

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18934

研究課題名(和文)慢性腎障害時の肝膜輸送体・薬物代謝酵素の系統的な活性変動の解析と予測法開発

研究課題名(英文) Developments in estimation of the functional changes of transporters and drug metabolizing enzymes during renal failure

研究代表者

増尾 友佑 (Masuo, Yusuke)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：90708140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝消失型薬物の一部は、血漿中からの消失が慢性腎障害時に遅延する。そこで、OATP1B1阻害作用を有する生体内化合物を探索したところ、6-OH indoleはOATP1B1を阻害した。血漿中6-OH indole濃度は、腎障害患者において、正常腎機能患者よりも血漿中濃度が高かった。この化合物によるOATP1B1阻害作用は持続的であり、ブレインキュベーション時のみに添加した際にも阻害作用を有した。さらに、本化合物は、ヒト初代培養肝細胞でestrone 3-sulfateの細胞内取り込みを阻害した。本化合物は、慢性腎障害時に血液中に蓄積してOATP1B1の機能阻害を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several uremic toxins have been proposed to inhibit hepatic uptake transporters. The purpose of this study is to find possible inhibition of OATP1B1 by newly identified uremic toxins, 6-OH indole. 6-OH indole inhibited OATP1B1-mediated uptake of [3H]estrone sulfate in HEK293/OATP1B1 cells. Plasma concentration of 6-OH indole was higher in patients with severe renal failure than that in patients without renal failure. The inhibition pattern of OATP1B1 by 6-OH indole was long-lasting, since its inhibition was maintained after 6-OH indole was washed out. Also, 6-OH indole inhibited uptake of estrone sulfate in primary cultured hepatocytes without changing mRNA expression of OATP1B1. These results suggest that increase of 6-OH indole in plasma during CKD could at least partially explain the delayed elimination of OATP1B1 substrate drugs.

研究分野：薬物治療学

キーワード：トランスポーター 慢性腎障害 尿毒素 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

本邦成人の8人に1人が慢性腎障害に罹患しているとされ、その患者数は近年の高齢化に伴い増加傾向にある。慢性腎障害の唯一の根本治療法は腎移植だが、治療例は非常に限られる。慢性腎障害患者の多くは、生活習慣病等の他疾患の治療薬を服用するが、慢性腎障害時の薬物動態は、ごく一部の薬剤のみでしか詳細に検討されておらず、合理的な投与量設計ができない状況下にある。患者数の多さと疾患の難治性を考慮すると、慢性腎障害時における合理的な薬物投与量設計法の確立は急務である。

肝臓に主に取り込まれ代謝・排泄される薬物(肝消失型薬)の体内動態は従来、腎機能の影響を受けにくいとされてきた。しかし、抗がん剤イリノテカンの活性代謝物 SN-38、抗糖尿病薬 repaglinide、脂質異常症治療薬 rosuvastatin 等の肝消失型薬は、慢性腎障害患者において血漿中からの消失が遅延し、特に SN-38 は腎障害患者での重度の骨髄抑制が報告されている(*Drug Matab Dispos* 39 2011, *Clin Pharmacol Ther* 67 2000, *Curr Med Res Opin* 24 2008)。

2. 研究の目的

肝膜輸送体 OATP1B1 は、多数の薬物の肝取り込みに寄与し、肝消失型薬物のクリアランスの律速段階となる場合があるが、OATP1B1 の輸送機能は CKD 時に低下する。CKD 時に体内に蓄積する尿毒症物質の一部は OATP1B1 を競合阻害するが、既報の競合阻害だけでは CKD 時における OATP1B1 基質薬物の血中濃度上昇を定量的に説明するには不十分である。そこで、本研究では OATP1B1 の阻害作用を有する新規の尿毒症物質を探索することと、その阻害様式を検討することを目的とした。尿毒症物質には、Indoxyl Sulfate や Indole Acetic Acid, Melatonin のように Indole 環を有する化合物が複数存在する点に着目し、CKD 時には indole 代謝物全般が体内に蓄積すると考え、本研究では Indole 関連化合物と対象にした。

