIC の取り込み輸送評価を行ったところ、15R-[³H]TIC のラット肝細胞への取り込みは飽和性を示し、OATPs 阻害剤であるリファンピシンによる阻害が見られた。加えて、ラット MRP2 発現膜ベシクルを用いた 15R-TIC と主代謝物の *in vitro* 輸送試験を行ったところ、15R-TIC 代謝物 M2, M3 については、ラット MRP2 発現膜ベシクルへの ATP 依存的な取り込みが見られ、MRP2 基質となることが確認された。

以上から、15R-[¹¹C]TIC は、Oatps, MRP2 の基質であり、PET 画像解析により、同一ラット個体において、肝胆系輸送を中心とした *in vivo* における膜透過輸送の速度論パラメータの定量的評価法を確立することができ、更に、MRP2 の欠損に伴う胆管側の排出輸送の機能低下も検出することができた。

次に、ヒトでの肝胆系輸送評価の PET 試験を行い、肝臓、腎臓への分布、胆汁排泄における放射能の時間推移データを求め、最終的には、非侵襲的に肝取り込みクリアランス、胆汁排泄固有クリアランスを測定した。健康人男性被験者に対して baseline 条件（リファンピシン非併用時）と、リファンピシン併用条件の 2 条件で PET 試験を行うクロスオーバー試験として実施した。15R-[¹¹C]TIC-Me をヒトに静脈内 bolus 投与後、baseline 条件では、投与後初期は放射能が肝臓、腎臓に分布し、その後、

胆管・胆嚢への集積が認められた。一方、600 mg リファンピシン併用条件においては、放射能の肝臓への分布、胆汁中への排泄量が低下したが、腎臓への分布は変化しないことが明らかとなった。この時、血中放射能濃度は、投与後 30 分までの AUC において、リファンピシン併用により約 1.5 倍に上昇した。15R-¹¹C]TIC-Me の投与一定時間後に採血したヒト血液、ヒト肝細胞と 15R-¹¹C]TIC-Me をインキュベーションした後の medium について、放射性代謝物と親化合物の分離定量を行ったところ、15R-¹¹C]TIC-Me は投与後 2 分以内に 15R-¹¹C]TIC へと変換され、投与後 10 分は主として 15R-¹¹C]TIC として存在した。その後も更に代謝が進み、少なくとも 4 種類の放射性代謝物が生成する可能性が示された。これらの代謝物は、ラット組織中でも検出された代謝物である、脱エチル体、グルクロン酸抱合体等を含むことが推定された。CL_{uptake,liver} の算出には、主に血中放射能が 15R-¹¹C]TIC として存在している時間帯（投与後 2 分から 10 分の間）のデータを用いたところ、ヒトにおいて CL_{uptake,liver} は、血流速度の 5-8 割程度であったが、リファンピシン併用により有意な低下がみられた。総放射能を用いた胆汁排泄固有クリアランス(CL_{int,bile})は、リファンピシン併用により有意に低下した。更に OATP1B1、OATP1B3 を介した 15R-TIC の取り込みに対するリファンピシンの阻害定数(K_i 値)は、それぞれ 0.62 μM, 0.39 μM であり、600 mg 経口投与後のヒト門脈血中蛋白非結合型濃度の推定値(0.87-6.4 μM)より小さかった。加えて、MRP2 を介した 15R-TIC 代謝物輸送に対するリファンピシンの阻害効果については、脱エチル体の OATP1B1/MRP2 共発現細胞における apical 側膜の透過クリアランスに対する、リファンピシンの IC₅₀ 値(5 μM、細胞濃縮率を 1 と仮定した場合)は、600 mg 経口投与 1 時間後の肝臓中蛋白非結合型濃度の推定値 (33-243 μM) より小さく、トランスポーターを介した胆管膜側の薬物相互作用が起こっていることが期待された。

以上の結果より、15R-¹¹C]TIC-Me を用いた PET 画像解析により、肝胆系輸送を中心とした放射能の組織移行、胆汁排泄量の時間推移の解析、肝取り込みクリアランス、胆汁排泄固有クリアランスの分離評価が、ヒトにおいても可能であることが示された。更に、リファンピシン併用により、放射能の肝取り込みクリアランス、胆汁排泄固有クリアランスの低下が見られ、PET 評価にて、薬物間相互作用における各素過程の寄与の定量的な評価が可能であることを、ヒト試験で実証することができた。

本研究により、PET 分子イメージング法を用いて、*in vivo* において、PET プローブの肝取り込み過程、胆汁排泄過程それぞれの輸送能力の定量的な分離評価が可能であることを明らかにした。PET プローブ 15R-¹¹C]TIC-Me は、OATPs (OATP1B1, OATP1B3)を介した肝取り込み、MRP2 を介した胆汁排泄機能の定量的な評価に有用であり、リファンピシンによる薬物相互作用のメカニズムとして、OATPs を介した肝取り込み過程に加えて、胆汁排泄過程では MRP2 を含む排出トランスポーターの阻害が原因であることをヒトで実証することができた。今後、創薬研究に本評価を応用することで、OATPs や MRP2 を介した輸送のヒト *in vivo* フェノタイピングにより、薬物相互作用や遺伝子多型に起因する輸送機能の変動や個人差の評価が可能となり、個別化薬物療法に向けた新たな情報提供ができる可能性が考えうる。更に、これらの情報を、*in vitro* 実験データからの予測のバリデーションに用い、より良い予測法の確立に貢献できること、また、本研究で確立した評価法を、他のトランスポーターの機能評価にも応用することで、各トランスポーターの *in vivo* における機能の定量的な役割がより明確となり、体内動態的に優れた医薬品開発のための創薬研究が進むことを期待している。