肝トランスポーターを介した薬物相互作用の予測およびそのバイオマーカーに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邉, 将規, Watanabe, Masaki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42297

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

博士論文要旨

肝トランスポーターを介した薬物相互作用の予測およびそのバイオマーカーに関する研究

Analysis and Prediction of Drug-Drug Interaction on Hepatic Uptake Transporter OATP

金沢大学大学院 自然科学研究科
生命科学専攻

学籍番号　：0923032524
氏名　　：渡邉 将規
指導教官　：玉井 郁巳
提出日　　：2015 年 1 月 8 日

Since drug-drug interaction (DDI) on hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) affect safety of drugs, prediction of such DDI is important in early clinical development. In this study, we investigate the possible use of cynomolgus monkey as a model animal for predicting OATP-mediated DDI. In addition, we investigate the possible use of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), an endogenous OATP substrate, as a biomarker for predicting OATP-mediated DDI in cynomolgus monkeys as a first step toward in human assessment.

In in vitro experiments indicated that OATPs were involved in heptic uptake of drugs such as rosuvastatin in cynomolgus monkey as well as human. In in vivo experiments, the area under the plasma concentration-time curve (AUC) and maximum plasma concentration (C_{max}) of rosuvastatin were significantly increased by sumultaneous administration of rifampicin (RIF) at a dose of 10 mg/kg as an OATP transporter inhibitor. These results suggested that cynomolgus monkey is useful in assessing OATP-mediated DDI.

In vitro hepatic uptake experiments in both of human and cynomolgus monkey showed a time- and temperature-dependent DHEAS uptake. RIF inhibited uptake of DHEAS, indicating an involvement of OATP in DHEAS uptake. In vivo experiments in cynomolgus monkey showed that AUC and C_{max} of DHEAS after oral administration were significantly increased by coadministration of RIF 10 mg/kg. This result shows for the first time that DHEAS could be used as biomarker for predicting OATP-mediated DDI.

複数の薬剤が処方される臨床現場において、その組み合わせによっては薬物相互作用（Drug-Drug Interaction、DDI）により薬効の減弱、時には増大によって重篤な副作用が発症する場合がある。DDI の原因として薬物代謝酵素の阻害または誘導が注目されていたが、近年、トランスポーターを介した臨床 DDI が多数報告されるようになり、医薬品開発においてトランスポーターが関与する DDI の評価は必須の項目となっている。その中でも特に OATP を介した DDI が血漿中濃度上昇による重篤な副作用の原因になることがあり、OATP 上での DDI を予測することが重要である。

OATP は小腸、肝臓、腎臓、脳などの細胞膜に発現し、内因性化合物や薬物の細胞内への取り込みを担う薬物トランスポーターである。OATP ファミリーの中でも特に OATP1B1 と OATP1B3 は DDI や遺伝子多型によって、その基質となる薬物の体内動態が大きく変化する例が報告されたことで、薬物動態・薬効・毒性の決定因子として注目されている。OATP1B1 と OATP1B3 はともに肝臓の血管側膜に発現する 12 回膜貫通型の取り込みトランスポーターであり、ステロイドホルモン代謝物や胆汁酸、甲状腺ホルモンといった内因性化合物や HMG-CoA 還元酵素阻害剤、グリニド系糖尿病治療薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬といった薬物の肝取り込みに寄与していると考えられている。OATP を介した DDI の検討ついて、アフリカツメガエル卵母細胞や HEK293 細胞を用いた OATP 発現系など *in vitro* の試験系が報告されているが、これら試験系は薬物の体内動態の理解や DDI のメカニズム解明に役に立つものの、定量的な DDI の予測精度は高くない。定量的な DDI 予測には *in vitro* から *in vivo* をつなぐ手段が必要であり、ヒトでの DDI を予測可能な *in vivo* モデルが必要と考えられる。

以上のような背景からヒト OATP1B1 および OATP1B3 と相同性が高い分子を発現するカニクニイザルが、ヒト DDI 予測のモデル動物として有用であるかを評価するとともに、OATP の内因性基質である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)に着目し、その OATP を介した DDI 予測バイオマーカーとしての有用性を検討した。

最初にヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて OATP 基質の取り込みを測定し、ヒトと

カニクイザルの肝取り込みの種差について明らかにした。カニクイザルとヒトの間でOATP1B1 および OATP1B3 の遺伝子配列並びにアミノ酸の配列相同性が高いことが報告されているものの、肝に発現する OATP1B1 および OATP1B3 の基質認識性や発現量などヒトとカニクイザルの種差については十分に研究されていない。そこで、OATP の基質として報告されている atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin 、estradiol 17β-D-glucuronide、および estrone sulfate のヒトおよびカニクイザル肝細胞への取り込みを測定した。各基質の[^{3}H]標識体と肝細胞（1.0×10^6 cells/mL）を 37℃または 4℃でインキュベーションし、0.5 分または 2.0 分後にオイルレイヤー法により反応を停止した。肝細胞中の放射能量を液体シンチレーションカウンターで測定し、肝細胞中の放射能量（dpm/10^5 cells)を反応溶液中の放射能濃度（dpm/mL）で除し、10^6 cells 肝細胞当たりの取り込み量（μL/10^6 cells）として算出した。今回用いた OATP 基質はヒトの OATP1B1 や OATP1B3 の基質であり、OATP1B1 や OATP1B3 などのトランスポーターを介して肝細胞に取り込まれることが知られている。カニクイザルにおいてもヒトと同様にそれらトランスポーターを介した肝取り込みが示唆された。トランスポーターを介した肝取り込みクリアランスはヒトとカニクイザル肝細胞との間で高い相関性（R^2=0.9888）を示したことから、OATP 基質はカニクイザルにおいても OATP1B1 や OATP1B3 などヒトに類似した取り込み機構の存在が示唆された。[^{3}H]Pravastatin をのぞき、初期取り込みクリアランス値はカニクイザルの方が高かった（Table. II-1）ことから、カニクイザルの方がヒトよりも OATP1B1 や OATP1B3 などの発現量が高いもしくは OATP 基質に対して親和性が高いことが考えられた。

次に rosuvastatin を OATP のモデル基質として選択し、同様の手法によりヒトおよびカニクイザル肝細胞へのトランスポーターを介した取り込みを評価した。その結果、カニクイザルにおいてもヒトと同様に経時的な肝取り込みが認められ、トランスポーターを介して取り込まれることが示唆された。またその肝取り込みは OATP を阻害することが知られている gemfibrozil、clarithromycin、eltrombopag、rifamycin、sulfobromophthalein に

より阻害された。さらに、OATP 阻害薬として用いた RIF により濃度依存的な取り込み低下が認められたことから、rosuvastatin のカニクイザルの肝細胞における取り込みはヒトと同様に OATP1B1/1B3 によるものと考えられた。

In vivo 試験において、カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した DDI の評価モデル動物として利用可能かどうかを検討するために、カニクイザルにおける rosuvastatin の体内動態に与える RIF の影響をクロスオーバー試験により評価した。まず、5 mg/kg の rosuvastain を単独で雄のカニクイザル 4 匹に単回経口投与し、13 日間の休薬期間を経て、同じカニクイザル 4 頭に 5 mg/kg の rosuvastain と 10 mg/kg の RIF を単回経口投与した。経時的に採血し、LC-MS/MS を用いて rosuvastatin の血漿中濃度を測定した。Rosuvastatin 単独投与群（Control）に比べ 10 mg/kg の RIF を併用した群で C_{max} は約 6.6 倍上昇（$p = 0.053$）し、AUC は約 3.5 倍上昇（$p < 0.05$）した。

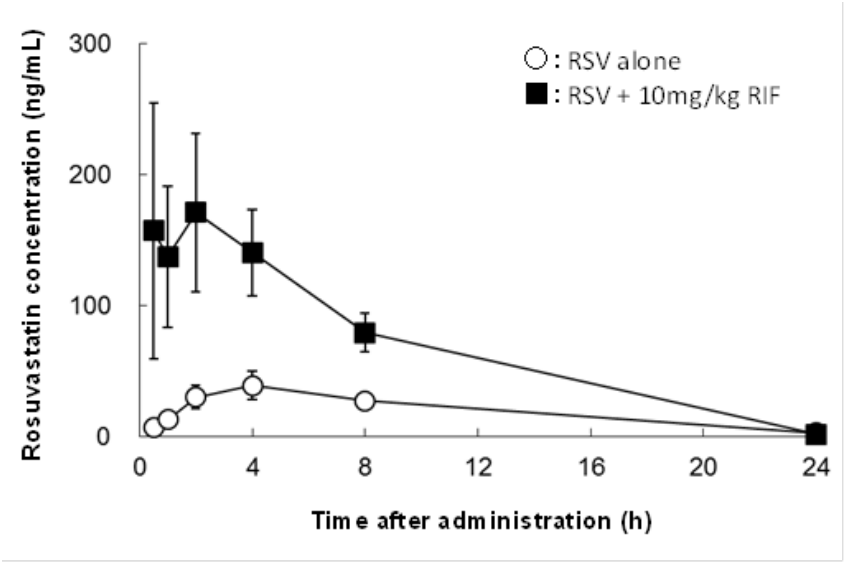

Fig.1　Effect of RIF on plasma concentration-time profiles of rosuvastatinafter oral administration to male cynomolgus at a dose of 5 mg/kg (○, control; ■, with 10 mg/kg RIF). Each point represents the mean ± S.D. (n = 4). RSV; rosuvastatin, RIF; rifampicin.

以上の結果より、カニクイザルは OATP1B1/1B3 を介した DDI のモデル動物として有用であることが示唆された。本学位論文研究の実施中において、Shen らはモデル基質に rosuvastatin を、モデル阻害剤に RIF をそれぞれ用いて、カニクイザルが OATP1B1/1B3 を介した *in vivo* DDI の評価モデル動物として有用であることを報告した(Shen H, et. al. J Pharmacol Exp Ther. 344:673-85(2013))。また、Takahashi らはカニクイザルを用いた OATP 阻害による DDI 評価に pitavastatin が有用であることが報告された(Takahashi T, et. al. Drug Metab Dispos. 41:1875-82(2013))。これらの報告は本研究で示した結果を支持するものであり、OATP1B1/1B3 の基質になる、もしくは阻害する開発候補化合物の in vivo トランスポーター評価モデルとしてカニクイザルが創薬初期の段階で応用できることが強く示唆された。

次に OATP1B1/1B3 の内因性基質である dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)に着目し、その OATP を介した DDI 予測バイオマーカーとしての有用性を検討した。臨床で追加の DDI 試験を実施することなく、臨床 Phase I 試験の中で DDI を評価できれば、早期に DDI リスクについて判断することができ、臨床試験計画の立案ならびに安全な臨床試験の推進に極めて有用である。臨床 Phase I 試験の中で DDI を判断する手法のひとつとして、DDI のバイオマーカーとなる内因性化合物を用いた評価が挙げられる。しかしながら、DDI を捉える上で重要な P-gp や BCRP、OATP1B1/1B3 についてはその相互作用を代替えできるバイオマーカーは見いだされていないのが現状である。OATP1B1/1B3 の基質となる内因性化合物として、抱合型および非抱合型の bilirubin、胆汁酸類、ステロイド抱合体、甲状腺ホルモンがある。本研究では OATP1B1/1B3 のバイオマーカー候補として血漿中に比較的多く存在しているステロイド抱合体である DHEAS に着目した。DHEAS はステロイドの一種である dehydroepiandrosterone の硫酸抱合体であり、主に副腎皮質で生成し、血液中に比較的高濃度存在する。DHEAS はヒトにおいて OATP1B1 および OATP1B3 の基質になる。しかし、、同時に胆汁酸トランスポーターである NTCP の基質にもなるが、、その

寄与は不明である。したがって DHEAS の肝取り込みにおいて OATP1B1/1B3 の寄与が大きければ、OATP1B1/1B3 のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。本研究ではヒトで探索する前の最初の段階としてカニクイザルを用いて DHEAS のバイオマーカーとしての可能性を評価した。

まずはヒトおよびカニクイザル肝細胞を用いて[^{3}H]DHEAS の取り込みを経時的に測定した。DHEAS の[^{3}H]標識体と肝細胞（1.0×10^6 cells/mL）を 37℃または 4℃でインキュベーションし、所定時間後にオイルレイヤー法により反応を停止した。肝細胞中の放射能量を液体シンチレーションカウンターで測定し、肝細胞中の放射能量（dpm/10^5 cells)を反応溶液中の放射能濃度（dpm/mL）で除し、10^6 cells 肝細胞当たりの取り込み量（μL/10^6 cells）として算出した。両細胞とも 4℃では 0.5 分から 5 分にかけて取り込み量の増加はほとんど認められなかったが、37℃では時間依存的な取り込みが認められ、DHEAS の取り込みにトランスポーターが関与することが示唆された。次に[^{3}H]DHEAS の肝細胞取り込みに対する OATP 以外のトランスポーターとして、胆汁酸のナトリウム依存的な取り込みに働く NTCP（SLC10A1)の寄与を見積もるため、Na^+依存性試験を実施した。37℃における取り込み活性から 4℃における取り込み活性を差し引いたトランスポーターを介した取り込み活性は、ヒト細胞においては Na^+非存在下の KHB 中でも活性は低下しなかったが、カニクイザル肝細胞においては Na^+非存在下の KHB 中で約 60%に活性が低下した。したがって、ヒトとは異なり、カニクイザル肝細胞における[^{3}H]DHEAS の取り込みには、OATP とは異なる Na 依存性のトランスポーター（NTCP 様のトランスポーター）の寄与が示唆された。続いて、[^{3}H]DHEAS の肝細胞取り込みに対する OATP 阻害剤である RIF の影響を評価した。ヒトおよびカニクイザル肝細胞ともに RIF の濃度依存的な[^{3}H]DHEAS 取り込み阻害が認められた。また、非標識 DHEAS（300 μM）存在下においても[^{3}H]DHEAS 取り込み阻害が認められた。したがって、[^{3}H]DHEAS の肝取り込みは OATP1B1/1B3 を介して取り込まれることが示唆され、また RIF はカニクイザルを用いた DDI 試験の阻害剤として妥当であることが確認された。

DHEASがOATP1B1/1B3を介したDDIのバイオマーカーとして利用可能かどうかを検討するために、カニクイザルにおける内因性DHEASの血漿中濃度に与えるRIFの影響を評価した。まず、4つのスタチン（atorvastatin、pitavastatin、pravastatin、rosuvastatin）およびmidazolamを合わせたカクテル（各1 mg/kg、以下カクテル基質）を雄のカニクイザル4匹に単回経口投与した（第一期）。休薬期間を経て、同じカニクイザル4頭にカクテル基質と2 mg/kgのRIFを単回経口投与した（第二期）。さらに休薬期間を経て、同じカニクイザル4頭にカクテル基質と10 mg/kgのRIFを単回経口投与した（第三期）。投与後経時的に採血し、LC-MS/MSを用いてカクテル基質およびDHEASの血漿中濃度を測定した。その結果、atorvastatin、pitavastatin、rosuvastatinのC_{max}およびAUCは、2 mg/kgのRIF併用によってコントロールと比較して2.3~4.6倍に上昇し、さらに10 mg/kgのRIF併用時には10.6~28倍に上昇した。いずれのスタチンも血漿中濃度が上昇したことから、RIFはカニクイザルのOATP1B1/1B3を十分に阻害していると考えられた。一方、CYP3A基質であるmidazolamの血漿中濃度はRIFの併用によってほとんど影響を受けなかった。RIFは反復投与により薬物代謝酵素系を誘導するが、RIFの単回投与においてはCYP3Aの阻害や誘導はないと考えられた。DHEASの血漿中濃度を測定した結果、10 mg/kgのRIF投与により、DHEASのC_{max}およびAUCはともに約2倍に増加することが見いだされた。低投与量である2 mg/kgのRIF併用によるC_{max}およびAUCの上昇はともに約1.2倍であり、血漿中の内因性DHEAS濃度に与えるRIFの影響はRIFの投与量依存的であった。OATP阻害薬のRIFにより血漿中DHEASの上昇が認められたことから、DHEASはOATP1B1/1B3を介したDDIのバイオマーカーとして応用できる可能性が示唆された。RIFの投与により血漿中DHEAS濃度が上昇した機序はRIFによる肝臓のOATP1B1/1B3阻害の結果であると考えられるが、他の機序の可能性について考察した。カニクイザル肝細胞のDHEAS取り込みに一部NTCPが寄与することが*in vitro*の検討より示されたが、RIFのヒトNTCPに対するIC_{50}値は277 μMであり、その阻害作用は強くない。RIFによるカニクイザルのNTCPに対する阻害作用は報告されていないが、ヒトと同程度と仮定すると、

in vivo では RIF は NTCP をほとんど阻害していないと考えられ、血漿中 DHEAS 濃度上昇の原因にはならないと考えられた。血漿中 DHEAS 濃度の上昇が RIF による OATP 阻害だけとは限らず、RIF と DHEAS の DDI 機構についてさらなる検討が必要であると考えられるが、本研究は DHEAS が OATP1B1/1B3 上での DDI を予測するバイオマーカーとして有用であることを強く示唆した最初の報告である。ヒトにおいても DHEAS が OATP 活性のバイオマーカーとして有用であれば、医薬品開発の最初の臨床試験（Phase I 試験）で OATP を介した DDI の予測が可能になる。本研究のヒトでの応用が期待される。

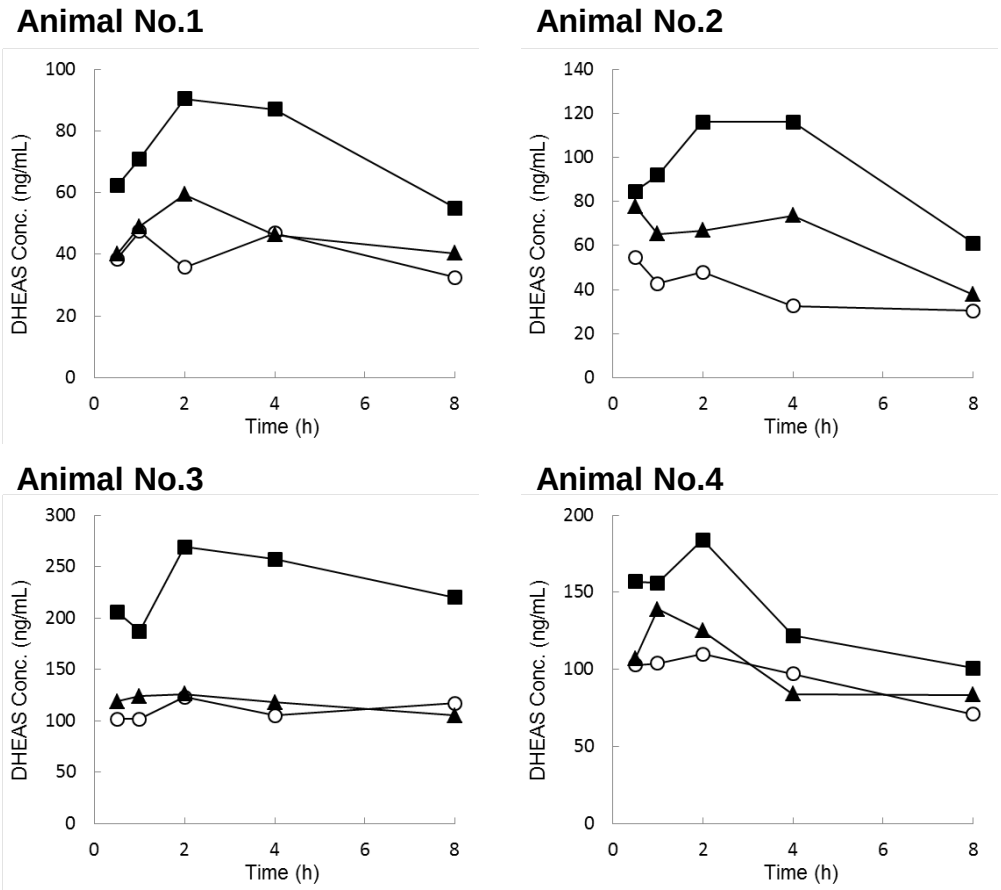

Fig. 2　Effect of RIF on plasma concentration-time profiles of DHEAS after RIF oral administration to male cynomolgus monkey (○, control; ▲, with 2 mg/kg RIF; ■, with 10 mg/kg RIF).

本研究によりカニクイザルのOATP1B1/1B3を介したDDI予測のモデル動物としての有用性、並びにDHEASのOATP1B1/1B3を介したDDI予測のバイオマーカーとしての有用性を示すことができた。医薬品の薬物動態に関連する因子のヒトとカニクイザルの種差についての研究はまだ十分でなく、カニクイザルが必ずしもヒトの薬物動態を予測しうるモデル動物とは限らないが、本研究のように*in vitro*試験により、ヒトとカニクイザルの種差を把握し、カニクイザルを用いた*in vivo*試験の結果と組み合わせることでヒトにおける薬物動態やDDIの予測が可能になるものと考えられる。また、本研究で示されたDHEASの有用性はカニクイザルを用いた検討であるため、臨床での有用性の評価やその応用が望まれる。

以上、トランスポーター研究の更なる発展と本研究の成果により、早期のDDIリスクの判断並びにより安全な臨床試験の推進が期待される。

平成２７年２月２日