3. 研究の方法

OATP1B1 阻害作用を有する尿毒症化合物の探索

ヒト OATP1B1 発現細胞株 (HEK293/OATP1B1) を用いて、Indole 関連化合物による [³H]Estrone-3-Sulfate (E3S、OATP1B1 典型的基質) の細胞内取り込みに対する阻害活性を評価した。CKD 時に尿毒症物質は長時間体内に蓄積することから、競合阻害のみならず、Pre-incubation 時間依存的な阻害活性を評価すべく、Indole 関連化合物を Pre-incubation 時のみ、または [³H]E3S と同時に添加して取り込み活性を評価した。さらに、OATP1B1 の強い阻害活性を有した 6-OH Indole に関しては、ヒト初代培養肝細胞での [³H]E3S の細胞内取り込み阻害活性を評価した。

阻害メカニズムの解明

で、 [³H]E3S の取り込みに対する K_m 、 V_{max} を Eadie-Hofstee Plot から算出した。6-OH Indole 添加後の細胞膜上での OATP1B1 発現量変動を、細胞膜表面タンパク質ビオチン化法と免疫染色で評価した。

CKD 患者における 6-OH indole の血漿中濃度変化

6-OH indole は、MS におけるイオン化効率が低く、LC-MS/MS での測定は困難である。そこで Indole 環を p-dimethylaminocinnamaldehyde で誘導体化してイオン化効率を高めつつ、OH 基の位置異性体を分離して LC-MS/MS で定量した。腎障害の程度が異なるがん患者血漿における 6-OH Indole 濃度を、LC-MS/MS で定量した。

4. 研究成果

検討した 11 種類の Indole 関連化合物のうち、100 μ M Indoxyl Sulfate、6-OH Indole、7-OH Indole は、HEK293/OATP1B1 細胞における [³H]E3S の取り込みを、直接的 (Direct Inhibition) および持続的 (Long-lasting Inhibition) に低下させた。6-OH Indole は、Indole が CYP2A6 によって代謝されて生成するが、特に強い OATP1B1 の阻害活性を有したことから、以降は 6-OH Indole に着目した。ヒト初代培養肝細胞において、6-OH Indole は、 [³H]E3S の取り込みを Direct Inhibition お

よび Long-lasting Inhibition で低下させたことから、6-OH Indole による OATP1B1 の機能低下は、ヒト肝臓でも生じることが示唆された。一方で、6-OH Indole のヒト肝細胞への暴露は、OATP1B1 の mRNA 発現量を変化させなかったことから、6-OH Indole は、OATP1B1 の mRNA 発現調節ではなく、翻訳後調節または機能阻害に関与することが分かった。

6-OH Indole は、HEK293/OATP1B1 への [³H]E3S の取り込みを、濃度依存的かつ Pre-incubation 時間依存的に阻害した。Direct Inhibition における 6-OH Indole の IC₅₀ は、14.7 μM であり、既知の OATP1B1 阻害作用を有する尿毒症物質の一つである Indoxyl Sulfate (4.8 mM) よりも、100 倍以上強力に OATP1B1 を阻害することが分かった。3 時間までは Pre-incubation 時間依存的に阻害が強まったが、3 時間以降は阻害が強まる傾向はなかった。Cyclosporin A は、OATP1B1 を Pre-incubation 時間依存的に阻害するが、その阻害活性は 30 分以上の pre-incubation では強まらなかったことから、6-OH Indole は Cyclosporin A より遅い Pre-incubation 時間依存性を有していた。6-OH Indole の Direct Inhibition では、HEK293/OATP1B1 での [³H]E3S の取り込みに対する Km および V_{max} が増加し、Long-lasting Inhibition では、Km が増加し V_{max} は変化しなかった。一方、6-OH Indole の Pre-incubation による阻害は、3 hr で回復したことから、Long-lasting 阻害は可逆的であり、6-OH indole は共有結合ではないが、OATP1B1 と強く結合していると考えられる。細胞膜表面ピオチン化の結果、6-OH indole は OATP1B1 の細胞膜上での発現量および総発現量を変化させなかった。HA タグで標識した OATP1B1 の免疫染色においても、6-OH indole は OATP1B1 の細胞膜上への発現局在は変化させなかった。6-OH indole の添加で OATP1B1 の V_{max} が低下しなかったことと合致しており、6-OH Indole による OATP1B1 の阻害機構には、OATP1B1 の細胞膜局在は変化は関与しないことが示唆された。

6-OH indole 濃度は、重度の腎障害患者 (eGFR<15 mL/min) で 227 nM、正常な腎機能患者 (eGFR>60 mL/min) では、18.5 nM であり、CKD 時に 6-OH Indole が生体内に蓄積することが示された。一方で、重度の CKD 時でも 6-OH Indole の全身循環血漿中濃度は、

