

審査の結果の要旨

氏 名 高 島 忠 之

近年、新薬開発において、費用および期間は増大している一方で、その成功確率は年々低下する傾向にある。過去に新薬のドロップアウトの主原因の1つであったバイオアベイラビリティ、血中薬物動態の悪さは、薬物動態スクリーニング系の導入により改善されつつあるが、薬物の組織移行の関与が考えられる安全性、薬効の問題が、現在ではドロップアウトの主原因の1つとなってきた。このため、メカニズムに基づき薬物動態、薬効、毒性を精度高く予測することで、医薬品臨床開発の成功確率を向上できることが期待されている。

本研究では生体内の主要な異物解毒臓器である肝臓に着目した。肝臓で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それぞれ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。トランスポーターの機能変動は、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と考えられており、肝胆系輸送におけるトランスポーターを中心とした変動要因の解明には、血管側・胆管側それぞれの膜上での輸送能力を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り、申請者は、Positron Emission Tomography (PET)を用いた分子イメージング技術に着目した。これまで、分子イメージング技術により、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たが、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の機能評価を可能とするPETプローブの探索が必要であった。そこで、*in vivo*で肝胆系輸送における素過程を定量的に評価する手法の開発を目的とし、臨床医療上重要な医薬品を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 organic anion transporting polypeptides (OATPs; OATP1B1, 1B3) および胆汁排泄トランスポーター multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) に着目し、既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るPETプローブ (15R)-16-m-¹¹C]tolyl-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin methyl ester (15R-¹¹C]TIC-Me) を用いて、これらの機能解析を行うための評価法を開発を試みた。

15R-¹¹C]TIC-Me は、血中などに存在するエステラーゼにより加水分解を受け、アニオン性を示す15R-¹¹C]TICへと変換され、その後、放射能は主に胆汁排泄、尿排泄されること、また15R-TICはOATP1B1とOATP1B3に加えMRP2やMDR1の基質となることが確認されており、申請者はこれらの利点をもつ本PETプローブを活用し、各トランスポーターの*in vivo*機能評価に応用することを試みた。

第1章では、 $15R-[^{11}C]TIC-Me$ を用いた PET 画像解析により、肝胆系輸送を中心としたトランスポーターの機能解析がヒトにおいても実現できる可能性について、実験動物を用いて基礎検討を行った。PET 画像解析により、 $15R-[^{11}C]TIC-Me$ をラットに静脈内 bolus 投与後、正常ラットでは、放射能が主に肝胆系輸送により排泄されていたが、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、尿排泄が著しく増加していたことが示された。PET では放射能を検出しているため、投与した化合物と代謝物、分解物の存在比を分離して評価することができない。そこで申請者は、PET 試験と並行して組織中の放射性代謝物と未変化体の分離定量を別途行い、 $15R-[^{11}C]TIC-Me$ は、ラットに投与後、速やかに $15R-[^{11}C]TIC$ へと変換され、その後も更に代謝が進み、少なくとも3種類の代謝物 (M1, M2, M3) が存在することを示した。更に LC-MS/MS を用いた解析により、これらの主代謝物の構造推定も行った。次に、integration plot 法により、肝取り込みクリアランス、胆汁排泄固有クリアランス ($CL_{int,bile,RA}$) を求めており、上記に行った代謝物解析の結果をもとに、主代謝物 M3 に対する胆汁排泄固有クリアランス ($CL_{int,bile,M3}$) を算出したところ、正常ラットと Mrp2 変異欠損ラットでは有意な差を示し、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うることを考察した。当教室北村らの解析によると、 $15R-[^3H]TIC$ 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。本研究でのラット Mrp2 発現膜ベシクルを用いた $15R-TIC$ と主代謝物の *in vitro* 輸送試験により、 $15R-TIC$ 代謝物 M2, M3 は Mrp2 の基質となることを *in vitro* 輸送試験からも確認し、PET 試験の裏付けも行った。以上から第1章では、申請者は $15R-[^{11}C]TIC$ は Oatps, Mrp2 の基質であり、PET 画像解析により同一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し、更に本法の適用により Mrp2 の欠損に伴う胆管側の排出輸送の機能低下の検出も可能であることを示した。

第2章においては、PET を用いた解析をヒト試験へと応用し、ヒトにおける肝胆系輸送の速度論的評価を行った。試験デザインには、健常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を採用し、リファンピシン併用による影響を解析した。 $15R-[^{11}C]TIC-Me$ をヒトに静脈内瞬時 bolus 投与後、PET 画像解析により、baseline 条件では放射能は肝胆系輸送により主に排泄されていることを明らかにしており、600 mg リファンピシン併用により、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を示した。加えて、申請者はヒトにおいても放射性代謝物と未変化体の分離定量を行っており、 $15R-[^{11}C]TIC-Me$ は投与後2分以内に $15R-[^{11}C]TIC$ へと変換され、投与後10分は主として $15R-[^{11}C]TIC$ として存在していること、またヒト凍結肝細胞を用いた試験により、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ことも明らかにした。LC-MS/MS を用いた主代謝物の構造推定も行い、ラット組織

中でも検出された 15R-TIC の主代謝物がヒトにおいても検出されることも示した。得られた代謝物解析の情報をもとに、15R-[¹¹C]TIC の肝取り込みクリアランス($CL_{\text{uptake,liver}}$) の算出、総放射能量を用いた胆汁排泄固有クリアランス($CL_{\text{int,bile}}$)の算出を行い、リファンピシン併用によりこれらの値の有意な低下がみられた。更に肝取り込み過程の相互作用の考察のため 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)と、PET 試験で行った 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との比較を行った。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も、主代謝物の OATP1B1/MRP2 共発現細胞における apical 側膜の 15R-TIC 代謝物の透過クリアランスに対するリファンピシンの IC_{50} 値と、600 mg 経口投与後のリファンピシン肝臓中蛋白非結合型濃度の推定値とを比較した。その結果トランスポーターを介した血管膜側と胆管膜側のそれぞれの過程において、リファンピシンとの薬物相互作用が起こっている可能性が高いことを考察した。特に胆管膜側における薬物トランスポーターを介した薬物間相互作用を、ヒト *in vivo* において捉えることができたことは初めての事例であり、極めてインパクトのある結果と考えられた。

以上から、申請者は本研究により、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において実証した。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、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が期待できる。このため、本研究成果は創薬段階におけるヒト薬物動態予測の精度向上、ひいては個人差の小さく、安全性の高い医薬品の創製に関わる研究に貢献するものであり、申請者に博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。