

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 澄人

医薬品の体内動態は、薬効ターゲットへの医薬品暴露を支配することで薬効・有害作用発現に影響を与える重要な要因である。近年、薬物を基質とするトランスポーターが次々と同定・機能解析され、薬物の組織分布ならびに排泄経路の支配要因となることが明らかにされている。腎臓は生体内における主要な異物排泄臓器の1つであり、糸球体ろ過に加え近位尿細管における薬物輸送（尿細管分泌）により、尿中へと医薬品を排泄する。経口糖尿病治療薬である **metformin** などの分子量が比較的小さく水溶性の高いカチオン性薬物（I型有機カチオン）の尿細管分泌に関しては、血中から細胞内への薬物の取り込み過程については、**organic cation transporter 2 (OCT2)** が種々の有機カチオンの腎取り込みに寄与していることが明らかとなっている。一方、尿細管上皮細胞内から管腔側への排出過程には、腎刷子縁膜ベシクルを用いた解析より **H⁺勾配** を駆動力とする交換輸送体の関与が示唆されてきた。近年、その候補トランスポーターとして **multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1)** および **MATE2-K** が同定された。**MATE1** および **MATE2-K** は多くのI型有機カチオンを含む広範な化合物を基質とすることから、その薬物動態における重要性に大きな関心が寄せられている。医薬品の体内動態特性を論理的に説明するため、また、トランスポーターを介した薬物相互作用を理解する上で、これらトランスポーターの薬物動態学上の重要性を解明することは、重要な課題である。

申請者である伊藤は、本研究において医薬品の腎排泄における **MATE** の重要性を明らかにすることに取り組んだ。本論文は二章から構成されており、第一章では、伊藤が修士課程において見出した **MATE** 選択的阻害剤 **pyrimethamine (PYR)** を用いて、健常人を対象に **metformin** と **PYR** の薬物相互作用試験を行い、臨床データを収集した。第二章では **metformin** 以外にも **MATE** によって尿中へ排泄される薬物群を明らかにするため、腎排泄における **cimetidine** とカチオン性薬物との薬物間相互作用に注目した解析を行った。**PYR** を用いた臨床研究および **MATE** が関与していると思われる **cimetidine** との相互作用データに基づいて、ヒト薬物動態、特に腎臓内動態における **MATE** の重要性を明らかにした。以下に研究の概略を示す。

1. 医薬品開発で使用できる **MATE** プローブ基質および阻害剤の確立

抗マラリア薬である **PYR** を臨床投与量服用後の血漿中非結合型濃度（200 nM）は **MATE** に対する阻害定数 (K_i) (**MATE1**: 77 nM、**MATE2-K**: 46 nM) よりも大きい、**OCT2** (10 μ M) に対する K_i 値よりもはるかに小さい点に着目し、**PYR** は薬物の体内動態における **MATE** の重要性を評価することができるプローブ阻害剤になり得るという仮説を立て、詳細な解析を行った。そこで、申請者は **Mate1** ノックアウトマウスや **PYR** を用

いたマウス相互作用試験により、尿細管分泌過程に *Mate1* が関与していることが明らかとなつている *metformin* を MATE のプローブ基質として選択し、PYR との相互作用試験を行った。MATE 発現細胞による *metformin* の取り込みは PYR により強力にかつ競合的に阻害され、用いる基質によらず PYR は MATE を介した輸送を選択的に阻害することができることを明らかにした。健常人男性ボランティアを対象に、PYR 非投与および前投与 (50 mg, po) し、マイクロドース量 (100 μg) および臨床投与量 (250 mg) の *metformin* を経口投与し、クロスオーバー比較試験を行った。その結果、PYR 投与群では *metformin* の腎クリアランスがマイクロドースと臨床投与量でそれぞれ 23 %、35 %減少した。

Metformin は被験者に投与する必要があるが、内因性代謝物を利用することで、被験者にプローブ薬を投与することなく、トランスポーター機能評価を実現することができる。そうした内因性代謝物を同定するため、既知内因性代謝物の腎排泄に対する PYR による阻害効果を検討した。その結果、*creatinine* の腎クリアランスが 16 %減少し、血漿中濃度の上昇がみられた。H⁺勾配存在下でのヒト腎刷子縁膜ベシクル (BBMV) への NMN の取り込みは飽和性 (K_m 360 μM) を示し、PYR により完全に阻害された。さらに、*metformin* により競合的に阻害されたことから、腎刷子縁膜における H⁺/NMN 交換輸送の大部分は、MATE が担っていることが示唆された。健常人男性における NMN の腎クリアランスは PYR 投与により 69 %減少し、糸球体ろ過速度まで低下したことから、NMN の腎刷子縁膜側の排出輸送の大部分は MATE で説明できることが示唆された。本結果は、NMN が MATE 機能を評価するためのプローブとして、有用であることを示している。

2. Cimetidine による薬物間相互作用機構の解明

これまで、*cimetidine* による腎排泄における薬物間相互作用のメカニズムは、腎取り込み過程に働く OCT2 の阻害だと考えられてきた。*In vitro* で測定された阻害定数と臨床投与量での実効濃度の比較に基づくと、OCT2 阻害では説明できない。ただし、文献調査の結果、*in vitro* 輸送実験に用いる基質により、 K_i 値が異なる可能性もある。そこで申請者は、複数の基質を用いて有機カチオントランスポーターに対する *cimetidine* の阻害能について検討した。5 種類の OCTs および MATEs 基質を選択し、OCTs/MATEs 強制発現細胞による取り込みに対する *cimetidine* の阻害効果を検討したところ、OCT2 に対する K_i 値は 92~146 μM であり、臨床投与量 (400 mg b.i.d) 服用後の非結合型最高血漿中濃度 (3.6~7.8 μM) に比べはるかに大きかった。一方で、MATE1 および MATE2-K に対する K_i 値はそれぞれ、1.1~3.8、2.1~6.9 μM であり、臨床における *cimetidine* の相互作用部位は OCT2 ではなく MATE であることを明らかとした。同様の傾向がマウス Oct1 (mOct1)、mOct2、mMate1 でもみられ、20 μM の *cimetidine* は、マウス腎スライスへの *metformin* の取り込みに影響を与えなかった。

マウス *in vivo* で MATE 選択的阻害剤である PYR と *cimetidine* の阻害効果を比較したところ、両阻害剤により *Mate1* を介した尿細管分泌を受けることが明らかとなつている

metformin・TEA・cephalexinに加え、amiloride・ranitidine・sulpiride・ASP・rhodamine 123・MIBGの腎/血漿中濃度比の上昇がみられた。Cimetidineによる阻害効果はPYR投与時と同程度であり、PYRとcimetidine併用により相乗効果も認められなかったことから、両阻害剤は同じターゲット、Mate1を阻害していることを明らかとした。生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を用いて、マウス腎臓においてPYRの阻害効果を検討したところ、PYR投与により、近位尿細管上皮細胞においてASPの蛍光強度が増強されており、PYRとの相互作用が、Mate1が局在する部位で生じていることを明らかにした。

以上のように申請者は、ヒト腎臓においてMATEが種々カチオン性薬物ならびに内因性代謝物の尿中排泄に関与していること、cimetidineによる薬物間相互作用メカニズムがMATE阻害であることを明らかにした。薬物に加えて、MATE機能を反映した内因性プローブ基質を見出したことは、プローブ薬を投与しなくても、トランスポーター機能の評価が可能であり、医薬品開発において薬物間相互作用リスクを早期に評価する上で非常に有用である。MATEを介した薬物間相互作用では、血漿中濃度より、組織中濃度に与える影響が大きく、血中動態に変動が見られないことから薬効レベルでの相互作用と分類されてきたものの中に、薬物動態的な相互作用が潜んでいる可能性を示した。本研究の成果により、FDAの薬物間相互作用ドラフトガイダンスに、MATEも追加される予定である。上記の通り、本研究で得られた知見は、薬物動態におけるMATEの重要性を示すとともにより安全性の高い医薬品の開発に貢献するものであり、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。