HEK293/OATP1B1 で算出された IC₅₀ 値よりも、50 倍以上低い濃度であった。6-OH indole は、肝細胞に発現する CYP2A6 で indole から代謝されて生成することから、肝細胞内および肝細胞近傍では全身循環血よりも高濃度で存在する可能性がある。また、Cyclosporine A は Pre-incubation 時に細胞内に取り込まれ、OATP1B1 を細胞内部から阻害することが報告されている 4)。6-OH indole は、肝細胞の内部から OATP1B1 を阻害する可能性もあるため、CKD 時における 6-OH indole の OATP1B1 の阻害作用に関して更なる検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1) Ellawatty WEA, Masuo Y, Fujita KI, Yamazaki E, Ishida H, Arakawa H, Nakamichi N, Abdelwahed R, Sasaki Y, Kato Y. Organic Cation Transporter 1 Is Responsible for Hepatocellular Uptake of the Tyrosine Kinase Inhibitor Pazopanib. *Drug Metab Dispos.* 46:33, 2018
査読有、DOI: 10.1124/dmd.117.076554

2) Ishimoto T, Nakamichi N, Nishijima H, Masuo Y, Kato Y. Carnitine/Organic Cation Transporter OCTN1 Negatively Regulates Activation in Murine Cultured Microglial Cells. *Neurochem Res.*, 43:107, 2018
査読有、DOI: 10.1007/s11064-017-2350-5

3) Fujita KI, Masuo Y, Yamazaki E, Shibutani T, Kubota Y, Nakamichi N, Sasaki Y, Kato Y. Involvement of the Transporters P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Dermal Distribution of the Multikinase Inhibitor Regorafenib and Its Active Metabolites. *J Pharm Sci.* 106:2632-41, 2017
査読有、DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.064

4) Masuo Y, Nagamori S, Hasegawa A, Hayashi K, Isozumi N, Nakamichi N, Kanai Y, Kato Y. Utilization of Liver Microsomes to Estimate Hepatic Intrinsic Clearance of Monoamine

Oxidase Substrate Drugs in Humans. *Pharm Res.*, 34:1233-1243, 2017

査読有、DOI: 10.1007/s11095-017-2140-4

5) Hashimoto N, Nakamichi N, Yamazaki E, Oikawa M, Masuo Y, Schinkel AH, Kato Y. P-Glycoprotein in skin contributes to transdermal absorption of topical corticosteroids. *Int. J. Pharm.*, 521:365-373, 2016

査読有、DOI:

10.1016/j.ijpharm.2017.02.064

6) Nakamichi N, Ishimoto T, Yamauchi Y, Masuo Y, Kato Y. Screening to Identify Multidrug Resistance-Associated Protein Inhibitors with Neuroblastoma-Selective Cytotoxicity. *Biol Pharm Bull.* 39:1638-1645, 2016

査読有、DOI: 10.1248/bpb.b16-00319

7) Futatsugi A, Masuo Y, Kawabata S, Nakamichi N, Kato Y. L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. *J Pharm Pharmacol.* 68:1160-9, 2016

査読有、DOI: 10.1111/jphp.12574

8) Taguchi T, Masuo Y, Kogi T, Nakamichi N, Kato Y. Characterization of long-lasting Oatp inhibition by typical inhibitor cyclosporine A and in vitro-in vivo discrepancy in its drug interaction potential in rats. *J Pharm Sci.* 105:2231-9, 2016

査読有、DOI: 10.1016/j.xphs.2016.04.025

9) Nakamichi N, Nakayama K, Ishimoto T, Masuo Y, Wakayama T, Sekiguchi H, Sutoh K, Usumi K, Iseki S, Kato Y. Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice. *Brain Behav.* 6:e00477, 2016

査読有、DOI: 10.1002/brb3.477

〔学会発表〕(計39件)

(一部のみを記載)

1) 増尾友佑、中道範隆、加藤将夫 Screening of Endogenous Substrates of SLC22A4 by Metabolomic Approach Based on Transporting Activity and Substrate Recognition 日本薬物動態学会第32回年会 シンポジウム 6

2017.11.29-12.1 東京

2) 笹田京佑、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫 Identification of endogenous BCRP substrate by metabolomics using gene knockout mice and transporter expressing system 日本薬物動態学会第32回年会 2017.11.29-12.1 東京