学位論文審査報告書（甲）

１．学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

肝トランスポーターを介した薬物相互作用の予測およびそのバイオマーカーに関する研究

２．論文提出者　(1) 所　　属　生命科学　　専攻

(2) 氏　　名　渡邉　将規（わたなべ　まさき）

３．審査結果の要旨（600～650 字）

本研究は、重篤な副作用の原因として懸念される肝トランスポーターOATP1B1 および OATP1B3 上での薬物相互作用(DDI)を、創薬初期段階で予測する手法の提案を目的としたものである。ヒト OATP1B1/1B3 分子と相同性が高い分子を発現するカニクニイザルをヒト DDI 予測の有用なモデル動物として着目し、評価を行った。まず、肝細胞を用いた *in vitro* 試験により、カニクイザルにおいてもヒトと同様に OATP1B1/1B3 が機能し、その特性はヒトに類似していることを示した。さらに、経口投与された rosuvastatin（OATP 基質）の血漿中濃度は、OATP 阻害薬である rifampicin の併用により上昇することから、カニクイザルが本 DDI の予測モデル動物として有用であることを示した。さらに、OATP の内因性基質として dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)に着眼し、OATP 上での DDI 予測バイオマーカーとしての有用性を検討した。その結果、DHEAS は主に OATP1B1/1B3 を介して肝細胞内に取り込まれ、rifampicin 併用によりカニクイザルの血漿中内在性 DHEAS 濃度が上昇することを見出した。以上より、カニクイザルは OATP1B1/1B3 を介した DDI モデル動物として有用であること、および DHEAS が本 DDI 予測のバイオマーカーになるという結論を得た。本研究成果は、早期の DDI リスクの判断による安全な臨床試験の推進に有用であると期待されるものであることから、薬学(博士)に値すると判定された。

４．審査結果　(1) 判　　定（いずれかに○印）　○合　格　・　不合格

(2) 授与学位　博　士（薬学）