3) 清波夏実、増尾友佑、藤田健一、中道範隆、佐々木康綱、加藤将夫 Characterization of OATP1B1 inhibition by indole metabolites 日本薬物動態学会第32回年会 2017.11.29-12.1 東京

4) Aya Hasan、増尾友佑、藤田健一、山崎絵里名、久保田祐太郎、中道範隆、佐々木康綱、加藤将夫 Involvement of ABC drug transporters in disposition of tyrosine kinase inhibitor regorafenib and its active metabolites after repeated oral dose 日本薬物動態学会第32回年会 2017.11.29-12.1 東京

5) 島田和弘、増尾友佑、藤田健一、山崎絵里名、久保田祐太郎、中道範隆、佐々木康綱、加藤将夫 Keratinocyte における膜輸送体の発現とレゴラフェニブ分布に及ぼす影響 日本薬学会北陸支部第129回例会 2017.11.26 金沢

6) 小池彩花、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫 モノ核酸関連化合物の網羅的定量による消化管吸収評価 日本薬学会北陸支部第129回例会 2017.11.26 金沢

7) 増尾友佑、小池彩花、中道範隆、加藤将夫 モノ核酸化合物の網羅的定量による消管吸収性比較 第11回メタボロームシンポジウム 2017.11.13-14 大阪

8) 増尾友佑、大庭悠里、山田耕平、中道範隆、国嶋崇隆、加藤将夫 構造選択的メタボロミクスによる疾患関連輸送体 OCTN1 の生体内基質探索 第12回トランスポーター研究会 2017.7.8-9 仙台

9) 増尾友佑、大庭悠里、山田耕平、中道範隆、国嶋崇隆、加藤将夫 輸送機能と基質認識特性を利用したメタボロミクスによる

SLC22A4 生体内基質探索 日本薬学会第 32 年会 2017.5.11-13 大宮 (最優秀発表者賞を受賞)

10) 増尾友佑、荒川大、中道範隆、加藤将夫 臓器障害関連抗酸化物質 Ergothioneine の生体内代謝物探索 第 10 回メタボロームシンポジウム 2017.10.19-21 鶴岡

11) 大庭悠里、増尾友佑、山田耕平、中道範隆、国嶋崇隆、加藤将夫 構造選択的メタボロームによる膜輸送体 OCTN1 の生体内基質探索 第 10 回メタボロームシンポジウム 2017.10.19-21 鶴岡

12) 増尾友佑、竹村比呂、松尾舞、中道範隆、加藤将夫 Functional characterization of OCTN1-mediated creatinine transport 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

13) 相中里菜、増尾友佑、吉村智之、中道範隆、松尾淳一、加藤将夫 Possible oxidative metabolism in the body of ergothioneine, a food-derived substrate of Crohn's disease-associated transporter OCTN1/SLC22A4 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

14) 清波夏実、増尾友佑、藤田健一、中道範隆、佐々木康綱、加藤将夫 Inhibition of human hepatic transporter OATP1B1 by indole metabolites 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

15) 山崎絵里名、増尾友佑、藤田健一、澁谷俊紀、中道範隆、佐々木康綱、加藤将夫 Involvement of ABC drug transporters in disposition of active metabolites of tyrosine kinase inhibitor Regorafenib 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

16) 大庭悠里、増尾友佑、山田耕平、中道範隆、国嶋崇隆、加藤将夫 Identification of endogenous OCTN1 substrates by transporter/structure selective-metabolome approach 日本薬物動態学会 第 31 回年会

2016.10.13-15 松本

17) 田口貴之、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫 Mechanistic analysis of long-lasting OATP inhibition by cyclosporine A 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

18) 長谷川葵、増尾友佑、永森收志、林和輝、中道範隆、金井好克、加藤将夫 Proteomics-based validation of in vitro-in vivo extrapolation using liver microsomes to predict intrinsic clearance of MAO substrates 日本薬物動態学会第 31 回年会 2016.10.13-15 松本

19) Masuo Y, Nagamori S, Hayashi K, Hasegawa A, Nakamichi N, Kanai Y, Kato Y: Evaluation of in vitro-in vivo extrapolation strategy using liver microsomes to predict intrinsic clearance of MAO substrates in humans. 20th Microsomes and Drug Oxidations. 2016.10.2-6, Davis, USA

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増尾 友佑 (MASUO YUSUKE)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 90708140

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし