

博 士 論 文

時間依存的阻害を考慮した薬物トランスポーターOATP の
関与する薬物相互作用予測

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

分子薬物治療学研究室

学籍番号： 1429012005

氏名： 田口 貴之

主任指導教員名： 加藤 将夫

目次

第1章 序論	-4-
第2章 CsA 及び rifampicin の Oatp 阻害に基づく薬物相互作用予測	
第1節 緒言	-5-
第2節 結果	-8-
第3節 考察	-21-
第3節 チロシンキナーゼ阻害剤 pazopanib による短時間持続的な OATP1B1 阻害	
第一節 緒言	-25-
第二節 結果	-27-
第三節 考察	-40-
第4章 時間依存的 OATP1B1 阻害の新規薬物相互作用予測	
第一節 緒言	-44-
第二節 結果	-45-
第三節 考察	-60-
第5章 総括	-63-
第6章 実験方法	-65-
引用文献	-81-
謝辞	-89-

略語及び記号一覧

ABT	1-Aminobenzotriazole
AUC	Area under the concentration-time curve
BCRP	Breast cancer resistance protein
CsA	Cyclosporine A
CYP	Cytochrome p450
DDI	Drug-drug interaction
DMEM	Dulbecc's modified Eagle's medium
E1S	Estrone 3-sulfate
E2G	[3H]Estradiol-17 β -glucuronide
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray ionization
FDA	U.S. Food and Drug Administration
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
KH	Krebs–Henseleit
LC	Liquid chromatography
MHLW	Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MS	Mass spectrometry
NME	New molecular entity
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
P-gp	P-glycoprotein
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

第1章 序論

薬物相互作用 (DDI) は発現機序により薬物動態学的相互作用と薬力学的相互作用に大別され、重篤な副作用や治療効果の減弱などの原因となることから、医薬品開発においてヒトにおける DDI の有無とその程度を予測することは重要である。この中で、薬物動態学的相互作用は薬物の吸収・分布・代謝及び排泄過程において起こる DDI であり、臨床ではこれらの過程に影響を及ぼす薬物代謝酵素及びトランスポーターに関する DDI が多数報告されている (Giacomini *et al.*, 2010)。そのため、米国医薬品局 (FDA)、欧州医薬品庁 (EMA) 及び厚生労働省 (MHLW) は、それぞれ DDI に関するドラフトガイダンス又はガイドラインを公表し (FDA, 2020a and 2020b; EMA, 2012; MHLW, 2018)、新規分子化合物 (NME) が被相互作用薬となる (相互作用を受ける) 可能性及び相互作用薬となる (相互作用を与える) 可能性について検討することを推奨している。さらに、2018 年の医薬品規制調和国際会議 (ICH) の神戸会議では、ICH M12 として DDI ガイドラインを作成することが決定され、DDI の評価及び予測の重要性が高まっている。

有機アニオントランスポーター OATP1B1 及び OATP1B3 は主に肝細胞の類洞膜側に発現しており、ビリルビンのような生体内物質や HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンのような医薬品など、様々な物質の肝臓内への移行に関与している (Kalliokoski and Niemi, 2009; Shitara *et al.*, 2013a)。特にスタチンなどの薬物は、OATP を介した肝取り込み過程が体内からの消失における律速過程となっており、臨床において OATP 阻害薬との併用や OATP の遺伝子多型により、これらの血漿中濃度が上昇することが報告されている (Giacomini *et al.*, 2013、Yoshida *et al.*, 2012)。従って、NME の OATP 阻害による DDI の予測は重要であり、各局のガイドライン/ガイダンスでは OATP 阻害に関する臨床 DDI 試験の実施を判断するための決定樹が示されているが、この決定樹に従っても DDI を偽陰性と判断するケースが存在する (Vaidyanathan *et al.*, 2016)。これまでに、OATP 阻害の DDI 予測において偽陰性に陥る明確な原因は明らかとなっていないが、OATP 阻害には評価する基質によりその阻害

定数 (IC_{50} 値) が異なること (基質依存性) (Izumi *et al.*, 2015)、阻害剤とのプレインキュベーションにより阻害作用が増強すること (時間依存的阻害) (shitara *et al.*, 2009, 2012, 2013b)、及び阻害剤とのプレインキュベーション後に阻害剤を除去しても OATP 活性が長時間阻害されること (長時間持続的な阻害) (shitara *et al.*, 2009, 2012, 2013b) が報告されている。一方で、ガイドライン/ガイダンスでは OATP 阻害形式にかかわらず、競合/非競合阻害の可逆的阻害に基づく DDI 予測式が示されている。従って、現在の DDI 予測式が OATP 阻害作用に基づいた予測式となっていないことが OATP 阻害による DDI 予測の偽陰性の原因の一つと考えられた。

そこで、第 2 章では、*in vitro* において時間依存的 OATP 阻害作用及び持続的な OATP 阻害作用を示す CsA の *in vitro* から *in vivo* の DDI 予測について検証した。さらに第 3 章では、プレインキュベーションにより強い OATP1B1 阻害作用を有し、臨床において OATP1B1 基質の血漿中濃度の上昇が報告された pazopanib の OATP1B1 阻害作用の特徴及び OATP1B1 阻害による DDI の可能性について評価した。最後の第 4 章では、時間依存的 OATP1B1 阻害の確度の高い DDI 予測式の構築を目指し、従来のガイドライン/ガイダンスに記載された可逆的阻害に基づく DDI 予測法と比較検証した。

第2章 CsA 及び rifampicin の Oatp 阻害に基づく薬物相互作用予測

第1節 緒言

医薬品開発において、DDI を精度よく予測することは市販後の予期せぬ副作用リスクや効果の減弱等を回避するうえで重要である。各局から公表されたガイドライン/ドラフトガイダンスでは、NME が OATP の被相互作用薬となる可能性について、R 値（本論文内では R_0 値とした） $[R = 1 + I_{u,inlet,max}/K_i$ ($I_{u,inlet,max}$: 肝臓入り口の血液中での推定最大非結合形阻害剤濃度、 K_i : 阻害定数)] が 1.1 以上の場合に、CsA 又は rifampicin との臨床 DDI 試験の実施が推奨されている。これまでに、CsA の R 値は OATP1B1 基質である pravastatin 又は atorvastatin と併用したときの AUC 上昇率と比較して小さくなると報告されたが (Amundsen *et al.*, 2010; Varma *et al.*, 2012)、OATP1B1 発現細胞をあらかじめ CsA とプレインキュベーションすることで、CsA による OATP1B1 阻害作用が増強し (shitara *et al.*, 2012, 2013b)、そのような条件下で算出した IC_{50} 値が PBPK モデルにより算出した K_i 値と同等であることが報告された (Yohikado *et al.*, 2016)。しかしながら、PBPK モデルによる解析では血漿蛋白に結合した CsA や CsA の代謝物による OATP1B1 阻害を組み込んだモデルになっていないため、プレインキュベーション条件下で算出した IC_{50} 値が偶然に *in vivo* における K_i 値と同等となった可能性も考えられる。また、CsA は *in vitro* においてプレインキュベーションにより OATP1B1 活性を長時間低下させることも報告されている (Shitara *et al.*, 2012)。そこで、動物を用いた DDI 試験結果が臨床における DDI の予測において有用な情報となりえることから (Imaoka *et al.*, 2013)、本検討ではラットを用いて CsA の Oatp 阻害による *in vitro* から *in vivo* の DDI 予測性について検証した。また、これまでに持続的な OATP 阻害作用が報告されていない rifampicin も CsA と同時に評価した。OATP1B1 阻害には基質依存性が報告されていることから (Izumi *et al.*, 2015)、本検討では *in vitro* 及び *in vivo* 試験では同じ基質 (pravastatin) を用いた。Pravastatin はラットにおいて Oatp1a1、1a4 及び 1b2 の基質であり (Hsiang *et al.*, 1999; Tokui *et al.*, 1999; Shingaki *et al.*, 2013)、ヒトにおいて CYP3A4 で代謝さ

れないがラットにおける主代謝経路は不明である。また、CsA 及び rifampicin は CYP3A に対する阻害作用を有し (Kajosaari *et al.*, 2005; Amundsen *et al.*, 2012)、rifampicin はさらに CYP3A の誘導作用も有しているが (Williamson *et al.*, 2013)、ラットでは薬物代謝酵素の誘導作用はほとんどない (Strolin Benedetti and Philippe, 1994)。そこで本検討では、pravastatin の血漿中濃度が CsA 及び rifampicin の Cyp3a 阻害により上昇する可能性を評価する目的で、Cyp3a の基質である midazolam を pravastatin と同時投与した。

本章では、まず持続的な Oatp 阻害が *in vivo* で起こる可能性及びそのときの DDI の予測性について検証する目的で、pravastatin を投与する数日前に CsA 又は rifampicin を投与し、pravastatin と CsA 又は rifampicin による DDI を評価した。次に、血漿蛋白に結合した CsA による Oatp 阻害を評価する目的で、ラット肝細胞を用いて血清存在下及び非存在下で取り込み阻害試験を実施した。さらに、CsA の代謝物による Oatp 阻害を評価する目的で、CsA の主代謝物の一つである M1 による取り込み阻害試験及び非選択的 CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) 投与条件下における pravastatin と CsA の DDI 試験を実施した。

第2節 結果

2-2-1. ラットに CsA 又は rifampicin 前投与した条件における pravastatin の薬物動態

CsA (0.1、0.5、1、3 及び 5 mg/kg) 又は rifampicin (10 mg/kg) を静脈内投与した翌日に pravastatin 及び midazolam を経口投与した。Pravastatin の血漿中濃度は、いずれの投与量の CsA 投与群でも媒体投与群に比べて上昇し、AUC は 1、3 及び 5 mg/kg の CsA 投与群で有意に上昇した (Fig. 1A, Table 1)。このとき、Cyp3a 基質である midazolam の血漿中濃度は CsA 投与群と媒体投与群で同等であった (Fig. 1B, Table 1)。一方で、rifampicin 静脈内投与後 1 日に pravastatin を経口投与したときの pravastatin の AUC は、媒体投与群の AUC と同等であり (Fig. 1A, Table 1)、10 mg/kg 及び 25 mg/kg の rifampicin を静脈内投与後 5 分に pravastatin を経口投与したときの pravastatin の AUC は媒体投与群に比べて有意に上昇した (Fig. 1C, Table 2)。このとき、midazolam の血漿中濃度は rifampicin 投与群と媒体投与群で同等であった (Fig. 1D, Table 2)。Table 1 の経口クリアランス (CL/F) を縦軸に、pravastatin 投与後 5 分における血漿中非結合形 CsA 濃度を縦軸にしてプロットし (Fig. 2)、式 (1) より算出した $K_{i,invivo}$ は 0.0105 nM であった。

CsA による Oatp 阻害の持続性を *in vivo* で検証する目的で、CsA 投与後 1、3 及び 7 日に pravastatin を経口投与した。Pravastatin の AUC は、CsA 投与後 1 及び 3 日において有意に上昇し (Fig. 3, Table 3)、pravastatin の AUC 比は、CsA 投与後 1、3 及び 7 日で 4.63、3.03 及び 1.36 であった。本試験における pravastatin の CL/F と血漿中非結合形 CsA 濃度のプロットは、 $K_{i,invivo}$ (0.0105 nM) を用いて式 (1) よりシミュレーションとほぼ同じ位置にプロットされた (Fig. 2)。

2-2-2. ラット凍結肝細胞を用いた KH buffer (血清非存在) 条件における CsA 及び rifampicin による pravastatin の取り込み阻害

ラット凍結肝細胞を用いて CsA 又は rifampicin による pravastatin の取り込み阻害試験を

KH buffer 中（血清非存在条件）で実施した。Pravastatin の取り込みは、CsA 又は rifampicin の濃度依存的に減少し（Fig. 4A and B）、式（2）より算出した CsA 及び rifampicin の IC₅₀ 値はそれぞれ、 0.0843 ± 0.0268 及び $0.934 \pm 0.195 \mu\text{M}$ であった。CsA の血漿蛋白非結合率 ($f_{u,p}$) は 0.0023 であったが、各局の DDI ガイドライン/ガイダンスでは、 $f_{u,p}$ が 0.01 未満の場合には $f_{u,p}$ を 0.01 とし R_0' 値を算出することが推奨されている。そこで、CsA 投与 1 日後に pravastatin を経口投与したときの R_0' 値を 0.0023 又は 0.01 でそれぞれ計算した結果、 R_0' 値は 1.00-1.05 であり、AUC 比（1.88-4.19）に比べて低かった（Table 1）。また、CsA 投与後 1、3 及び 7 日に pravastatin を経口投与した試験における R_0' 値は 1.00-1.06 であり、AUC 比（1.36-4.63）に比べて低かった（Table 3）。一方で、rifampicin 投与後 1 日において pravastatin を経口投与したときの R_0' 値は 1.02 であり、AUC 比（1.07）とほぼ等しかった（Table 1）。また、rifampicin 投与後 5 分に pravastatin を経口投与したときの R_0' 値は 2.09-5.65 であり、AUC 比（5.29-17.2）に比べて低かった（Table 2）。

2-2-3. ラット凍結肝細胞を用いたラット血清条件における CsA 及び rifampicin による pravastatin の取り込み阻害

CsA 及び rifampicin による Oatp 阻害に血漿蛋白に結合形した薬物が関与するかどうかを明らかにする目的で、ラット血清条件下でラット肝細胞への pravastatin の取り込み阻害試験を実施した。CsA 及び rifampicin はラット血清条件下において濃度依存的に pravastatin の取り込みを阻害した（Fig. 4A and B）。式（2）より、血漿蛋白結合形及び非結合形を合わせた全薬物濃度基準と非結合形薬物濃度基準のそれぞれについて IC₅₀ 値を算出した。CsA 及び rifampicin の全薬物濃度基準の IC₅₀ 値は、それぞれ 10.5 ± 5.0 及び $27.8 \pm 6.0 \mu\text{M}$ であった。一方で、CsA 及び rifampicin の非結合形薬物濃度基準の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.0482 ± 0.0269 及び $2.82 \pm 0.67 \mu\text{M}$ であった。

2-2-4. CsA の代謝物による Oatp 阻害

ヒトにおける CsA の主代謝物の一つである M1 を用いて、ラット肝細胞への pravastatin の取り込み阻害試験を実施した。Pravastatin の取り込みは、M1 の濃度依存的に阻害され (Fig. 4C)、 IC_{50} 値は $0.158 \pm 0.028 \mu\text{M}$ であった。次に、M1 を含む CsA の代謝物による Oatp 阻害の可能性を追求する目的で、非選択的 P450 阻害剤である ABT 投与条件下において CsA を投与し、pravastatin の薬物動態を評価した。ABT 投与条件下において血漿中 CsA 濃度は ABT 非投与条件下に比べて上昇した (Fig.5, Table 4)。このとき、CsA 投与群の pravastatin の血漿中濃度は CsA 非投与群に比べて上昇したが、CsA 及び M1 から算出した R_0 '値はそれぞれ 1.00–1.01 であった (Table 4)。

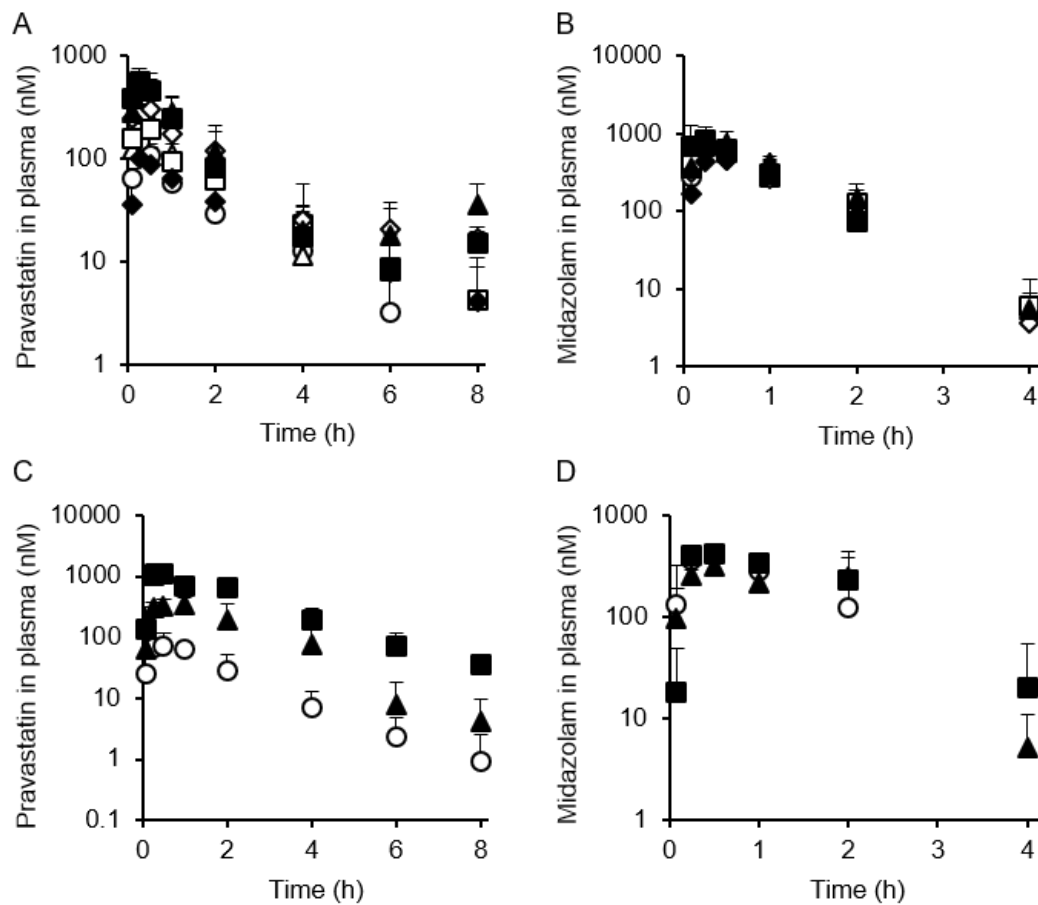


Fig. 1. Plasma concentration-time profiles of pravastatin (A, C) and midazolam (B, D) after their concomitant oral administration with or without CsA or rifampicin given as a bolus intravenous administration in male SD rats.

(A, B) Vehicle alone (○), 0.1 (△), 0.5 (◻), 1 (◇), 3 (▲) and 5 mg/kg (■) CsA or 10 mg/kg (◆) rifampicin was intravenously administered, and, after 1 day, mixture of pravastatin (30 mg/kg, A) and midazolam (10 mg/kg, B) was orally administered. (C, D) Vehicle alone (○), 10 (▲) and 25 (■) mg/kg rifampicin was intravenously administered, and, after 5 min, mixture of pravastatin (C) and midazolam (D) at the same doses was orally administered. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3-4$).

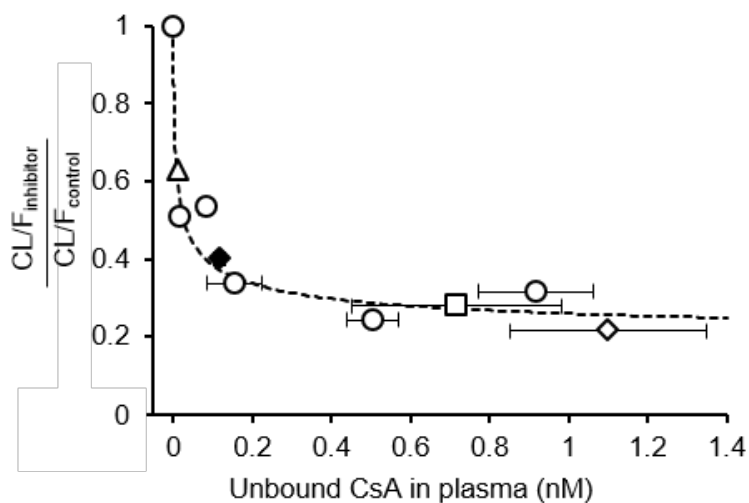


Fig. 2. Relationship between unbound CsA concentration in plasma and oral clearance (CL/F) of pravastatin in CsA-pretreated rats.

The CL/F of pravastatin (○) at 1 day after CsA-pretreatment were obtained from the data shown in Fig. 1A and normalized by that in vehicle treated rats. The normalized CL/F was fitted to Eq. 1, yielding fitted line shown as dashed line and $K_{i,in vivo}$ of 0.0105 ± 0.0086 nM. The CL/F of pravastatin at 1 (◇), 3 (□) and 7 (△) day after CsA-pretreatment were obtained from data shown in Fig. 3, normalized by that in control rats and also plotted. The CL/F of pravastatin orally administered at 1 day after CsA-pretreatment in rats receiving intravenous administration of CYP inhibitor ABT (◆) was obtained from data shown in Fig. 5, normalized by that in CsA non-treated rats with ABT pretreatment and also plotted. Plasma concentration of CsA was measured at 5 min after oral administration of pravastatin in all groups, and unbound CsA concentration was then calculated by multiplying total plasma concentration of CsA with its unbound fraction (0.0023). Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3-4$).

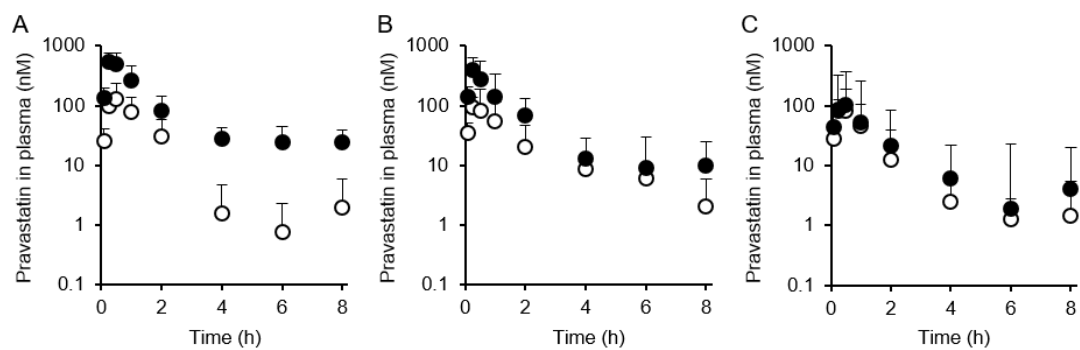


Fig. 3. Plasma concentration-time profiles of pravastatin after oral administration with or without CsA given as an intravenous bolus dose.

Rats received CsA (5 mg/kg, ●) or vehicle (○), and pravastatin (30 mg/kg) was orally administered at 1 (A), 3 (B) and 7 days (C) after the CsA administration. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 4$).

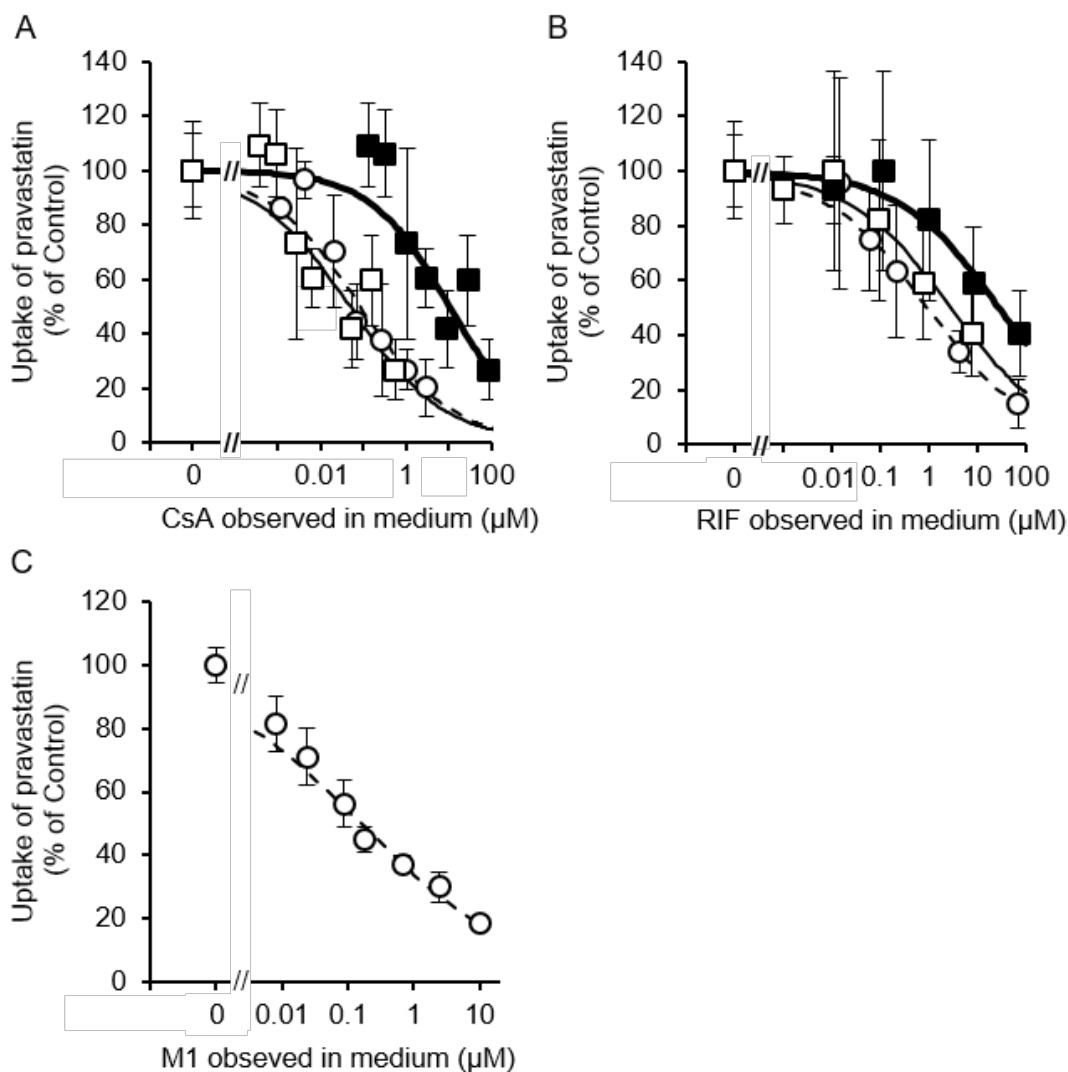


Fig. 4. Inhibition by CsA (A), RIF (B) and M1 (C) of the uptake of pravastatin in cryopreserved rat hepatocytes.

Uptake of pravastatin was measured in KH buffer (\circ) and rat serum (\blacksquare , \square) conditions, and normalized by control value. Concentration of total (\circ , \blacksquare) and unbound (\square) forms of CsA (A) and RIF (B) in the medium were experimentally measured and shown in abscissa. Dashed, thin and thick lines represent fitted lines based on Eq. 2 for the inhibition curves based on total concentration in KH buffer, and unbound or total concentration of inhibitor in rat serum, respectively. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3-6$).

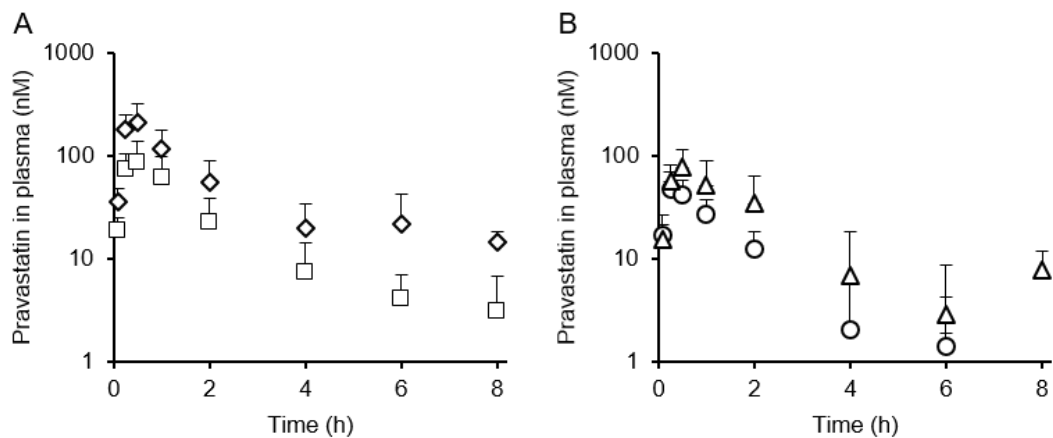


Fig. 5. Plasma concentration-time profiles of pravastatin after oral administration with or without CsA given as an intravenous bolus dose.

Rats received intravenous administration of ABT (50 mg/kg; □, ◇) in panel (A) or saline (○, △) in panel (B). After 16 h, CsA (0.5 mg/kg; ◇, △) or vehicle alone (□, ○) was intravenously administered. Pravastatin (30 mg/kg) was then orally administered at 1 day after the CsA or vehicle administration. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 4$)

TABLE 1

Pharmacokinetic parameters of pravastatin (30 mg/kg) and midazolam (10 mg/kg) at 1 day after intravenous administration of CsA (0.1, 0.5, 1, 3 and 5 mg/kg) and rifampicin (10 mg/kg)^a

Dose (mg/kg)		C _{max}	T _{max}	CL/F (×10 ³)	AUC _p	AUC ratio ^b	I _p ^c	R ₀ ' value ^d
		nmol/L	h	mL/min/kg	nmol·h/L		nmol/L	
Pravastatin								
Control		146 ± 49	0.250 ± 0.000	5.67 ± 0.73	200 ± 24	-		1
CsA	0.1	274 ± 68	0.333 ± 0.144	2.94 ± 0.81	398 ± 94	1.95	7.01 ± 0.72	1.00(1.00)
	0.5	268 ± 56	0.250 ± 0.000	3.03 ± 0.60	381 ± 77	1.88	35.9 ± 7.3	1.00(1.00)
	1	433 ± 141*	0.250 ± 0.000	1.91 ± 0.71**	662 ± 311**	3.10	67.1 ± 29.8	1.00(1.01)
	3	533 ± 114**	0.333 ± 0.144	1.38 ± 0.42***	855 ± 224***	4.19	219 ± 29	1.01(1.03)
	5	552 ± 204**	0.250 ± 0.000	1.79 ± 0.82**	721 ± 326*	3.37	399 ± 63	1.01(1.05)
Rifampicin	10	108 ± 48	0.500 ± 0.433	5.85 ± 3.36	233 ± 113	1.07	187 ± 120	1.02
Midazolam								
Control		632 ± 257	0.194 ± 0.096	8.67 ± 4.01	727 ± 339			
CsA	0.1	831 ± 355	0.333 ± 0.144	6.55 ± 1.47	945 ± 282	1.37	-	-
	0.5	705 ± 331	0.271 ± 0.172	7.80 ± 2.98	773 ± 414	1.05	-	-
	1	606 ± 234	0.250 ± 0.000	8.00 ± 1.72	660 ± 135	0.96	-	-
	3	717 ± 138	0.333 ± 0.144	5.50 ± 0.31	935 ± 50	1.39	-	-
	5	861 ± 447	0.194 ± 0.096	7.90 ± 4.65	778 ± 341	1.06	-	-
Rifampicin	10	446 ± 142	0.500 ± 0.000	8.31 ± 1.94	639 ± 194	0.93	-	-

**Significantly different from control ($p < 0.05$)*

***Significantly different from control ($p < 0.01$)*

****Significantly different from control ($p < 0.001$)*

^aMean \pm S.D. in 3 to 4 rats.

^bEstimated as ratio of geometric mean of AUC in CsA- or rifampicin-treated rats to that in vehicle-treated (control) rats.

^cPlasma concentration of CsA or rifampicin at 5 min after oral administration of pravastatin.

^dEstimated by Eq. 5. R_0 ' values in parenthesis were calculated assuming that the unbound fraction of CsA was 0.01.

TABLE 2

Pharmacokinetic parameters of pravastatin (30 mg/kg) and midazolam (10 mg/kg) at 5 min after intravenous administration of rifampicin (10 and 25 mg/kg)^a

Dose (mg/kg)		C _{max}	T _{max}	CL/F (×10 ³)	AUC _p	AUC ratio ^b	I _p ^c	R ₀ ' value ^d
		nmol/L	h	mL/min/kg	nmol·h/L		μmol/L	
Pravastatin								
Control		80.8 ± 34.3	0.667 ± 0.289	7.21 ± 1.09	158 ± 26	1		
Rifampicin	10	380 ± 65**	1.08 ± 0.88	1.51 ± 0.87*	910 ± 464*	5.29	9.90	2.09
	25	1090 ± 501***	0.333 ± 0.144	0.420 ± 0.110*	2760 ± 686*	17.2	31.0	5.65
Midazolam								
Control		428 ± 36	0.500 ± 0.000	777 ± 194	702 ± 174	1		
Rifampicin	10	350 ± 85	1.00 ± 0.87	849 ± 493	734 ± 347	0.71	-	-
	25	436 ± 42	0.417 ± 0.144	594 ± 187	936 ± 359	1.30	-	-

*Significantly different from control ($p < 0.05$)

**Significantly different from control ($p < 0.01$)

***Significantly different from control ($p < 0.001$)

^aMean ± S.D. in 3 rats.

^bEstimated as ratio of geometric mean of AUC in rifampicin-treated rats to that in vehicle-treated (control) rats.

^cPlasma concentration of rifampicin at 5 min after oral administration of pravastatin.

^dEstimated by Eq. 5.

TABLE 3

Pharmacokinetic parameters of pravastatin (30 mg/kg) at 1, 3, and 7 day after intravenous administration of CsA (5 mg/kg)^a

		C _{max}	T _{max}	CL/F (×10 ³)	I _p ^b	AUC
		nmol/L	h	mL/min/kg	nmol/L	nmol·h/L
Day 1	Control	136 ± 101	0.436 ± 0.125	8.42 ± 4.80		182 ± 121
	CsA	557 ± 258*	0.360 ± 0.129	1.80 ± 0.97	498 ± 109	787 ± 404*
	R ₀ ' value ^c					1.01 (1.06 ^c)
	AUC ratio ^d					4.63
Day 3	Control	93.2 ± 25.7	0.313 ± 0.125	7.71 ± 2.53		158 ± 67
	CsA	398 ± 70***	0.250 ± 0.000	2.14 ± 0.40*	266 ± 98	537 ± 109**
	R ₀ ' value ^c					1.01 (1.03 ^c)
	AUC ratio ^d					3.03
Day 7	Control	89.6 ± 40.7	0.333 ± 0.144	12.8 ± 7.2		113 ± 76
	CsA	111 ± 47	0.333 ± 0.144	8.04 ± 2.11	3.69 ± 0.80	157 ± 60
	R ₀ ' value ^c					1.00 (1.00 ^c)
	AUC ratio ^d					1.36

*Significantly different from control ($p < 0.05$)

**Significantly different from control ($p < 0.01$)

^aMean ± S.D. in 3 to 4 rats.

^bPlasma concentration of CsA at 5 min after oral administration of pravastatin.

^cEstimated by Eq. 5. R₀' values in parenthesis were calculated assuming that the unbound fraction of CsA was 0.01.

^dEstimated as ratio of geometric mean of AUC in CsA-treated rats to that in vehicle-treated (control) rats.

TABLE 4

Pharmacokinetic parameters of pravastatin (30 mg/kg) in rats at 1 day after intravenous administration of CsA or vehicle alone in ABT-pretreated and ABT non-treated rats^a

	C _{max}	T _{max}	CL/F ($\times 10^3$)	AUC	CsA ^b	M1 ^b	AUC ratio ^c	R ₀ '-value ^d	
	nmol/L	h	mL/min/kg	nmol·h/L	nmol/L	nmol/L		CsA	M1
Control	55.8±17.2	0.375±0.144	16.7±6.7	76.6±33.7				1	1
CsA	77.8±38.7	0.438±0.125	8.47±4.41	177±124	27.6 ± 3.40	0.693±0.218	2.31	1.00 (1.00 ^d)	1.00
ABT	91.0±46.3	0.438±0.125	8.46±4.35	163±81.3				1	1
CsA+ABT	215±110	0.438±0.125	3.39±1.77	409±205	50.4 ± 4.80	1.09±0.520	2.31	1.00 (1.01 ^d)	1.00

^aMean ± S.D. in 3 to 4 rats. Dose of CsA and ABT were 0.5 and 50 mg/kg, respectively.

^bPlasma concentration of CsA or M1 at 5 min after oral administration of pravastatin.

^cEstimated as ratio of geometric mean of AUC in CsA to control group and that in CsA+ABT to ABT group.

^dEstimated by Eq. 5. R₀' values in parenthesis were calculated assuming that the unbound fraction of CsA was 0.01.

第3節 考察

本章では、時間依存的かつ持続的な OATP 阻害作用を有する CsA について、*in vitro* から *in vivo* の DDI 予測について検証した。

CsA 投与後 1 日において pravastatin 及び midazolam を同時に経口投与したときの pravastatin の血漿中濃度は、いずれの投与量の CsA 投与群においても媒体投与群と比較し、上昇した (Table 1)。一方で、midazolam の血漿中濃度は CsA 投与群と媒体投与群で同程度であった (Table 1)。ラットにおける pravastatin の腎クリアランスは全身クリアランスに比べると非常に小さいことから (Imaoka *et al.*, 2013)、CsA 投与における pravastatin の AUC の上昇は主に肝クリアランスの低下が原因であると考えられた。しかし、可逆的阻害に基づく DDI 予測式から算出される AUC の上昇率 (R_0 値) は 1.00–1.05 であり、DDI 試験における AUC 比と比較して著しく低かった (Table 1)。そこで、この原因の一つに血漿タンパクに結合した CsA による Oatp 阻害が考えられたため、ラット肝細胞を用いて KH buffer (血清非存在下) 条件とラット血清条件で pravastatin の取り込み阻害試験を実施した。KH buffer 条件で算出された CsA の IC_{50} 値 (0.0843 μ M) は、ラット血清条件で非結合形の CsA 濃度基準で算出した IC_{50} 値 (0.0482 μ M) と同等であった。従って、血漿中の CsA による pravastatin の取り込み阻害は主に非結合形が関与していることが示唆された。次に、*in vivo* 試験では CsA の代謝物が生成される一方で、*in vitro* 試験では CsA の代謝物を含めた Oatp 阻害を評価できないことに着目し、CsA の代謝物による Oatp 阻害の可能性について検討した。CsA の主代謝物である M1 の IC_{50} 値 (0.158 μ M) は、0.5 mg/kg の CsA 投与後 1 日における血漿中非結合形 M1 濃度 (0.693–1.09 nM) に比べて高かった。さらに、DDI 試験では M1 以外に様々な代謝物が存在するため、M1 を含む CsA 代謝物による Oatp 阻害の可能性を網羅的に検証する目的で、非選択的な P450 阻害剤である ABT を CsA 投与前に投与し、CsA の代謝物の生成を抑制した条件において pravastatin の薬物動態を評価した。ABT 投与群における CsA の血漿中濃度は ABT 非投与群に比べて上昇し、ABT 投与群 CsA 投与群における

pravastatin の AUC は、ABT 投与群 CsA 非投与群の AUC に比べて 2.31 倍であった。一方で、 R_0' 値は 1.00 であった。従って、CsA の代謝物が Oatp を阻害することで pravastatin の血漿中濃度を上昇させている可能性も低いと考えられた。

CsA による Oatp 阻害を非結合形 CsA のみで説明できる可能性が示された一方で、ラットにおける pravastatin の体内動態は肝臓に発現する Oatp 以外に消化管に発現する Oatp1a5、Oatp2b1 及び multidrug resistance-associated protein (Mrp2) も関与することが報告されている (Shirasaka *et al.*, 2011, Kato *et al.*, 2010)。また、阻害剤である CsA は Oatp 以外にも Mrp2 を阻害し (Nakanishi *et al.*, 2011)、臨床における pravastatin と CsA の DDI の PBPK モデル解析では、小腸における pravastatin の吸収量を 2 倍にした場合に、血漿中濃度のシミュレーションが実測値と近い推移を示すと報告されている (Varma *et al.*, 2012)。そこで、本検討では CsA による小腸の Mrp2 阻害の影響を最小化するために CsA を静脈内投与した。CsA 静脈内投与後 1 日における血漿中 CsA 濃度 (7.01–399 nM) は、ラット Mrp2 に対する CsA の IC_{50} 値 (5 μ M) (Nakanishi *et al.*, 2011) に比べると非常に低かった。従って、CsA 静脈内投与後の pravastatin の血漿中濃度の上昇に対して、小腸の Mrp2 阻害が関与している可能性は低いと推察された。

Rifampicin 投与後 1 日における R_0' 値と pravastatin の AUC 比は同等であり、rifampicin 静脈内投与後 5 分における R_0' 値は pravastatin の AUC の上昇に比べて低い値を示した (Table 2)。 R_0' 値は、肝臓の Oatp 阻害のみに基づいて血漿中濃度の上昇を予測する値であるが、pravastatin は肝細胞に取り込まれた後、胆管膜側に発現する Mrp2 によって胆汁中に排泄される (Yamazaki *et al.*, 1996; Matsushima *et al.*, 2005)。Mrp2 に対する rifampicin の IC_{50} 値は 20.2 μ M であり、この IC_{50} 値は rifampicin 投与後 1 日における血漿中濃度 (0.187 μ M) よりも高かった (Table 1)。一方で、10 mg/kg 及び 25 mg/kg の rifampicin 投与後 5 分における rifampicin の血漿中濃度は 9.9 及び 31.0 μ M であり (Table 2)、Mrp2 の IC_{50} 値に近い値であった。これまでに、Mrp2 欠損ラットに [14 C]dehydropravastatin を投与したとき、

[¹¹C]dehydropravastatin の全身クリアランスが低下することが報告されていることから (Shingaki *et al.*, 2013)、rifampicin 静脈内投与後 5 分に pravastatin を経口投与したときの pravastatin の AUC の上昇が R₀'値に比べて高かった理由として、肝臓の胆管膜側に発現する Mrp2 阻害の可能性が示唆された。一方で、CsA 静脈内投与後 1 日における血漿中 CsA 濃度 (7.01–399 nM) は、Mrp2 の IC₅₀ 値 (5 μM) に比べると非常に低かったことから (Nakanishi *et al.*, 2011)、本検討において CsA が肝臓の胆管膜側に発現する Mrp2 を阻害している可能性は低いと推察された。これまでに rifampicin に関して持続的な Oatp 阻害作用は報告されていないことから、持続的な Oatp 阻害作用を有する CsA と異なり、rifampicin では R₀'値から半定量的に予測可能であると推察された。

本検討では、CsA 投与後 3 日まで pravastatin の AUC が有意に上昇した (Fig. 3, Table 3)。これまで、CsA による持続的な OATP 阻害は主に肝細胞や OATP 発現細胞を用いた *in vitro* 試験で報告されており、*in vivo* 試験ではラットを用いて liver uptake index 法の結果が報告されているのみであった (shitara *et al.*, 2007)。臨床 DDI 試験は DDI の最大のリスクを評価可能なデザインとするために、OATP 基質と阻害剤を同時に投与することが推奨されており、CsA をプレ投与した条件で OATP 基質のみを投与した臨床 DDI 試験はこれまでに報告されていない。本研究は初めて CsA による長時間持続的な Oatp 阻害の存在を *in vivo* で示した。

CsA による長時間持続的な OATP 阻害のメカニズムは明らかとなっていないが、OATP の活性を変化させる要因の一つに翻訳後修飾が報告されている。例えば、OATP は細胞外ループ上に N-glycosylation サイトを有しており、ラット Oatp1a1 の局在は glycosylation の程度に影響を受け、ヒト OATP1A2 の glycosylation は、形質膜における OATP1A2 の局在に影響する (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005)。また、Powell らはヒト肝細胞において protein kinase C の活性化により形質膜上や細胞内の OATP1B3 の発現量を変化させず、OATP1B3 活性を低下させると報告した (Powell *et al.*, 2014)。さらに、げっ歯類におけるいくつかの Oatp サブファミリーは C 末端に PDZ 配列を有しており、PDZ ドメインを有する PDZK1 は Oatp1a1

の形質膜上での発現に必須とされている (Wang *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2010)。一方で、Shitara らは CsA を投与したラットにおいて形質膜における Oatp1a1 と Oatp1b2 の発現量が変化しないと報告した (Shitara *et al.*, 2009)。これは、本検討において CsA 投与後 1、3 及び 7 日において pravastatin の CL/F が競合/非競合阻害を想定した式 (1) で説明可能であったことと一致する。従って、CsA は Oatp の翻訳後修飾や発現の安定化に関与するたんぱく質へ影響し、長時間持続的に Oatp を阻害する可能性は低いと推察された。

以上より、 R_0 '値が DDI 試験における AUC の上昇率を過小評価する原因として、 R_0 '値の計算に用いている *in vitro* 試験の IC_{50} 値が *in vivo* の K_i 値 ($K_{i, in vivo}$) と大きく乖離している可能性が考えられた。そこで、CsA 投与後 1 日における pravastatin の CL/F と血漿中非結合形 CsA 濃度をもとに、式 (1) より $K_{i, in vivo}$ 算出した。 $K_{i, in vivo}$ は 0.0105 nM であり、*in vitro* 試験の IC_{50} 値 (0.0482–0.0843 μ M) に比べて 1/1000 以下であった。この *in vitro* と *in vivo* の阻害定数の 1000 倍以上の乖離は、CsA の DDI を可逆的阻害に基づいた DDI 予測式に当てはめていることが原因と考えられたことから、時間依存的及び持続的 OATP 阻害作用を有する薬物の DDI を従来の DDI 予測式を用いて定量的に予測することは困難であると考えられた。

第3章 チロシンキナーゼ阻害剤 pazopanib による短時間持続的な OATP1B1 阻害

第1節 緒言

これまでに OATP1B1 阻害剤の K_i 値及び $I_{u,inlet,max}$ からなる DDI 予測式は、臨床 DDI 試験結果を完全に反映しないことが知られており、最新のガイドライン/ガイダンスの臨床 DDI 試験実施の判断基準を用いても偽陰性を完全には避けられない (Vaidyanathan *et al.*, 2016)。この原因は明らかとなっていないが、OATP1B1 には時間依存的阻害、長時間持続的な阻害、基質依存的阻害などの特徴的な阻害作用が報告されており、DDI 予測式にはこれらの特徴的な阻害形式が反映されていないことが原因と推察される。これまでに、HIV プロテアーゼ阻害剤、HCV 治療剤及びチロシンキナーゼ阻害剤が時間依存的に OATP を阻害すると報告されているが (Shitara *et al.*, 2013; Furihata *et al.*, 2014; Pahwa *et al.*, 2017)、これら薬物の OATP1B1 阻害作用の特徴や臨床における DDI の可能性について、ほとんど報告されていない。

Pazopanib は、VEGFR1-3、PDGFR α 及び β 、c-Kit を阻害する経口投与可能なチロシンキナーゼ阻害剤であり、転移性腎細胞癌及び悪性軟部腫瘍に対する治療薬である (Sonpavde and Hutson, 2007; Sternberg *et al.*, 2010; van der Graaf *et al.*, 2012)。Pazopanib は、CYP1A2、2C8 及び 3A4 の基質であり、OATP1B3 を阻害しないが、Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 及び OATP1B1 を阻害する (Boudou-Rouquette *et al.*, 2016; Khurana *et al.*, 2014)。臨床では、pazopanib との併用による DDI が数例報告されており (Go *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Bennouna *et al.*, 2015; Hamberg *et al.*, 2015)、例えば、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるドセタキセルの AUC は、pazopanib との併用により 1.5 倍上昇した (de Graan *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2014)。そこで、本章では pazopanib による OATP1B1 阻害の特徴を明らかにし、OATP1B1 阻害による DDI の可能性を評価することを目的とした。はじめに、pazopanib の時間依存的及び持続的 OATP1B1 阻害作用を評価した。Pazopanib による時間依存的な OATP1B1 阻害の特徴を明らかにする目的では、pazopanib でプレインキ

ュベーション後の OATP1B1 活性の速度論的解析及び OATP1B1 活性の回復試験を実施した。さらに、時間依存的 OATP1B1 阻害作用を示す CsA との相互作用の有無について、OATP1B1 発現細胞及びヒト肝細胞を用いて評価した。最後に可逆的阻害に基づく DDI 予測式から算出される R (R₁') 値を算出し、臨床において pazopanib が OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性について、評価した。

第2節 結果

3-2-1. Pazopanib による OATP1B1 の時間依存的阻害

Pazopanib による OATP1B1 の時間依存的阻害作用を検証する目的で、典型的な OATP 阻害剤である CsA 及び rifampicin を同時に評価した。HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib と様々な時間 (1-60 分) プレインキュベーションしたとき、 $[^3\text{H}]E_1S$ 及び $[^3\text{H}]E_2G$ の取り込みはプレインキュベーションしない条件と比べて減少し、 IC_{50} 値は 5-60 分のプレインキュベーション時間でほぼ同等であった (Fig. 1A, B, Table 1)。CsA もこれまでの報告と同様にプレインキュベーションすることで IC_{50} 値が低下し、その IC_{50} 値は pazopanib と同様に 5-60 分のプレインキュベーション時間でほぼ同等であった (Fig. 1C, Table 1)。一方で、プレインキュベーション条件下における rifampicin の IC_{50} 値はプレインキュベーションしない条件の IC_{50} 値と同等であった (Fig. 1D, Table 1)。Pazopanib による時間依存的阻害作用はプレインキュベーション時間が 5-60 分で同等であったため、以降の試験におけるプレインキュベーション時間は 30 分とした。

3-2-2. Pazopanib 非存在下における持続的な OATP1B1 阻害

HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib でプレインキュベーションした後に、 $[^3\text{H}]E_1S$ のみを含む transport buffer でインキュベーションした条件において (pre 条件)、 $[^3\text{H}]E_1S$ の取り込みは pazopanib の濃度依存的に減少し、Pre+Co 条件と比較して有意に高く、Co 条件と比較して低かった (Fig. 2A)。CsA の場合、Pre 条件における $[^3\text{H}]E_1S$ の取り込みは Pre+Co 条件と同等であり、Co 条件に比べて低かった (Fig. 2B)。リファンピシンの場合、Pre 条件における $[^3\text{H}]E_1S$ の取り込みは、Pre+Co 条件及び Co 条件と比べて高かった (Fig. 2C)。

3-2-3. Pazopanib による持続的な OATP1B1 阻害の特徴

0.1–10 μM の pazopanib、0.3 μM の CsA 及び 100 μM の rifampicin を含む細胞培養用培地で

HEK293/OATP1B1 細胞をプレインキュベーション後の $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の取り込みは溶媒対照群と比較して減少した (Fig. 3A)。その後、阻害剤を含まない細胞培養用培地に置換して、各設定時間において取り込み試験を実施し、OATP1B1 活性を評価した。Pazopanib とのプレインキュベーションにより減少した $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の取り込みは、時間依存的に上昇し、10 分以内に溶媒対照群と同程度となった (Fig. 3A and B)。CsA とのプレインキュベーションにより低下した $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の取り込みは、阻害剤を含まない細胞培養用培地に置換後 2 時間でも媒体対照群の 71%であった (Fig. 3A)。一方で、rifampicin では $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の取り込みは阻害剤を含まない細胞培養用培地に置換後 3 分以内に溶媒対照群と同程度となった (Fig. 3A)。回帰分析により算出した OATP1B1 活性の回復速度定数 (k_{recovery}) は、1–10 μM の pazopanib の間で同等であった (Table 2)。

HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib とプレインキュベーションした条件における OATP1B1 に対する E_1S の K_m 値及び V_{max} は、溶媒対照群と比較してそれぞれ上昇及び低下した (Fig. 4, Table 3)。また、CsA のプレインキュベーション条件下における OATP1B1 に対する E_1S の K_m 値及び V_{max} は CsA と同様にそれぞれ上昇及び低下した (Fig. 4, Table 3)。一方で、リファンピシンのプレインキュベーション条件下では、 K_m 値及び V_{max} の両方が減少した (Fig. 4, Table 3)。

3-2-4. Pazopanib と CsA による時間依存的な OATP1B1 阻害に対する交互作用

これまでに時間依存的 OATP1B1 のメカニズムの可能性として、CsA では trans-inhibition、チロシンキナーゼ阻害剤では翻訳後の OATP1B1 のリン酸化が報告された (Shitara *et al.*, 2017; Sprowl *et al.*, 2016)。そこで、pazopanib と CsA の時間依存的 OATP1B1 阻害に対する交互作用の可能性を検討する目的で、HEK293/OATP1B1 細胞及びヒト肝細胞を pazopanib 及び CsA とプレインキュベーションさせて、取り込み阻害試験を実施した。 $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の取り込みは、両細胞において pazopanib 又は CsA 濃度依存的に減少した (Fig. 5)。分散分析により算

出した pazopanib と CsA の相互作用に対する p 値は、HEK293/OATP1B1 細胞及びヒト凍結肝細胞で 0.295 及び 0.178 であった。

3-2-5. Pazopanib の OATP1B1 阻害による DDI 評価

Pazopanib の薬物動態学的パラメータ及び臨床 DDI 試験結果を Table 4 及び 5 に示した。プレインキュベーション条件下において最も低い IC_{50} 値 ($0.314 \mu\text{M}$) 及び本試験で算出した pazopanib の $f_{u,p}$ (0.00018) を用いて式 (5) より算出した R_1 値は 1.09 であった (Table 4)。

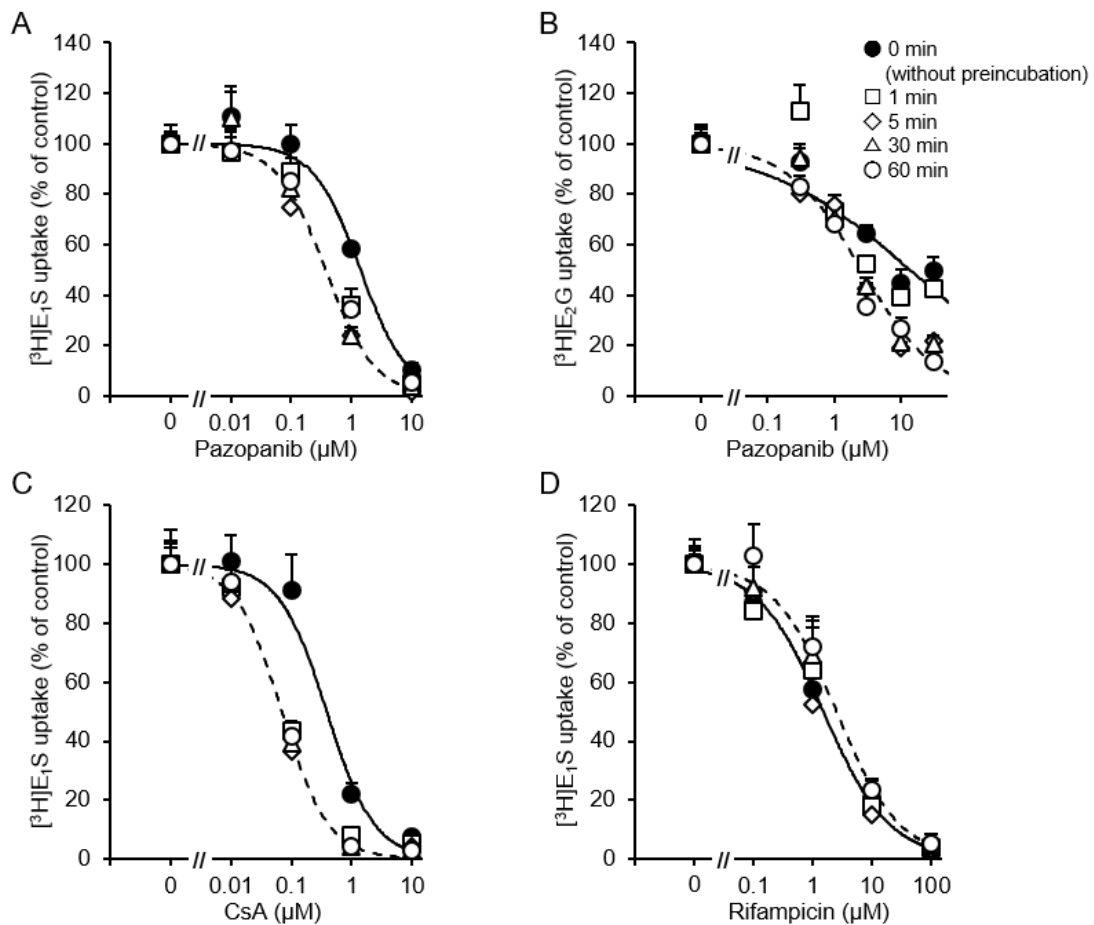


Fig. 1. Uptake activity of OATP1B1 after preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with various concentrations of pazopanib (A, B), CsA (C), and rifampicin (D) for a designated time periods (1–60 min). After the preincubation, the medium was removed, and the cells were further incubated with the buffer including each inhibitor and [³H]E₁S (A, C, D) or [³H]E₂G (B) for 0.5 min. Cells were washed, and radioactivity associated was determined. Uptake of [³H]E₁S and [³H]E₂G in HEK293/mock cells was under detection limit. Solid and dashed lines represent inhibition curves under the condition without preincubation (both inhibitors and substrate were simultaneously added) and with preincubation for 30 min, respectively. Data are shown as percentage mean uptake values ± S.E. (*n* = 3–9) compared with those without preincubation.

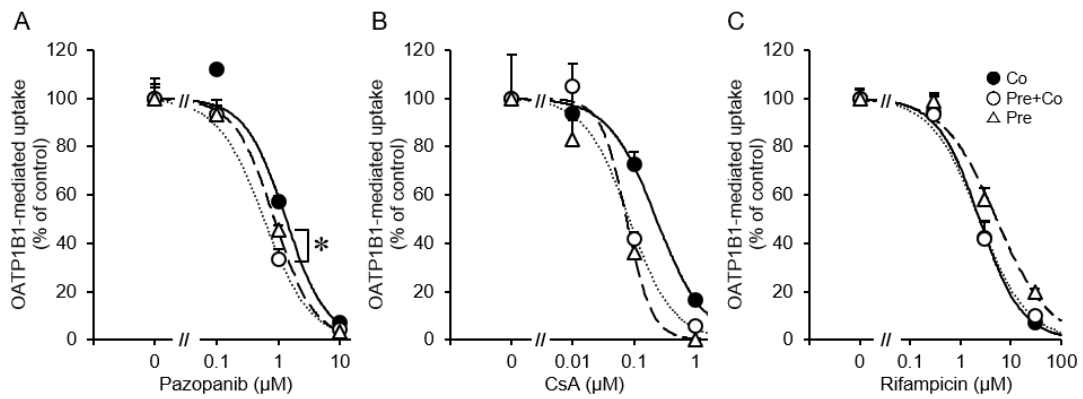


Fig. 2. Uptake of $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ by OATP1B1 under the condition of coincubation (Co), pre+coincubation (Pre +Co), and preincubation alone (Pre) with inhibitors.

Under the coincubation condition (Co, closed circles), HEK293/OATP1B1 cells were preincubated without inhibitor for 30 min, and then incubated with $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ and indicated concentration of pazopanib (A), CsA (B), and rifampicin (C) for 0.5 min. Under the pre+coincubation condition (Pre+Co, open circles), the cells were preincubated with pazopanib, CsA, and rifampicin for 30 min, and the medium was replaced with the buffer containing each compound and $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$, followed by further incubation for 0.5 min. Under the preincubation condition (Pre, open triangles), the cells was preincubated. Data are shown as percentage mean uptake values \pm S.E. ($n = 6$) compared with those without preincubation.

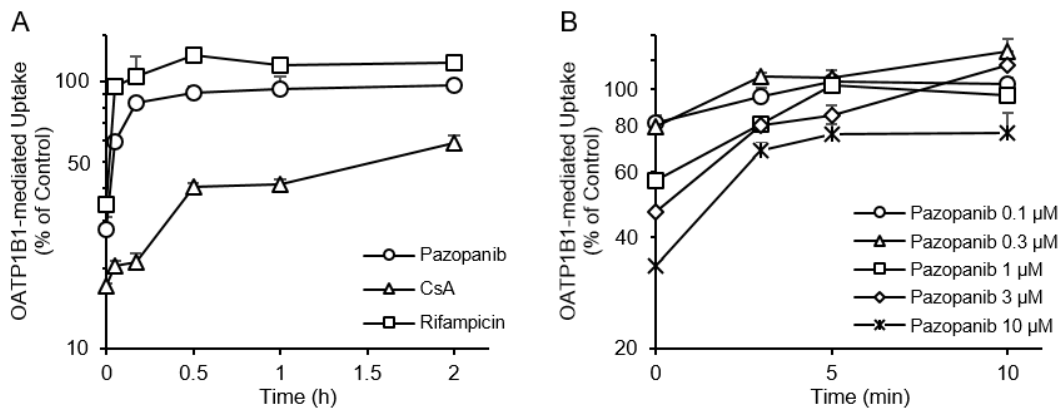


Fig. 3. Recovery of OATP1B1 activity after preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin.

In panel (A), HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with pazopanib (10 μM, ○), CsA (0.3 μM, Δ), and rifampicin (100 μM, □) for 30 min, washed, and further incubated in the absence of each inhibitor for the designated periods. In panel (B), HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with designated concentration of pazopanib for 30 min, washed, and further incubated in the absence of pazopanib for the designated periods. Then, the medium was replaced with the buffer containing [³H]E₁S and further incubated for 0.5 min. Cells were washed, and radioactivity associated was determined. Data were normalized by the control value obtained without the inhibitor and shown as mean ± S.E. (*n* = 3).

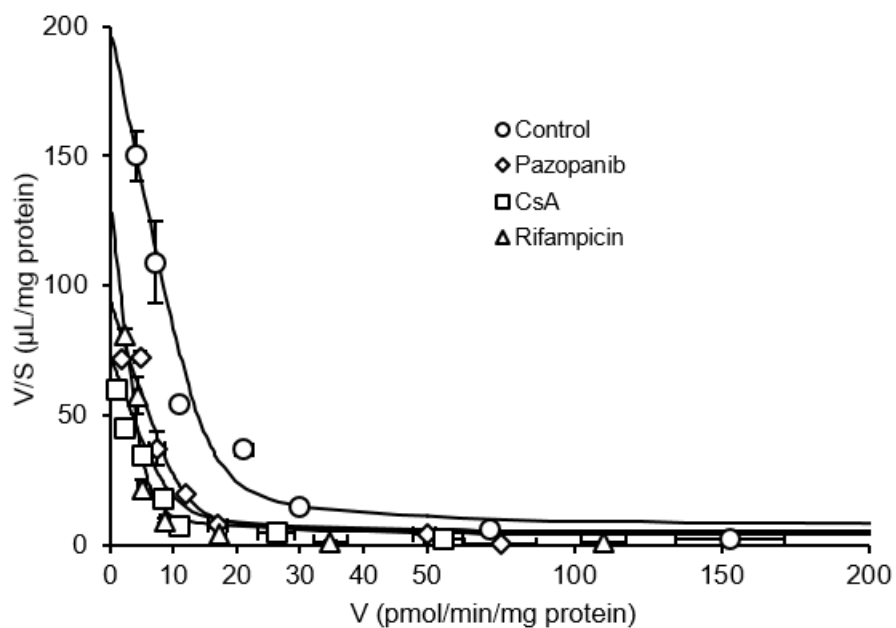


Fig. 4. Eadie-hofstee plot for OATP1B1-mediated uptake of E₁S after preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubation with vehicle (○), 1 μM pazopanib (◇), 0.1 μM CsA (□), and 3 μM rifampicin (Δ) for 30 min, followed by washing the cells and further incubation with [³H]E₁S in the presence of various concentrations of unlabeled E₁S, but not the inhibitor for 0.5 min. Cells were washed, and radioactivity associated was determined. Each point represents the mean ± S.E. (*n* = 3).

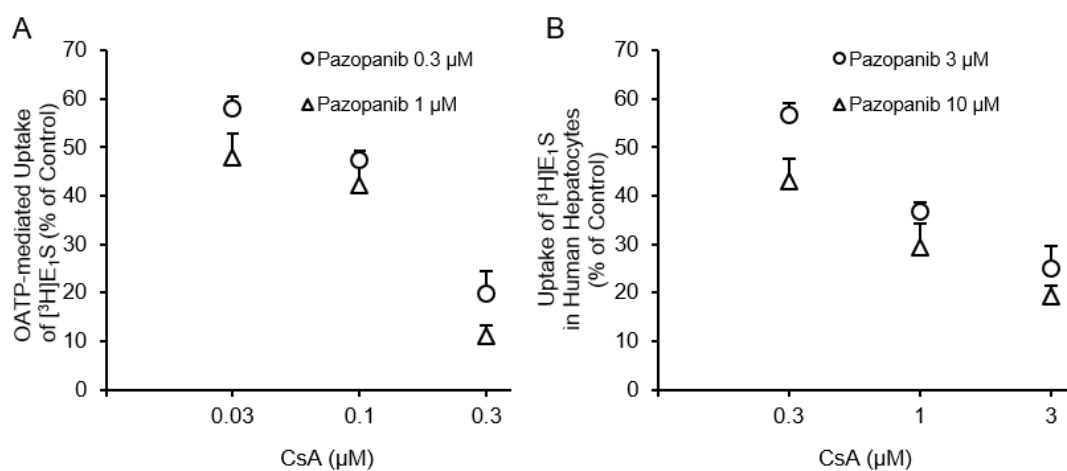


Fig. 5. Interaction between pazopanib and CsA in their inhibitory effect on uptake of [³H]E₁S in HEK293/OATP1B1 cells (A) and human hepatocytes (B).

HEK293/OATP1B1 cells (A) and human hepatocytes (B) were preincubation with a mixture of pazopanib and CsA at the designated concentration, followed by washing the cells and further incubation with [³H]E₁S for 0.5 min. Cells were washed, and radioactivity associated was determined. Data were normalized by the control value obtained without the inhibitor and shown as mean ± S.E. (*n* = 3).

TABLE 1

Effect of preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin on OATP1B1-mediated uptake

Preincubation period (min)	IC ₅₀ value (μM) ^a										
	Inhibitors	Pazopanib		Pazopanib			CsA		Rifampicin		
	Substrates	[³ H]E ₁ S		[³ H]E ₂ G			[³ H]E ₁ S		[³ H]E ₁ S		
0		1.42	± 0.23	13.5	± 6.0	0.383	± 0.128	1.50	± 0.13		
1		0.594	± 0.030	7.25	± 0.53	0.0755	± 0.0234	1.67	± 0.26		
5		0.314	± 0.028	2.27	± 0.74	0.0594	± 0.0167	1.19	± 0.07		
30		0.374	± 0.074	2.58	± 0.77	0.0692	± 0.0160	2.51	± 0.10		
60		0.530	± 0.022	2.03	± 0.71	0.0759	± 0.0154	2.87	± 0.45		

^a IC₅₀ values were estimated based on the data shown in Fig. 1 by a nonlinear least-squares regression analysis (parameter estimate ± 4 parameter S.D., *n* = 3-9).

TABLE 2 k_{recovery} values after preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin

Inhibitors	Concentration (μM)	k_{recovery} (h^{-1}) ^a
Pazopanib	0.1	>3.31
	0.3	>6.26
	1	6.99
	3	7.16
	10	5.62-9.46 ^b
CsA	0.3	0.546
Rifampicin	100	>20.4

^a The k_{recovery} was calculated by replotting the data shown in Fig. 3 into sigma-minus plot in logarithmic scale, followed by linear regression analysis.

^b The values of 5.62 and 9.46 were obtained from Fig. 3A and 3B, respectively.

TABLE 3

Effect of preincubation with pazopanib, CsA, and rifampicin on kinetic parameters for OATP1B1-mediated uptake of [³H]E₁S^a

	V _{max} pmol/min/mg protein	K _m nM	PS _{dif} μL/min/mg protein
Control	15.0 ± 2.7	38.9 ± 13.5	15.4 ± 1.9
Pazopanib	11.7 ± 2.8	64.4 ± 25.7	7.23 ± 1.49
CsA	9.33 ± 1.99	67.8 ± 22.9	9.66 ± 1.28
Rifampicin	5.56 ± 0.63	21.7 ± 3.83	10.4 ± 0.8

^a Values represent parameter estimate ± parameter S.D. (*n* = 3).

TABLE 4Calculation of R_1' value for pazopanib

Pharmacokinetic parameters		Units	References
I_{in}	92.8	μM	Votrient Tablets, 2009
k_a	0.00968	min^{-1}	Votrient Tablets, 2009
$F_a F_g$	0.247		Votrient Tablets, 2009
Dose	30.5	$\mu\text{mol/kg}$	Votrient Tablets, 2009
Q_h	97	L/h/70kg	Yang <i>et al.</i> , 2007
R_B	0.59		Votrient Tablets, 2009
IC_{50}	0.314	μM	Table 1
$I_{in,max}$	95.3	μM	Calculated by Eq. 7
$f_{u,p}$	0.00018		Obtained in the present study
R_1' value	1.09		Calculated by Eq. 5

TABLE 5

Summary of pazopanib-induced drug interactions

Substrates	Dose	AUC ratio	C _{max} ratio	Major elimination route	Comments	References
Midazolam	3 mg	1.32	1.29	CYP3A		Goh <i>et al.</i> , 2010
Dextromethorphan	30 mg	1.33–1.64	-	CYP2D6		Goh <i>et al.</i> , 2010
Caffeine	200 mg	1.00	0.98	CYP1A2		Goh <i>et al.</i> , 2010
Warfarin	10 mg	0.82	1.03	CYP2C9		Goh <i>et al.</i> , 2010
Omeprazole	40 mg	0.81	0.84	CYP2C19		Goh <i>et al.</i> , 2010
Docetaxel	50 mg/m ²	1.50	1.47	OATP1B1, CYP3A		Hamberg <i>et al.</i> , 2015
Paclitaxel	80 mg/m ²	1.26	-	CYP2C8, CYP3A		Tan <i>et al.</i> , 2010
Simvastatin ^a	-	N.D.	N.D.	OATP1B1, CYP3A	ALT ≥ 3 Odds ratio (2.2) ^b	Xu <i>et al.</i> , 2012
Atorvastatin ^a	-	N.D.	N.D.	OATP1B1, CYP3A	ALT ≥ 3 Odds ratio (1.3) ^b	Xu <i>et al.</i> , 2012
SN-38	120 mg/m ²	1.89	-	OATP1B1, UGT1A1		Bennouna <i>et al.</i> , 2015

^a Dose were not described in the report.^b ALT: Alanine aminotransferase.

第3節 考察

Pazopanib は *in vitro* 試験において OATP1B1 を阻害する一方で OATP1B3 を阻害せず、臨床において OATP1B1 基質との併用でその血漿中濃度を上昇させることが報告されていることから (Goh *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Bennouna *et al.*, 2015; Hamberg *et al.*, 2015)、典型的な OATP 阻害薬である CsA 及び rifampicin を対照薬として用い、pazopanib の OATP1B1 阻害の特徴及び臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性について評価した。まず、OATP1B1 阻害の特徴的なメカニズムである時間依存的な阻害及び長時間持続的な阻害作用に着目し、これらの阻害作用について評価した。HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib 含有の transport buffer でプレインキュベーションした条件における³H]E₁S の取り込みは、プレインキュベーションしない条件と比較して減少し (Fig. 1A)、プレインキュベーション条件下における pazopanib の IC₅₀ 値は 5-60 分のプレインキュベーション時間で同等であった (Table 1)。また、CsA も pazopanib と同様の OATP1B1 阻害プロファイルを示した (Table 1)。従って、時間依存的な OATP1B1 阻害は、阻害剤の曝露が非常に短時間でも起こることが明らかとなった。MHLW ガイドラインでは、OATP 阻害の評価は最低でも 30 分以上のプレインキュベーション条件下で実施することを推奨している。本検討では 5-60 分のプレインキュベーション時間における IC₅₀ 値は同等であったことから、ガイドラインで記載されている 30 分以上のプレインキュベーションは OATP1B1 阻害の最大のリスク評価においては十分な時間である一方で、30 分よりも短いプレインキュベーション条件の試験も妥当あることが示唆された。

HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib、CsA 及び rifampicin で 30 分プレインキュベーション後に、阻害剤を含まない³H]E₁S 含有の transport buffer でインキュベーションしたとき (Pre 条件) の³H]E₁S の取り込みは、プレインキュベーション時の阻害剤濃度依存的に減少した (Fig. 2)。Shitara らは数理モデルを用いて CsA が細胞の外側からだけでなく内側からも OATP1B1 を阻害する可能性を報告している (Shitara *et al.*, 2017)。Pazopanib は、

HEK293/OATP1B1 細胞に時間依存的に取り込まれ、細胞内濃度は約 30 分で定常状態になる (Ellawatty *et al.*, 2018)。本検討において、pazopanib の IC₅₀ 値はプレインキュベーション時間が 0 分から 5 分にかけて低下したことから、pre 条件下において OATP1B1 が阻害された可能性の一つとして細胞内の pazopanib が内側から OATP を阻害している可能性が示唆された。また、薬物トランスポーターの活性が競合/非競合阻害以外にもリン酸化により制御されることも報告されている。例えば、多くのチロシンキナーゼ阻害剤は OCT2 のチロシンのリン酸化に関与する Src ファミリーのキナーゼ Yes1 を阻害することで、OCT2 の機能を低下させ (Sprowl *et al.*, 2016)、プロテインキナーゼ C の活性化は OATP1B1 及び 1B3 の活性を低下させることが報告されている (Hong *et al.*, 2015; Powell *et al.*, 2014)。従って、pazopanib の pre 条件下において OATP1B1 が阻害された可能性として、OATP1B1 のリン酸化による OATP1B1 活性の低下も考えられた。

HEK293/OATP1B1 細胞を pazopanib でプレインキュベーション後の OATP1B1 活性は 10 分以内に溶媒対照群と同程度まで回復し、CsA に比べて非常に早かった。(Fig. 3) 従って、pazopanib は CsA と異なり短時間持続的な OATP1B1 阻害薬であることが明らかとなった。また、pazopanib、CsA 及び rifampicin による OATP1B1 阻害の違いを追究する目的で、これら薬物をプレインキュベーション後に E₁S の取り込み試験を行い、速度論的解析を実施した。Pazopanib とプレインキュベーション後の OATP1B1 に対する E₁S の K_m 値及び V_{max} は上昇及び低下した (Table 3)。CsA 及び rifampicin のプレインキュベーション条件下における K_m 値及び V_{max} は rifampicin のプレインキュベーションにより K_m 値が低下した以外、これまでの報告と一致した (Shitara *et al.*, 2012; Pahwa *et al.*, 2017)。OATP1B1 阻害には基質依存性が報告されており、本試験と Pahwa らの試験では評価に用いた基質が異なっていたことから、rifampicin プレインキュベーションによる K_m 値の変化の違いは、評価に用いた基質の違いによると考えられた。

Izumi らはこれまでに、OATP1B1 阻害に基質依存性があることを報告し、OATP1B1 阻害

による DDI 予測の偽陰性のリスクを最小限にするために、 $[^3\text{H}]E_2G$ を *in vitro* 試験の基質として用いることを推奨している (Izumi *et al.*, 2015)。そこで、pazopanib による時間依存的な OATP1B1 阻害試験では $[^3\text{H}]E_1S$ 及び $[^3\text{H}]E_2G$ を用いて評価した。 $[^3\text{H}]E_2G$ で評価したときの pazopanib の IC_{50} 値は、 $[^3\text{H}]E_1S$ で評価したときの IC_{50} 値と比較して高かった (Table 1)。従って、 $[^3\text{H}]E_2G$ は OATP1B1 基質の中で必ずしも最も低い IC_{50} 値が算出される OATP1B1 基質ではないことが明らかとなり、 IC_{50} 値を算出するための阻害試験で用いる OATP1B1 基質の選択には注意する必要がある。

本試験において rifampicin は preincubation 依存的に OATP1B1 を阻害しなかった (Fig. 1D)。Shitara らは、 $[^3\text{H}]E_1S$ を用いて rifampicin が時間依存的に OATP1B1 を阻害しないことを報告した (Shitara *et al.*, 2013b)。一方で、Pahwa らは最近、 $[^3\text{H}]E_2G$ を用いて rifampicin が時間依存的に OATP1B1 を阻害することを報告した。本試験では shitara らと同様に $[^3\text{H}]E_1S$ を基質に用いて評価した一方で、Phawa らは $[^3\text{H}]E_2G$ を基質に用いて評価している。OATP1B1 阻害には基質依存性が報告されていることから、用いた基質の違いが試験結果の違いを生じさせた可能性が推察された。従って、rifampicin が時間依存的な OATP1B1 阻害作用を有するかどうかは、さらに検討する必要がある。

これまで臨床において OATP1B1 基質である docetaxel 及び SN-38 の AUC は pazopanib との併用により、1.5–2 倍上昇することが報告されている (Bennouna *et al.*, 2015; Hamberg *et al.*, 2015)。そこで、pazopanib が臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性について、最も低い IC_{50} 値 (0.314 μM , Table1) を用いて R_1' 値を算出したところ、 R_1' 値は 1.09 であった (Table 4)。従って、pazopanib は臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性が低いと示唆された。Pazopanib は臨床において P450 基質とのカクテル投与試験で CYP1A2、CYP2C9 又は CYP2C19 を阻害せず、CYP2D6 及び CYP3A4 に対して弱い阻害作用を示した (Goh *et al.*, 2010)。また、docetaxel の全身クリアランスは OATP1B1 遺伝子多型 (-1187G>A, c.388G>A, c.521>C) の被検者で有意に変化せず、CYP3A4/5*2 の被検者で減少

した (Yamada *et al.*, 2014; Barker *et al.*, 2009)。従って、pazopanib との併用による docetaxel の AUC の上昇は、OATP1B1 阻害よりも CYP3A4 阻害が原因であると示唆された。SN-38 では、SN-38 及びそのグルクロン酸抱合体の体内動態は UGT1A1 活性又は発現量により変化し (Fujita *et al.*, 2014)、pazopanib は UGT1A1 を阻害することで pazopanib 誘発性の高ビリルビン血漿を誘発することが報告されている (Xu *et al.*, 2010)。従って、pazopanib との併用による SN-38 の AUC の上昇は、UGT1A1 阻害が原因であると示唆され、この仮説は最近 Iwase らによって支持された (Iwase *et al.*, 2019)。一方で、OATP1B1 阻害には基質依存性があることから、pazopanib による docetaxel 又は SN-38 の DDI の可能性について正確に評価するためには、それぞれの基質を用いて pazopanib による取り込み阻害試験を実施したときの K_i 値を用いる必要がある。その他の OATP1B1 基質の DDI に関して、Xu らは pazopanib を投与されている患者の ALT が OATP1B1 基質である simvastatin の投与により上昇することを報告した (Xu *et al.*, 2012)。しかしながら、同論文内において simvastatin の薬物動態の記載がないため、pazopanib と simvastatin の OATP1B1 を介した DDI の可能性については、さらなる検討が必要である。

本章では、pazopanib が時間依存的かつ短時間持続的な OATP1B1 阻害作用を示すことを明らかにし、この阻害作用は代表的な OATP1B1 阻害剤である CsA とは部分的に異なる特徴であった。さらに、pazopanib は臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性が低いと推察された。

第4章 時間依存的 OATP1B1 阻害の新規薬物相互作用予測

第1節 緒言

第2章において、時間依存的及び持続的 OATP 阻害を有する CsA の DDI 予測において、可逆的阻害に基づく DDI 予測式から算出される R 値は DDI を過小評価した。一方で、薬物代謝酵素阻害の場合、可逆的阻害及び時間依存的阻害による DDI 予測では、それぞれ異なる DDI 計算式を用いることが推奨されている。従って、OATP 阻害による DDI 予測においても薬物代謝酵素と同様に時間依存的阻害に適した DDI 予測式を用いることで、これら薬物による DDI の予測確度の向上が期待できる可能性がある。

そこで、本章では時間依存的な OATP1B1 阻害に着目し、この作用を有する薬物による DDI を確度高く予測可能な DDI 予測式の構築を目指した。時間依存的 OATP1B1 阻害作用を有する薬物の臨床 DDI 試験情報は非常に限られているため、その中で最も臨床 DDI 試験の情報が多い CsA を DDI 予測の検証に用いた。OATP1B1 基質には典型的基質である E₁S 及び E₂G と臨床で DDI の報告がある atorvastatin、pitavastatin 及び rosuvastatin を用いた。これまでに、OATP1B1 阻害には基質依存性が報告されていることから (Izumi *et al.*, 2015)、各試験はそれぞれの基質ごとに評価した。本検討では、肝細胞への取り込みに対する OATP1B1 の寄与率を考慮した R 値 (R₀、R₁、R₂ 及び R₃) 及び OATP1B1 の寄与率を 100%とした R' 値 (R₀'、R₁'、R₂' 及び R₃') を算出し、臨床 DDI 試験における AUC 比と比較することで、その予測確度を検証した。R₀ 及び R₀' は、可逆的阻害に基づく DDI 予測式であり、阻害定数は非プレインキュベーション条件下の阻害定数とした。R₁ 及び R₁' は、可逆的阻害に基づく DDI 予測式であり阻害定数はプレインキュベーション条件下の阻害定数とした。R₂ 及び R₂' は、OATP1B1 活性の不活化と回復パラメータからなる予測式とした。R₃ 及び R₃' は、可逆的阻害及び不活化と回復パラメータの両方を含む予測式とした。また、CsA 以外に時間依存的 OATP1B1 阻害作用を示した薬物 (asunaprevir、regorafenib、nilotinib、asunaprevir) についても同様に R 値及び R' 値を算出し、これら薬物の DDI の可能性について評価した。

第2節 結果

4-2-1. 様々な基質の取り込みに対する CsA の時間依存的 OATP1B1 阻害

第3章より CsA による時間依存的 OATP1B1 阻害作用はプレインキュベーション時間が 5-60 分で同等であったため、本試験におけるプレインキュベーション時間は 30 分とした。HEK293/OATP1B1 細胞を CsA とプレインキュベーションしたときの各基質の取り込みは、プレインキュベーションしなかったときと比較して減少した (Fig. 1)。プレインキュベーション条件下における CsA の IC₅₀ 値は非プレインキュベーション条件下と比較して 4.7-11.0 倍低下した (Table 1)。

4-2-2. CsA による OATP1B1 の不活化

HEK293/OATP1B1 細胞を CsA とプレインキュベーション後に基質のみを含む transport buffer を添加し、その基質の取り込みから OATP1B1 活性の不活化を評価した。CsA プレインキュベーション後の OATP1B1 の残存活性はプレインキュベーション時の CsA 濃度依存的に低下した (Fig. 2)。[³H]E₁S、[³H]E₂G、pitavastatin 及び rosuvastatin を用いて評価したとき、OATP1B1 の残存活性はプレインキュベーション時間 20 秒において著しく低下し、1 分まで直線的に低下しなかった (Fig. 2 A, B, D and E)。一方で、atorvastatin を用いたときの OATP1B1 の残存活性はプレインキュベーション時間 3 分まで直線的に低下した (Fig. 2C)。本試験では 20 秒よりも短いプレインキュベーション時間での評価が困難であるため、[³H]E₁S、[³H]E₂G、pitavastatin 及び rosuvastatin を基質に用いて評価したときの k_{obs,app} は、0-20 秒までの OATP1B1 の残存活性の傾きから算出した。k_{obs,app} とプレインキュベーション時の CsA 濃度をプロットし (Fig. 3)、k_{inact} 及び K_I 値を式 (4) より算出した (Table 1)。

4-2-3. 時間依存的 OATP1B1 阻害の回復

HEK293/OATP1B1 細胞を CsA と 30 分プレインキュベーション後に阻害剤を含まない培

地で培養後の基質の取り込みから、OATP1B1 活性の回復を評価した。0.3 μM の CsA とプレインキュベーション直後の $[\text{^3H}]\text{E}_1\text{S}$ 、 $[\text{^3H}]\text{E}_2\text{G}$ 、atorvastatin、pitavastatin 及び rosuvastatin の取り込みは、それぞれ 26、29、18、36 及び 57%まで減少し、低下した OATP1B1 活性は CsA 除去後の時間依存的に回復した (Fig. 4)。各基質における k_{recovery} は線形回帰により算出し、Table1 に結果を要約した。

4-2-4. 各 R 値による DDI 予測確度の比較

本検討では、CsA の $f_{u,p}$ は *in house* で平衡透析法により評価した値 (0.0107) を使用し、ヒト肝細胞への取り込みに対する OATP1B1 の寄与率 (f) は、これまでの報告の平均値を使用した (Kunze *et al.*, 2014; Izumi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019)。CsA の薬物動態学的パラメータを Table2 に要約した。式 (5) 及び式 (6) より算出した R_0 値は、いずれの基質についても臨床の AUC 比と比較して著しく低かった (Table 1)。また、プレインキュベーション条件下の IC_{50} 値を用いて算出した R_1 値も臨床の AUC 比と比較して著しく低かった (Table 1)。一方で、式 (8) より算出した R_2 値及び式 (11) より算出した R_3 値は、 R_1 値よりも高く、臨床の AUC 比により近い値となった。臨床における OATP1B1 阻害による DDI の最大のリスクを評価する目的で、 f を 1 として R' 値を算出した。 R_1' 値は R_1 値と同程度の値となり、臨床の AUC 比と比較して低かった。一方で、 R_2' 値及び R_3' 値は、それぞれ R_2 値及び R_3 値や臨床 AUC 比よりも顕著に高い値であった (Table 1)。

4-2-5. CsA 以外の時間依存的 OATP1B1 阻害薬の DDI 予測

これまでに、CsA 以外に simeprevir、asunaprevir 及び ritonavir はプレインキュベーションすることで非プレインキュベーション条件下に比べて OATP 阻害作用を増強させたと報告されたが、その阻害作用の増強は CsA に比較して弱かった ((Furihata *et al.*, 2014; Shitara *et al.*, 2013))。また、多くのチロシンキナーゼ阻害剤はプレインキュベーション 15 分において

強い OATP1B1 阻害作用を示したが (Sprowl *et al.*, 2016)、非プレインキュベーション条件下と比較していないために、プレインキュベーションにより阻害作用が増強するかどうかは不明であった。そこで、これら薬物についてプレインキュベーション条件下及び非プレインキュベーション条件下において阻害試験を実施した。本試験で用いた全ての化合物は、プレインキュベーション 30 分において、非プレインキュベーション条件下に比べて $[^3\text{H}]E_1S$ の取り込みを減少させた (Fig. 5)。そこで、特徴的な OATP1B1 阻害作用を示した asunaprevir、regorafenib、nilotinib 及び pazopanib について、CsA と同様の不活化試験及び回復試験を実施し、OATP1B1 阻害による DDI の可能性について評価した。それぞれの試験結果、算出されたパラメータ及び各阻害薬の薬物動態学的パラメータを Fig. 6–8 及び Table 3、4 に示した。Asunaprevir は、非プレインキュベーション条件下において時間依存的に OATP1B1 を阻害し、さらに 30 分以上のプレインキュベーションにより時間依存的に OATP1B1 を阻害した (Table 4)。一方で regorafenib 及び nilotinib は、非プレインキュベーション条件において本試験における最大濃度である $10\ \mu\text{M}$ において、 $[^3\text{H}]E_1S$ の取り込みをわずかに減少させ (それぞれ 25 及び 17% の減少率)、プレインキュベーション条件下において顕著に減少させた。

各阻害剤の R 値及び薬物動態学的パラメータを Table 2 及び 3 に示した。Regorafeni 及び nilotinib の R_0' 値はほぼ 1 であり、 R_1' 、 R_2' 及び R_3' 値は 1.2–1.3 であった。一方で、pazopanib の R_2' 及び R_3' 値は、約 2 であった。Asunaprevir では、これまでに OATP1B1 基質である rosuvastatin との DDI 試験が実施されているため、rosuvastatin の OATP1B1 の寄与率から R 値を算出した。このとき、 R_0 値及び R_1 値は臨床の AUC 比に比べて低く、一方で R_2 及び R_3 値は臨床の AUC 比に近い値であった (Table 2)。

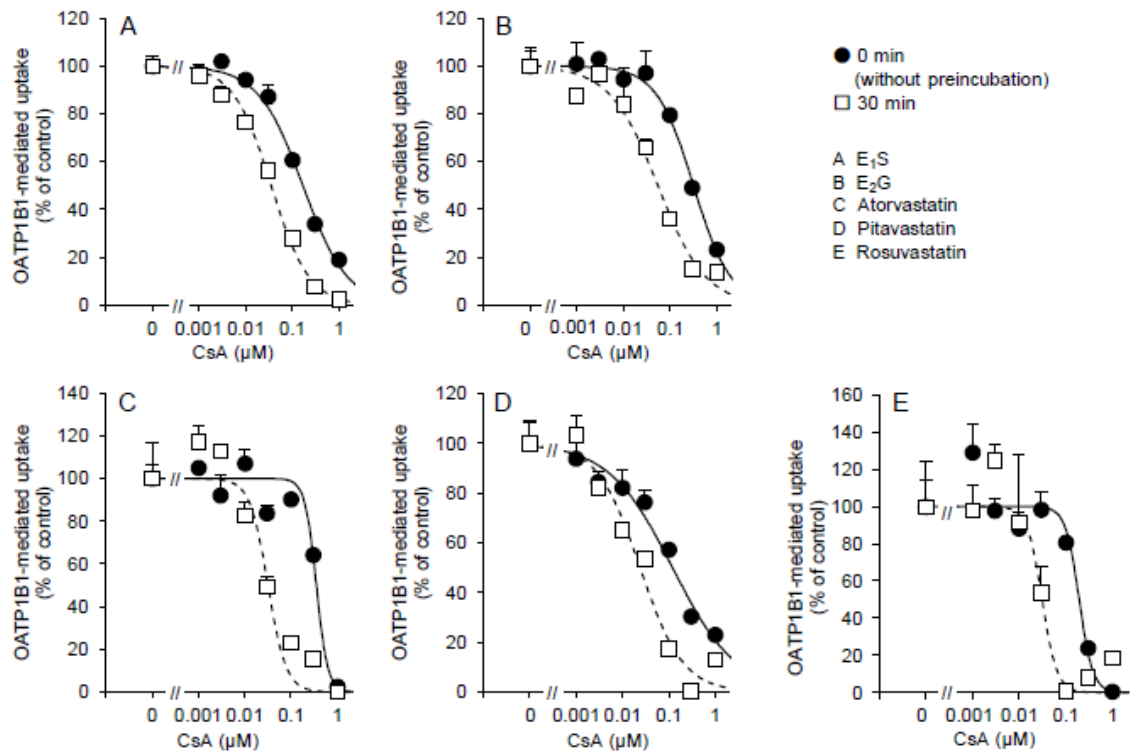


Fig. 1. Inhibition of OATP1B1-mediated uptake of [³H]E₁S (A), [³H]E₂G (B), atorvastatin (C), pitavastatin (D) and rosuvastatin (E) after preincubation with CsA.

The cells were washed with transport buffer prewarmed at 37°C, then pretreated for 5 min with the transport buffer without substrates or inhibitors. The medium was then replaced with the transport buffer containing inhibitors at the various concentrations of CsA, and cells were further preincubated for 0 or 30 min at 37°C. After the preincubation, the transport buffer containing inhibitors was removed, and the reaction was then started by applying prewarmed fresh transport buffer containing [³H]E₁S, [³H]E₂G, atorvastatin (0.3 μM), pitavastatin (0.5 μM) or rosuvastatin (3 μM) and the inhibitors to the cells. At 0.5 min ([³H]E₁S and [³H]E₂G) or 1 min (atorvastatin, pitavastatin, and rosuvastatin), the reaction solution was removed by aspiration, and cells were washed with ice-cold transport buffer. OATP1B1-mediated uptake was obtained by subtracting the uptake in HEK293/mock cells from that in HEK293/OATP1B1 cells. Data are shown as percentage mean uptake volume values ± S.E. (*n* = 3-6) compared with those of the control.

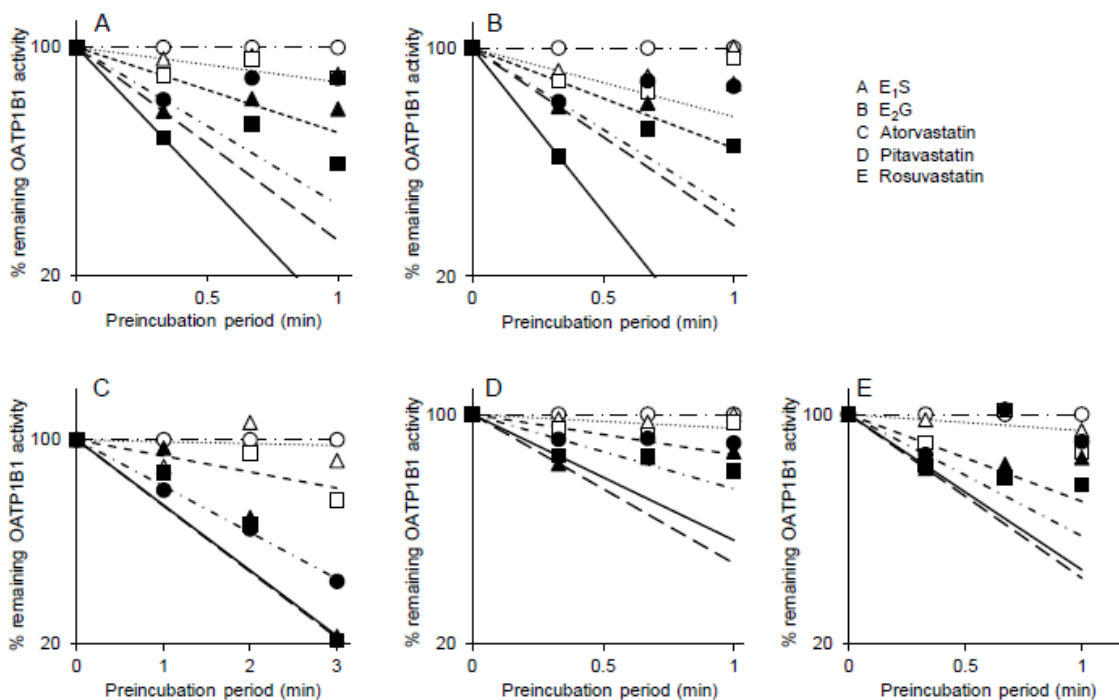


Fig. 2. Inactivation of OATP1B1-mediated transport of [³H]E₁S (A), [³H]E₂G (B), atorvastatin (C), pitavastatin (D) and rosuvastatin (E) after preincubation with CsA

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with CsA at 0 (○), 0.02 (Δ), 0.05 (□), 0.1 (●), 0.2 (▲), and 0.5 μM (■) for [³H]E₁S and [³H]E₂G, 0 (○), 0.005 (Δ), 0.01 (□), 0.02 (●), 0.05 (▲), and 0.1 μM (■) for atorvastatin, pitavastatin, and rosuvastatin for designated period. After preincubation, the cells were once washed with prewarmed transport buffer and incubated with each substrate. At 0.5 ([³H]E₁S and [³H]E₂G) or 1 min (atorvastatin, pitavastatin, and rosuvastatin), the reaction solution was aspirated, and the cells were twice washed with ice-cold transport buffer, followed by determination of their uptake. Uptake values are represented as the percentage of the activity obtained in the vehicle control samples and are plotted versus the preincubation period. Each symbol represents the mean (*n* = 3).

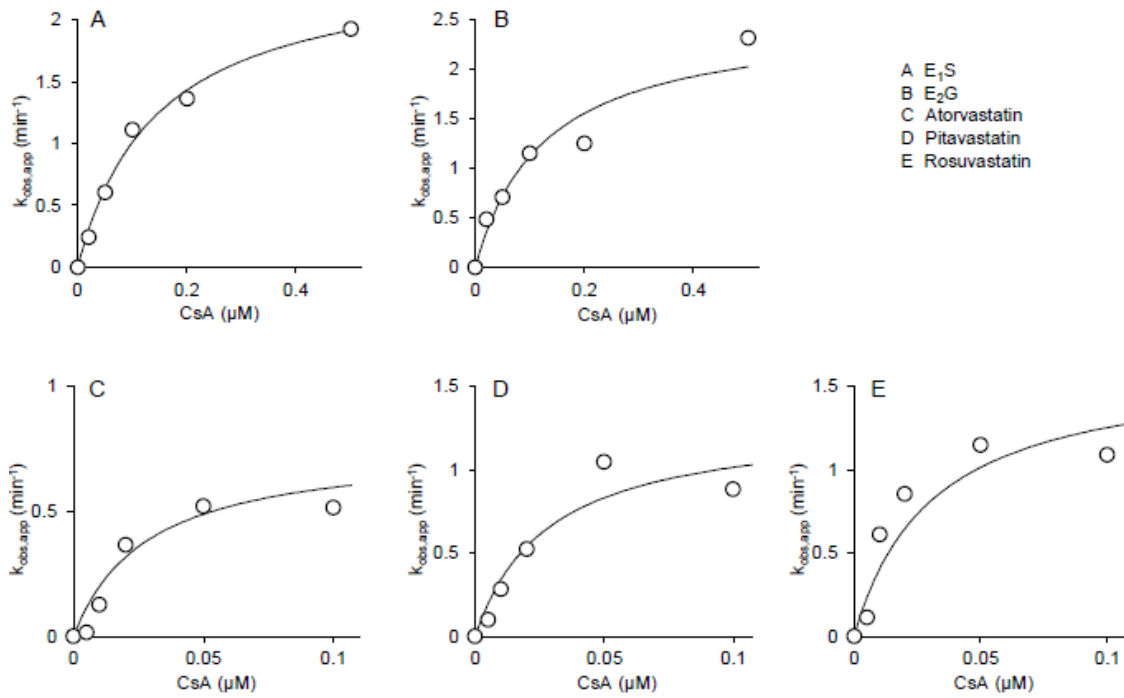


Fig. 3. Observed $k_{obs,app}$ of OATP1B1-mediated transport of $[^3H]E_1S$ (A), $[^3H]E_2G$ (B), atorvastatin (C), pitavastatin (D) and rosuvastatin (E) versus CsA concentration.

The $k_{obs,app}$ values were determined as the negative slopes of the natural logarithm (0 to 20 sec for $[^3H]E_1S$, $[^3H]E_2G$, pitavastatin, and rosuvastatin; 0 to 3 min for atorvastatin) shown in Fig. 2. Solid lines represent the fitting curves of the observed $k_{obs,app}$ versus CsA concentration by nonlinear regression analysis based on Eq. 4.

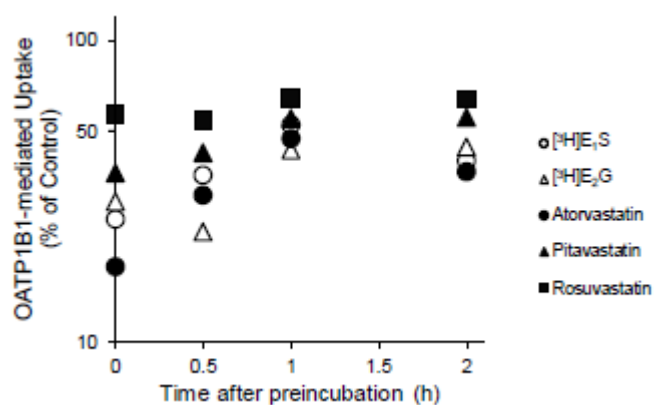


Fig. 4. Recovery of OATP1B1 activity after preincubation with CsA.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with culture medium containing CsA (0.3 μ M) for 30 min. The medium was replaced with fresh culture medium and further incubated in the absence of CsA for designated periods. The cells were then washed with prewarmed transport buffer once, and the transport buffer, including [³H]E₁S (○), [³H]E₂G (△), atorvastatin (●), pitavastatin (▲), and rosuvastatin (■), was added, followed by determination of their uptake. Data are normalized with the control value obtained without the inhibitor and are shown as mean \pm S.E.M. ($n = 3$).

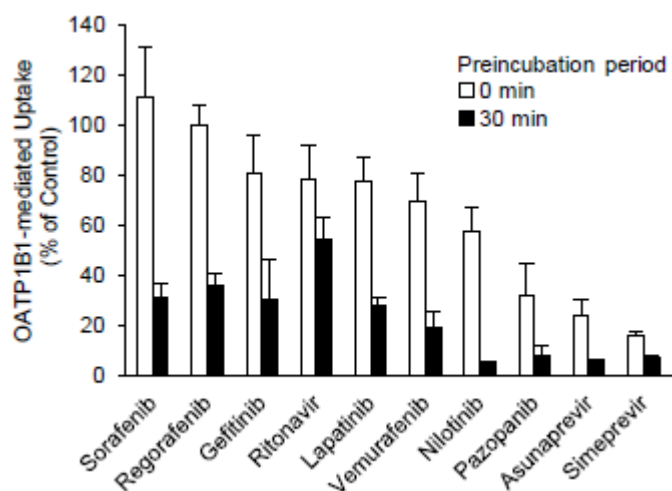


Fig. 5. Screening of preincubation dependent OATP1B1 inhibitors.

HEK293/OATP1B1 and HEK293/mock cells were first preincubated with each compound at 1 μ M for 30 min (closed column) or subjected to no preincubation (open column). Cells were then incubated with [3 H]E $_1$ S and each compound for 0.5 min, followed by determination of OATP1B1-mediated uptake. Data were shown as percentage of OATP1B1-mediated uptake obtained in the vehicle control samples.

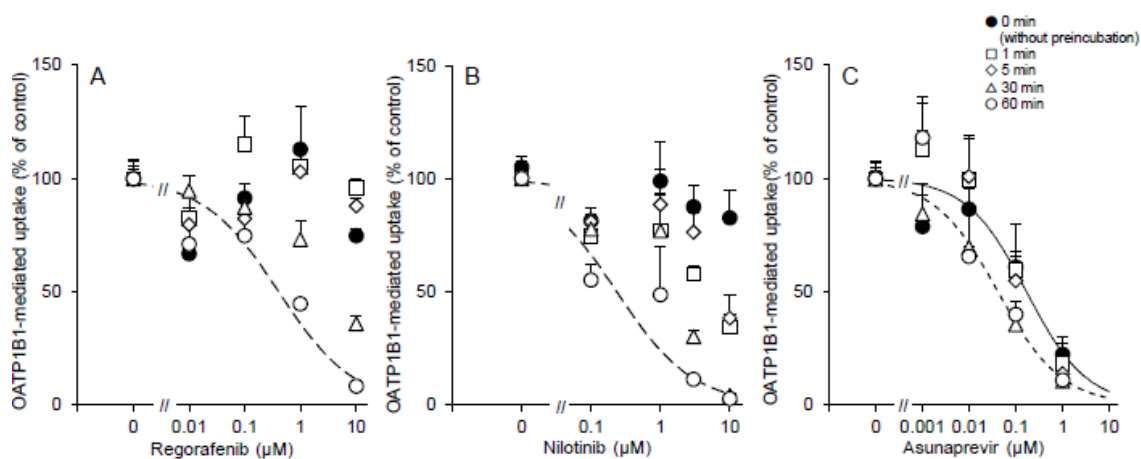


Fig. 6. OATP1B1 activity after preincubation with regorafenib, nilotinib, and asunaprevir.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with various concentrations of regorafenib, nilotinib, and asunaprevir for designated time periods (1-60 min). After the preincubation, the medium was replaced with the buffer containing each compound and [^3H]E $_1$ S, followed by further incubation for 0.5 min and determination of radioactivity associated. Solid and dashed lines represent inhibition curves under the condition without (both inhibitors and substrate were simultaneously added) or with preincubation for 60 min, respectively. Data were shown as mean values \pm S.E. ($n = 3-6$) and compared with those without inhibitors at each preincubation period.

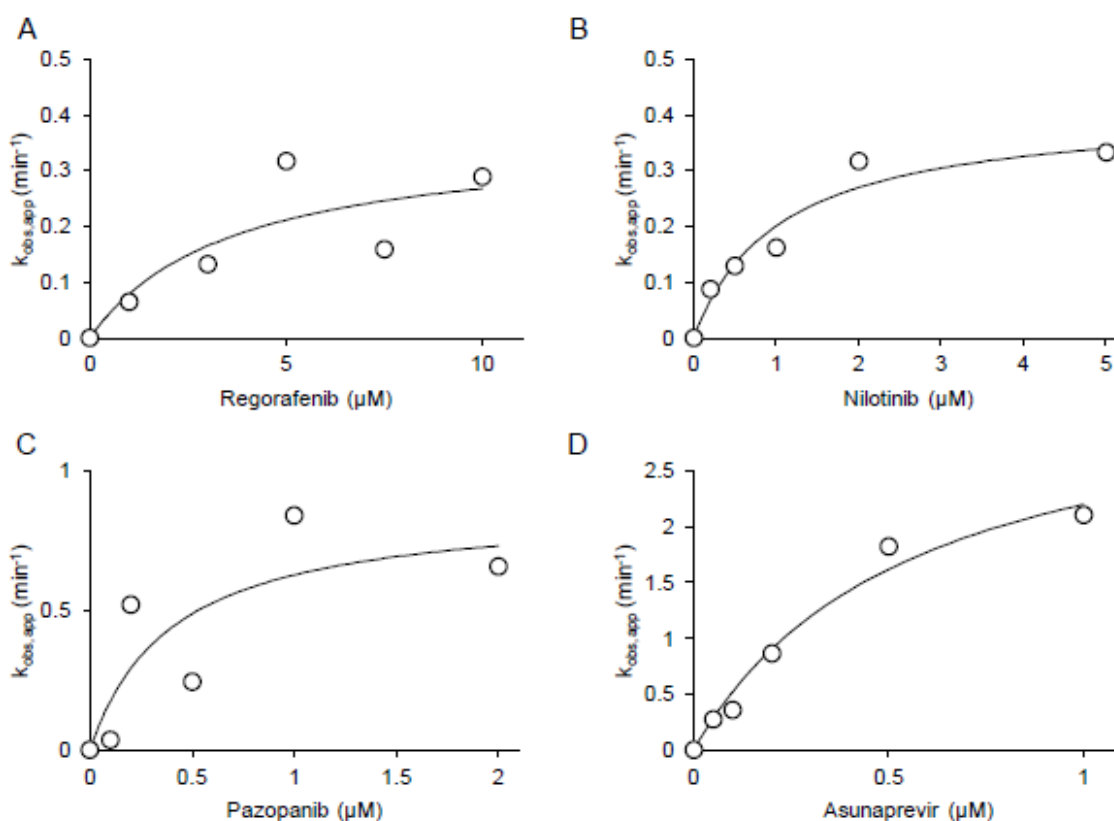


Fig. 7. Observed $k_{obs,app}$ values for OATP1B1-mediated transport of $[^3H]E_1S$ versus OATP1B1 inhibitor concentration.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with regorafenib (A), nilotinib (B), pazopanib (C), and asunaprevir (D) for designed period. After the preincubation, the cells were washed with prewarmed transport buffer and incubated with $[^3H]E_1S$. At 0.5 min, the cells were washed, followed by determination of the associated radioactivity. The $k_{obs,app}$ values were determined as the negative slopes of the natural logarithm. Solid lines represent the fitting curves of the observed $k_{obs,app}$ versus each inhibitor concentration by nonlinear regression analysis based on Eq. 4.

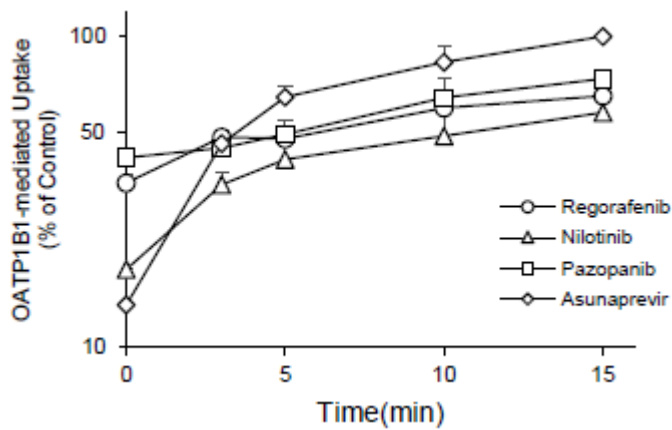


Fig. 8. Recovery of OATP1B1 activity after preincubation with OATP1B1 inhibitors.

HEK293/OATP1B1 cells were preincubated with regorafenib (10 μ M, \circ), nilotinib (1 μ M, Δ), pazopanib (10 μ M, \square), and asunaprevir (5 μ M, \diamond) for 60 min, washed, and further incubated in culture medium without each inhibitor for the designated periods. Then, the medium was replaced with the buffer containing [3 H]E₁S, and cells were further incubated for 0.5 min, followed by determination of radioactivity associated. Data were normalized by the control value obtained without the inhibitor and are shown as mean \pm S.E. (n = 3). Similar data for pazopanib have previously been obtained (Taguchi et al., 2019), but those shown in this figure are obtained in different preparation from the previous ones.

Table 1

Kinetic parameters for inhibition, inactivation, and recovery of OATP1B1 activity, and estimation of DDIs potential of CsA

Substrates	IC ₅₀ (μM)		k _{inact} ^c	k _I ^c	k _{obs} ^d	k _{recovery} ^e	f _{u,p}	I _{u,inlet,max} ^f	f ^g	R ₀	R ₁	R ₂	R ₃	Observed AUC ratio
	Pre(-) ^a	Pre(+) ^b	min ⁻¹	μM	min ⁻¹	min ⁻¹	(CsA)	μM	(R ₁) ^g	(R ₀) ^g	(R ₁) ^g	(R ₂) ^g	(R ₃) ^g	
E ₁ S	0.169	0.0354	2.47	0.145	0.369	0.0122			0.77 1	1.11 (1.15)	1.48 (1.72)	3.93 (31.2)	3.98 (36.0)	-
E ₂ G	0.319	0.0548	2.53	0.126	0.426	0.00798			1	1.08 (1.08)	1.47 (1.47)	54.4 (54.4)	58.7 (58.7)	-
Atorvastatin	0.351	0.0319	0.734	0.0297	0.339	0.0161	0.0107	0.0117	0.8 1	1.06 (1.07)	1.55 (1.80)	4.23 (22.1)	4.28 (23.7)	9.0, 15 ^h
Pitavastatin	0.119	0.0239	1.3	0.0282	0.617	0.00702			0.43 1	1.08 (1.21)	1.29 (2.07)	1.74 (88.9)	1.74 (108)	4.6 ^h
Rosuvastatin	0.193	0.0312	1.64	0.0309	0.74	0.00227			0.82 1	1.10 (1.13)	1.59 (1.82)	5.48 (327)	5.49 (371)	7.1 ^h

^a IC₅₀ values estimated without preincubation.^b IC₅₀ values estimated after 30 min preincubation with CsA.^c Calculated using Eq. 2, based on the data shown in Fig. 3.^d Calculated using Eq. 8.^e Calculated using replotting the data shown in Fig. 4 into sigma-minus plot in logarithmic scale, followed by linear regression analysis.^f Calculated by Eq. 5 based on the data shown in Supplemental Table 1.^g R₀, R₁, R₂, and R₃ values were calculated by assuming f value as unity.^h Yoshida et al., 2012.

Table 2

Pharmacokinetic parameters of preincubation-dependent OATP1B1 inhibitors

Parameters	Inhibitors				
	CsA	Regorafenib	Nilotinib	Pazopanib	Asunaprevir
C_{\max} ($\mu\text{mol/L}$)	0.95 ^{a,b}	5.22 ^g	1.66 ⁱ	92.8 ^k	0.078 ^m
k_a (min^{-1})	0.0152 ^c	0.1 ^h	0.0123 ^j	0.00968 ^k	0.1 ^h
F_aF_g	1 ^d	1 ^d	0.30 ⁱ	0.225 ^k	0.19 ⁿ
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	2.4 ^a	4.73 ^g	10.8 ⁱ	26.1 ^k	3.82 ^m
R_B	1.05 ^e	0.629 ^g	0.68 ⁱ	0.63 ^k	0.55 ⁿ
$f_{u,p}$	0.107 ^f	0.00188 ^g	0.016 ⁱ	0.00018 ^l	0.003 ⁿ
Q_h (L/h/70 kg)			97		

^a Mück et al., 1999^b Blood concentration^c Kawai et al., 1998^d Assumed to be unity^e Zaghoul et al., 1987^f In-house data estimated by equilibrium dialysis method^g Stivarga (regorafenib) Tablets, FDA approval package, 2012^h Assumed to be unityⁱ Tassigna (nilotinib) Oral Capsules, FDA approval package, 2007^j Li et al., 2015^k Votrient (pazopanib hydrochloride) Tablets, FDA approval package, 2009^l Taguchi et al., 2019^m Eley et al., 2015ⁿ Sunvepra (asunaprevir) Capsules, Common technical document, 2014

Table 3

Kinetic parameters for inhibition, inactivation, and recovery of OATP1B1 activity, and estimation of DDIs potential of preincubation-dependent inhibitors

Inhibitors	IC ₅₀ values (μM)		k _{inact} ^d	k _I ^d	k _{obs} ^e	k _{recovery} ^f	I _{u,inlex,max} ^g	R ₀	R ₁	R ₂	R ₃	Observed
	Pre(-) ^a	Pre(+) ^c	min ⁻¹	μM	min ⁻¹	min ⁻¹	μM	(R ₀)	(R ₁)	(R ₂)	(R ₃)	AUC ratio
Regorafenib	>10	0.403	0.365	3.63	0.00757	0.0378	0.0769	(1.01)	(1.19)	(1.21)	(1.22) ⁱ	NA ^j
Nilotinib	>10	0.235	0.411	2.05	0.0154	0.0627	0.0797	(1.01)	(1.34)	(1.25)	(1.26) ⁱ	NA ^j
Pazopanib	1.42 ^b	0.314 ^b	0.856	0.525	0.0422	0.0416	0.0272	(1.02)	(1.09) ^b	(2.01)	(2.05)	1.26 ^k , 1.89 ^l
Asunaprevir	0.17	0.0349	3.51	0.639	0.00565	0.289	0.00994	1.06 ^h (1.05)	1.22 ^h (1.28)	1.43 ^h (1.58)	1.49 ^h (1.67)	1.41 ^m

^a IC₅₀ values estimated without preincubation.^b Cited from Taguchi et al., 2019.^c The lowest IC₅₀ values shown in Supplemental Table 2.^d Calculated by Eq. 4 based on the data shown in Supplemental Fig. 2.^e Calculated by Eq. 10.^f Calculated by replotting the data shown in Supplemental Fig. 3 into sigma-minus plot in logarithmic scale, followed by linear regression analysis.^g Calculated by Eq. 7 based on the data shown in Supplemental Table 1.^h f = 0.82 (Rosuvastatin)ⁱ IC_{50,pre(-)} is assumed to be 10 μM since inhibition did not reach 50% at maximum inhibitor concentration (10 μM).^j Not applicable.^k Hamberg et al., 2015.^l Calculated based on AUC of SN-38 after administration of irinotecan (Bennouna et al., 2015).^m Calculated based on AUC of rosuvastatin (Eley et al., 2015).

TABLE 4

Effect of preincubation with regorafenib, nilotinib, pazopanib, and asunaprevir on OATP1B1-mediated uptake

Preincubation period (min)	IC ₅₀ value (μM) ^a			
	Regorafenib	Nilotinib	Pazopanib ^b	Asunaprevir
0	>10	>10	1.42 ± 0.23	0.170 ± 0.074
1	>10	3.98 ± 1.50	0.594 ± 0.030	0.176 ± 0.041
5	>10	6.88 ± 1.56	0.314 ± 0.028	0.138 ± 0.040
30	4.08 ± 0.48	1.89 ± 0.37	0.374 ± 0.074	0.0349 ± 0.0103
60	0.403 ± 0.234	0.235 ± 0.169	0.530 ± 0.022	0.0415 ± 0.0170

^a IC₅₀ values were estimated based on the data shown in Supplemental Fig. 1 by a nonlinear least-squares regression analysis (parameter estimate ± parameter S.D., *n* = 3-4).

^b Taguchi et al., 2019.

第3節 考察

本章では、時間依存的 OATP1B1 阻害の DDI 予測性に関して、 $I_{u,inlet,max}$ 及び K_i 値からなる可逆的阻害に基づく予測式と OATP1B1 活性の不活化と回復のパラメータからなる予測式を比較検証した。

3 つの OATP1B1 基質に対する CsA の R_1 値は、臨床の AUC 比に比べて顕著に低かったが、 R_2 及び R_3 値では臨床の AUC 比に近い値であり (Table 1)、*asunaprevir* においても同様の傾向が認められた (Table 2)。従って、 R_2 及び R_3 値は、時間依存的 OATP1B1 阻害剤の DDI を定量的に予測するうえで有用な指標になりえると考えられた。

しかしながら、3 つの OATP1B1 基質に対する CsA の R_2 及び R_3 値は AUC 比より低く、DDI を過小評価した。*Atorvastatin* (OATPs、BCRP、P-gp 及び CYP3A の基質)、*pitavastatin* (相対的な OATP1B1 基質) 及び *rosuvastatin* (OATPs、BCRP 及び P-gp の基質) は OATP1B1 の基質であるだけでなく、その他のトランスポーターや薬物代謝酵素の基質である (Prueksaritanont *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2012)。また、CsA は OATP1B1 に対する阻害作用だけでなく、OATP1B3、CYP3A4 及び BCRP に対する阻害作用も有する (Duan *et al.*, 2017)。従って、臨床において *atorvastatin*、*pitavastatin* 及び *rosuvastatin* と CsA の併用では、OATP1B1 以外にも様々なトランスポーターや薬物代謝酵素の DDI が生じている可能性がある。さらに、DDI を過小評価したその他の原因として、OATP1B1 の寄与率 (f) が考えられる。 R_1 、 R_2 及び R_3 値は f 値に大きく影響を受けるが、本検討で用いた f 値は 3 つの論文の平均値であり、実験誤差や個体間変動が生じる可能性が考えられる。この観点から、本検討では DDI の偽陰性を避ける目的で f 値を 1 としたときの R' 値も同様に計算した。 R_2' 及び R_3' 値は AUC 比よりも高く DDI を過大評価する結果となったが、偽陰性に陥ることはなかった (Table 1 及び 3)。従って、 R' 値は医薬品開発において DDI の偽陰性を避けるうえで、有用な指標になりえると考えられた。

本検討では CsA 以外の様々な薬物が OATP1B1 に対して時間依存的阻害を示した。その

中で、regorafenib 及び nilotinib はプレインキュベーション条件下において初めて OATP1B1 阻害作用を示した (Table 4)。従って、OATP1B1 の阻害を評価において、阻害剤をプレインキュベーションする条件は重要であることが明らかとなった。しかし、regorafenib と nilotinib の R' 値は最大で 1.2–1.3 であったことから、これら薬物は臨床において OATP1B1 阻害に基づく DDI を起こす可能性が低いと考えられた。一方で、pazopanib の R_2' 及び R_3' は約 2 であり DDI が起こる可能性が示唆されたが、第 3 章で示したように pazopanib はこれまで臨床において明確に OATP1B1 阻害により AUC が上昇したという報告がないことから、pazopanib が臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性については、今後の臨床研究の結果を期待したい。

Izumi らは、1 時間プレインキュベーション時の CsA の IC_{50} 値が OATP1B1 基質によって 6 倍程度異なることを報告した (Izumi et al., 2015)。そこで、本検討ではそれぞれの基質ごとに OATP1B1 活性の不活化試験及び回復試験を実施した。 k_{inact} 、 k_i 及び $k_{recovery}$ はそれぞれ、基質によって 3.4、5.1 及び 7.1 倍異なり、これらパラメータに関しても基質依存性が認められた。従って、 R_2 (R_2') 又は R_3 (R_3') 値を用いて DDI を予測する際は、不活化試験及び回復試験で使用する基質を統一する必要がある、さらに臨床で実際に使用される OATP1B1 基質薬を用いて評価することが好ましいと考えられた。しかし、実際に臨床で使用される OATP1B1 基質薬すべてを評価することは困難であるが、典型的な OATP1B1 基質である E₂G の R_2 及び R_3 値は E₁S の R_2 や R_3 よりも高かったことから (Table 1)、E₂G は両基質の中では偽陰性をより避けられる基質である可能性が示唆された。

本検討では、阻害試験で用いた基質濃度が K_m 値よりも低かったことから、 IC_{50} 値を K_i 値と仮定して R_0 及び R_1 の計算に利用した。ただし、この仮定は阻害剤が競合阻害/非競合阻害に基づいた阻害作用を示す場合に成り立つため、時間依存的阻害作用を示した CsA の IC_{50} 値が K_i 値と等しいと仮定できない可能性がある。また、CsA による OATP1B1 の不活化速度は非常に早く、特に高い CsA 濃度においては k_{inact} を正確に評価できていない可能性もあ

る。従って、本検討で提案した DDI 予測式が従来の可逆的阻害に基づく DDI 予測式よりも予測精度に優れているかどうかについては、今後さらに検証していく必要がある。

本検討では、時間依存的 OATP1B1 阻害に着目し、従来の可逆的阻害に基づく DDI 予測式と不活化及び回復過程を組み込んだ DDI 予測式の予測確度について、比較検証した。OATP1B1 活性の不活化、回復過程及び OATP1B1 の寄与率を組み込んだ DDI 予測式は従来の DDI 予測式に比べて予測確度が向上し、時間依存的 OATP1B1 阻害の DDI をより定量的に予測可能な指標になりえると考えられた。また、OATP1B1 の寄与率を 1 とすることで、DDI の偽陰性を避けられたため、医薬品開発において開発化合物が時間依存的 OATP1B1 阻害作用を有した場合の最大の DDI リスク評価においても、有用な指標になりえると示唆された。

第5章 総括

薬物相互作用 (DDI) は重篤な副作用や治療効果の減弱などの原因となることから、医薬品開発においてヒトにおける DDI の有無とその程度を予測することは重要である。各局の DDI ガイドライン/ガイダンスでは OATP 阻害に基づく臨床 DDI 試験実施を判断するための DDI 予測式が示されているが、OATP 阻害には基質依存性、時間依存的阻害作用及び長時間持続的な阻害作用があり、実際に現在のガイドラインで示されている DDI 予測式では一部の例で偽陰性になることが報告されている。そこで、本研究では時間依存的な OATP 阻害に着目し確度の高い DDI 予測法の構築を目指した。

第2章では時間依存的及び持続的阻害作用を有する CsA を用いて、可逆的阻害に基づく DDI 予測式から予測した AUC の上昇と非臨床 DDI 試験における AUC の上昇を比較した。*In vitro* 試験から予測した AUC の上昇は非臨床 DDI 試験における AUC の上昇に比べて著しく低かった。この原因は、CsA の代謝物や血漿蛋白に結合した CsA による Oatp 阻害を予測式に組み込んでいないことが原因ではなく、時間依存的及び持続的阻害作用を有する薬物の DDI を可逆的阻害に基づいた DDI 予測式に当てはめていることが原因と考えられ、時間依存的及び持続的 OATP 阻害作用を有する薬物の DDI を可逆的阻害に基づく DDI 予測式を用いて定量的に予測することは困難であると考えられた。

第3章ではプレインキュベーション条件下で強い OATP1B1 阻害作用を有し、臨床において OATP1B1 基質との DDI が報告されている pazopanib の OATP1B1 阻害の特徴と臨床における DDI の可能性を評価した。Pazopanib は CsA と同様に短時間のプレインキュベーションで OATP1B1 に対する阻害作用を増強させ、OATP1B1 の K_m 値と V_{max} を同じように変化させた。一方で、pazopanib とのプレインキュベーションにより低下した OATP1B1 活性は CsA と比較して速やかに回復した。プレインキュベーション条件下で算出した最も低い IC_{50} 値を用いたときの R_1 値は 1.09 であり、pazopanib は臨床において OATP1B1 阻害による DDI を起こす可能性は低いと推察され、さらに CsA と pazopanib との間の OATP1B1 阻害に交互

作用は認められなかった。

第 4 章では、時間依存的阻害作用を有する OATP1B1 阻害薬の確度の高い DDI 予測法の構築を目指した。可逆的阻害に基づく DDI 予測式は、時間依存的 OATP1B1 阻害薬の DDI を著しく過小評価したことから、DDI を偽陰性と判定する可能性が高いことが示唆された。一方で、OATP1B1 活性の不活化、回復パラメータ及び OATP1B1 の寄与率を組み込んだ DDI 予測式は、可逆的阻害に基づく DDI 予測式よりも臨床における AUC の上昇率に近く、より定量的な DDI 予測の指標になりえると示唆された。さらに、OATP1B1 の寄与率を 100%とした DDI 予測式は、OATP1B1 阻害による DDI の偽陰性を避けられる指標になりえると推察された。

本研究は医薬品開発において、時間依存的 OATP1B1 阻害作用を有する開発化合物の DDI の偽陰性の回避において有用である。さらに、OATP 以外のトランスポーターに関しても時間依存的阻害作用が報告されていることから、様々なトランスポーターに対する DDI 予測にも応用できる可能性がある。

第6章 実験方法

6-1. 試薬

Pravastatin 及び ABT は、Tokyo Chemical Industries (Tokyo, Japan) より購入した。Rifampicin は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。CsA、midazolam 及び Atorvastatin calcium trihydrate は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Tokyo, Japan) より購入した。CsA の代謝物である M1 は、Toronto Research Chemicals (North York, Canada) より購入した。Pazopanib は、Synkinase Pty Ltd (Victoria, Australia) より購入した。Pitavastatin calcium は、Avachem Scientific (San Antonio, TX) より購入した。Rosuvastatin calcium は AK Scientific (Union City, CA) より購入した。Pazopanib は、Synkinase Pty Ltd. (Victoria, Australia) より購入した。Asunaprevir は、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。Nilotinib は、ChemScene LLC (Monmouth Junction, NJ) より購入した。Regorafenib は、Toronto Research Chemicals (North York, ON) より購入した。 $[^3\text{H}]$ Estrone 3-sulfate (E_1S) (51.8 Ci/mmol) は、PerkinElmer (Waltham, MA) より購入した。 $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -glucuronide (E_2G) は、American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) 又は PerkinElmer (Waltham, MA) より購入した。ラット 3 匹の肝細胞をブールしたラット凍結肝細胞 (Lot No. Rs702 from 8-weeks-old male Sprague-Dawley rats) は、ThermoFisher Scientific (St. Louis, MO) より購入した。ヒト凍結肝細胞 (Lot No. Hu8239 from a 52-year-old female Caucasian) は、ThermoFisher Scientific (St. Louis, MO) より購入した。ラット血清は、本試験に含まれないラットから得た。その他の試薬は、すべて特級試薬を用いた。ヒト血漿はヘルシンキ宣言に従い、科研製薬株式会社ヒト組織倫理委員会によって承認された試験計画書に基づいて 8 人のボランティアから得られた。その他の試薬は、すべて特級試薬を用いた。

6-2. 動物

6 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを日本チャールスリバー (Kanagawa, Japan) より購入

し、12時間の明暗サイクル、湿度30–70%、20–26°Cの条件で飼育した。動物実験は、科研製薬株式会社動物実験委員会によって承認された試験計画書に従って実施された。

6-3. 薬物投与

DMSO、エタノール、Kolliphor ELP 及び生理食塩液の混合液 (2:2.5:2.5:93) を媒体として溶解させた 0.1、0.5、1、3 及び 5 mg/kg の CsA、10 mg/kg の rifampicin 又は媒体をイソフルラン麻酔下で摂食下のラットに内側伏在静脈から単回急速静脈内投与した。投与の翌日、経口ゾンデを用いて 0.5% M.C.で懸濁させた 30 mg/kg の pravastatin 及び 10 mg/kg の midazolam の混合液を一晩絶食させたラットに経口投与した。CsA 投与後の Oatp 活性の回復を評価する試験では、5 mg/kg の CsA 又は媒体を静脈内投与後 1 日、3 日及び 7 日において、一晩絶食させたラットに 30 mg/kg の pravastatin を経口投与した。CsA の代謝物による Oatp 阻害を評価する試験では、生理食塩液に溶解させた P450 非選択的阻害剤である ABT (20 mg/kg) 又は生理食塩液をイソフルラン麻酔下で摂食下のラットに内側伏在静脈から単回急速静脈内投与した。16 時間後、イソフルラン麻酔下でラットに 0.5 mg/kg の CsA をもう一方の内側伏在静脈から単回急速静脈内投与した。その 1 日後、経口ゾンデを用いて一晩絶食させたラットに 30 mg/kg の pravastatin を経口投与した。Rifampicin による DDI の予測精度を検証する試験では、DMSO、ヒドロキシプロピルβシクロデキストリン及び生理食塩液の混合液 (5:13:82) に溶解させた 10 mg/kg 及び 25 mg/kg の rifampicin 又はその混合液をイソフルラン麻酔下で摂食下のラットに内側伏在静脈から単回急速静脈内投与した。5 分後、覚醒下のラットに 30 mg/kg の pravastatin 及び 10 mg/kg の midazolam の混合液を経口投与した。血液は、pravastatin 経口投与後 5、15、30 分、1、2、4、8 時間に無麻酔下で尾静脈より採取した。採取した血液を 4°C、14,000×g で 10 分間遠心し、血漿を得た。血漿は測定するまで-30°C で保管し、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS 又は LC-MS/MS) を用いて血漿中の化合物濃度を測定した。

6-4. 細胞培養

本検討では、HEK293/OATP1B1 発現細胞として HEK293 細胞に OATP1B1 又は FLAG が結合した OATP1B1 を強制発現させた細胞を使用した。HE293/OATP1B1 発現細胞を L-glutamine と phenol red を含まず、10%ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシン及び 1 mg/mL の G418 を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose) (FUJIFILM Wako Pure Chemical) で 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。

6-5. HEK293/OATP1B1 細胞を用いた取り込み試験

HEK293/OATP1B1 細胞を poly-D-lysine コート済みの 4 well (ThermoFisher Scientific) 又は 24 well プレート (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) に 1.0×10^5 cells/well の密度で播種した。播種後 2 日に、5 μ L の 500 mM 酪酸ナトリウムを培地に添加し (終濃度 : 5 mM)、さらにその一日後に取り込み試験を実施した。時間依存的阻害試験 (Pre+Co 条件を含む) では、培地を取り除いた後に 37°C に温めておいた transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 35 mM HEPES, and 5.6 mM D-glucose, pH 7.4) で 2 回洗いを行った後、transport buffer で 5 分間プレインキュベーションした。その後、溶媒対照 (最終濃度 : 1% DMSO) 又は阻害剤を含む transport buffer に置換し、37°C で 0–60 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、阻害剤を含む transport buffer を取り除き、基質と阻害剤を含む transport buffer を細胞に添加し、取り込み試験を開始した。Coincubation 条件 (Co 条件) では阻害剤を含まない transport buffer で HEK293/OATP1B1 細胞を 30 分プレインキュベーション後、基質と阻害剤を含む transport buffer に置換し、取り込み試験を開始した。プレインキュベーションのみの条件 (Pre 条件) では、阻害剤を含む transport buffer で HEK293/OATP1B1 細胞を 30 分プレインキュベーション後、37°C の transport buffer で一度洗いを行い、基質のみを含む transport buffer に置換し、取り込み試験を開始し

た。OATP1B1 活性の回復試験では、阻害剤を含む培地で HEK293/OATP1B1 細胞を 30 (CsA) 又は 60 分 (asunaprevir, nilotinib, regorafenib 及び pazopanib) プレインキュベーション後、阻害剤を含まない新鮮な培地に交換した。設定した時間において培地を取り除き、37°C の transport buffer で一度洗いを行った後、ただちに基質のみを含む transport buffer を添加して、取り込み試験を開始した。時間依存的な OATP1B1 阻害作用の速度論的解析では、阻害剤を含む transport buffer で 30 分プレインキュベーション後、37°C の transport buffer で一度洗いを行い、ただちに [³H]E₁S と非標識体の E₁S の混合液を HEK293/OATP1B1 細胞に添加して、取り込み試験を開始した。OATP1B1 の時間依存的阻害に関する pazopanib と CsA の相互作用を検討する試験では、pazopanib 及び CsA を含む transport buffer で 30 分プレインキュベーション後、37°C の transport buffer で一度洗いを行い、ただちに基質を含む transport buffer を HEK293/OATP1B1 細胞に添加して、取り込み試験を開始した。OATP1B1 活性の不活化試験では、HEK293/OATP1B1 細胞を阻害剤 (CsA; 0.05–0.5 μM, asunaprevir; 0.05–1 μM, nilotinib; 0.2–5 μM; regorafenib; 1–10 μM, pazopanib; 0.1–2 μM) 又は溶媒対照を含む transport buffer でプレインキュベーションした (CsA; 20 sec–3 min, asunaprevir; 1–5 min, nilotinib; 1–5 min, regorafenib; 5–30 min, pazopanib; 0–2 min)。その後、可逆的阻害の影響を最小限にするために 37°C の transport buffer で一度洗った後、ただちに基質のみを含む新鮮な transport buffer を添加し、反応を開始した。0.5 分 ([³H]E₁S 及び [³H]E₂G) 又は 1 分後 (atorvastatin, pitavastatin 及び rosuvastatin)、反応液を除き、氷冷した transport buffer を加えて 2 回洗浄した。各試験終了後、0.2 mL の 0.2 N NaOH を加えて一晩放置した。翌日、HCl を加えて中和後、細胞溶解液及び反応液の放射活性を液体シンチレーションカウンター (Tricarb 4910TR, PerkinElmer; LSC-6100, Aloka Tokyo, Japan) で測定した。細胞のタンパク量は牛血清アルブミンを検量試料としてタンパク定量キット (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて、Bradford 法に従い測定した。

6-6. ラット肝細胞への pravastatin の取り込み試験

ラット凍結肝細胞を 37°C の温浴で解凍し、thawing medium (ThermoFisher Scientific) に分注して懸濁した後、室温、50×g で 5 分間遠心した。上清を除き、ラット肝細胞を Krebs–Henseleit (KH) buffer (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM D-glucose, and 1.5 mM CaCl₂, pH 7.4) で再懸濁し、4°C、50×g で 5 分間遠心した。上清を除いた後、ラット肝細胞を KH buffer 又はラット血清で再懸濁し、シリコンレイヤー法により取り込み試験を実施した (Takeuchi *et al.*, 2014)。ラット肝細胞を 37°C で 5 分間プレインキュベーションした後、あらかじめ 37°C で温めておいた 2 μM の pravastatin と CsA、rifampicin 又は DMSO を含む KH buffer 又はラット血清を等量加えて混合し、反応を開始した。Rifampicin は KH buffer 及びラット血清条件で 0.01–1000 μM の範囲とした。CsA は KH buffer 条件では 0.01–10 μM とし、血清条件では 0.1–100 μM とした。反応液中の DMSO 濃度はすべて 1% (v/v) とした。反応開始後 3 分において、反応液 200 μL を 100 μL のシリコンオイル (密度、1.035) とその下層に 5M の酢酸アンモニウム 50 μL を含むシリコンチューブに分注し、遠心した。遠心後、肝細胞を含む下層を液体窒素につけて瞬時に冷凍した。シリコンオイル上部の上清 100 μL を別のチューブに回収し、シリコンチューブを切った後、ラット肝細胞を含む下層を別のチューブにさかさまに入れて遠心し、ラット肝細胞を回収した。ラット肝細胞中の pravastatin 及び上清の pravastatin、CsA 及び rifampicin を LC-MS/MS により定量した。上清の薬物濃度は、反応液中での薬物濃度と等しいと仮定した。

6-7. ヒト肝細胞を用いた取り込み試験

ヒト凍結肝細胞を 37°C で融解後、thawing medium (ThermoFisher Scientific) に移して懸濁し、室温、100×g で 10 分間遠心した。上清を除き、seeding medium で 0.8×10^6 viable cells/mL になるように再懸濁し、collagen I コート済みの 24 well プレートに播種した。播種後 4 時間

に、37°C に温めておいた KH buffer でヒト肝細胞を 2 回洗い、pazopanib 又は CsA を含む KH buffer で 30 分プレインキュベーションした。30 分後、37°C の KH buffer で 1 度洗い、 $[^3\text{H}]E_1S$ を含む KH buffer に置換して 30 秒インキュベーションした。30 秒後、ヒト肝細胞を氷冷した KH buffer で 2 度洗い、0.2 mL の 0.2 N NaOH を加えて一晩放置した。以降操作は、OATP1B1 発現細胞と同様とした。

6-8. 血清又は血漿中蛋白結合率の測定

CsA、rifampicin 及び pazopanib のラット血漿、血清又はヒト血漿蛋白結合率は平衡透析法により算出した。透析膜（細孔の直径：5 nm、分子量のカットオフ：14,000 Da）を蒸留水に 1 時間漬けたのち、透析装置にセットした。透析膜を挟んで 200、400 又は 750 μL の血漿又は血清と 0.1 M リン酸カリウムバッファー（pH7.4）をそれぞれ添加し、37°C で 20 時間インキュベートした。平衡化後、血漿又は血漿とバッファーを回収し、LC-MS 又は LC-MS/MS により薬物濃度を測定した。

6-9. LC-MS/MS 測定条件

6-9-1. TSQ Quantum Ultra LC-MS/MS システム（pravastatin、rifampicin 及び midazolam の測定）

- | | |
|-----------------|---|
| (1) オートサンプラー | HTC PAL ハイスループット LC 注入システム
(CTC Analytics) |
| (2) 液体クロマトグラフィー | Accela
(Thermo Fisher Scientific) |
| (3) 質量分析装置 | TSQ Quantum Ultra
(Thermo Fisher Scientific) |

・ HPLC 条件

分析カラム： YMC-Triart C18 (5 μm , 2.0 mm ID×50 mm, pore 12 nm) ワイエムシイ

移動相 A： 0.1 vol%ギ酸水溶液

移動相 B : メタノール

カラム温度設定 : 40°C

注入量 : 15 μ L

溶離条件 :

時間 min	流速 μ L/min	A %	B %
0.00	800	95	5
0.50	800	95	5
0.51	800	10	90
0.60	800	10	90
0.61	300	10	90
3.00	300	10	90
3.01	800	0	100
5.00	800	0	100
5.01	800	95	5
6.00	800	95	5

・ MS 条件

Ionization Method: Electrospray Ionization (ESI)

MS Acquire Time: 6.0 min

Q2 Collision Gas Pressure: 1.5 mTorr

Spray Voltage: 4000 V

Sheath Gas Pressure: 30 Arb

Auxiliary Gas Pressure: 35 Arb

Capillary Temperature: 300°C

Scan Width: ±0.50 amu

Scan Time: 0.050 s

Q1 Peak Width: 0.70 FWHM

Q3 Peak Width: 0.70 FWHM

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
Pravastatin	423.200	321.200
Rifampicin	821.400	397.200
Midazolam	326.100	291.100
Ketoconazole(内標準物質)	531.200	243.900

6-9-2. TSQ Quantum Vantage LC-MS/MS システム(CsA、CsA 代謝物 M1、atorvastatin, pitavastatin
及び fluvastatin の測定)

- (1) オートサンプラー NANOSPACE SI-2 3133 (株) 大阪ソーダ
- (2) 液体クロマトグラフィー NANOSPACE SI-2 3101 (株) 大阪ソーダ
- NANOSPACE NASCA2 5200 (株) 大阪ソーダ
- (3) 質量分析装置 TSQ QUANTUM Vantage

Thermo Fisher Scientific

• HPLC 条件

分析カラム： Capcell Pak C18 (3 µm, 1.5 mm ID×35 mm, pore 12 nm) (株) 大阪ソーダ

移動相 A： 1 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B： アセトニトリル

カラム温度設定：40°C

注入量： 10 μ L

時間 min	流速 μ L/min	A %	B %
Init	400	85	15
0.60	400	85	15
0.61	400	5	95
2.80	400	5	95
2.81	400	0	100
3.70	400	0	100
3.71	600	0	100
4.60	600	0	100
4.61	400	85	15
7.50	400	85	15

・ HPLC 条件

分析カラム： YMC-Triart C18 (5 μ m, 2.0 mm ID \times 50 mm) (株) 大阪ソーダ

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： メタノール

カラム温度設定：40 $^{\circ}$ C

注入量： 10 μ L

時間 min	流速 μ L/min	A %	B %
Init	400	85	15
0.60	400	85	15

0.61	400	5	95
2.80	400	5	95
2.81	400	0	100
3.70	400	0	100
3.71	600	0	100
4.60	600	0	100
4.61	400	85	15
7.50	400	85	15

• MS 条件

Ionization Method : ESI)

MS Acquire Time : 8.0 min

Q2 Collision Gas Pressure : 1.5 mTorr

Spray Voltage : 3500 V

Sheath Gas Pressure : 40 Arb

Auxiliary Gas Pressure : 25 Arb

Capillary Temperature : 235°C (CsA 及び M1)

: 330°C(atorvastatin, pitavastatin 及び fluvastatin)

Scan Width : ± 0.50 amu

Scan Time : 0.20 s

Q1 Peak Width : 0.70 FWHM

Q3 Peak Width : 0.70 FWHM

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Ion mode
Atorvastatin	480.200	418.200	Positive

Pitavastatin	422.300	274.100	Negative
Rosuvastatin	480.200	418.200	Negative
CsA	1202.9	425.300	Positive
M1	1219.0	425.300	Positive
Ketoconazole(内標準物質)	531.200	243.900	Positive

6-9-3. Q Exactive™ LC-MS システム

- (1) オートサンプラー HTC PAL ハイスループット LC 注入システム
(CTC Analytics)
- (2) 液体クロマトグラフィー Accela (Thermo Fisher Scientific)
- (3) 質量分析装置 Q Exctive (Thermo Fisher Scientific)

・ HPLC 条件

分析カラム： CAPCELL PAK C₁₈ ACR (3 μm、1.5 mm I.D. × 35 mm) 大阪ソーダ

移動相 A： 0.1 vol%ギ酸水溶液

移動相 B： メタノール

カラム温度設定：40℃

注入量： 10 μL

溶離条件：

時間 (min)	流速 (μL/min)	移動相 B (%)	移動相 C (%)
Init	800	95.0	5.0
0.50	800	95.0	5.0
0.51	800	10.0	90.0
0.80	800	10.0	90.0

0.81	300	10.0	90.0
3.00	300	10.0	90.0
3.01	800	0.0	100.0
5.00	800	0.0	100.0
5.01	800	95.0	5.0
6.00	800	95.0	5.0

• MS 条件

Ionization Method: ESI

MS Run Time: 3.00 min

Spray Voltage: 3500 V

Spray Current: 0 μ A

Sheath Gas flow rate: 40 Arb

Aux Gas flow rate: 10 Arb

Capillary Temperature: 330°C

Vaporizer Temperature: 280°C

S-lens RF level: 50.0

Scan range: 150.0 to 1000.0 m/z

Resolution: 35000

Scan Events: Targeted-SIM (Selected-Ion Monitoring)

Isolation windows: 4.0 m/z

Pazopanib: *m/z* 438.1707

Ketoconazole (IS): *m/z* 531.1560

6-10. データ解析

6-10-1. 薬物動態学的解析

薬物動態学的パラメータの計算には「Phoenix WinNonlin 6.3 Build 6.1.0.173 (Pharsight)」を使用した。

6-10-2. *in vivo* K_i 値の算出

$$(CL/F_{\text{inhibitor}})/(CL/F_{\text{control}}) = \alpha [K_{i,\text{in vivo}}^\gamma / (I^\gamma + K_{i,\text{in vivo}}^\gamma)] + (1-\alpha) \quad (1)$$

CL/F_{control} : CsA 非投与群における pravastatin の経口クリアランス

$CL/F_{\text{inhibitor}}$: CsA 投与群における pravastatin の経口クリアランス

α : 定数

γ : ヒル係数

I : 血漿中非結合形 CsA 濃度 (pravastatin 投与後 5 分の測定値)

6-10-3. *in vitro* IC_{50} 値の算出

$$V_{\text{inhibitor}} / V_{\text{control}} = IC_{50}^\gamma / (I^\gamma + IC_{50}^\gamma) \quad (2)$$

V_{control} : 阻害剤非存在下における基質の取り込み初速度

$V_{\text{inhibitor}}$: 阻害剤存在下における基質の取り込み初速度

γ : ヒル係数

I : 阻害剤濃度

6-10-4. 基質の取り込みに関する速度論的解析

$$V = V_{\text{max}} \times S / (K_m + S) + PS_{\text{dif}} \times S \quad (3)$$

V : 基質の取り込み初速度

V_{max} : 基質の最大輸送速度

K_m : ミカエリス定数

S : 基質濃度

PS_{dif} : 透過クリアランス

6-10-5. K_I 及び k_{inact} の算出

$$k_{obs,app} = k_{inact} \times I / (K_I + I) \quad (4)$$

K_I : 最大不活化速度の 50% の速度をもたらす阻害剤濃度

k_{inact} : 最大不活化速度定数

$k_{obs,app}$: みかけの不活化速度定数

I : 阻害剤濃度

$k_{obs,app}$ は不活化試験におけるプレインキュベーション時間に対して残存活性の自然対数を取り、その線形回帰から算出した。

非線形最小二乗法は MULTI program (Yamaoka *et al.*, 1981) の Damping Gauss-Newton 法を用いた。

6-11. R 値の算出

本検討では、プレインキュベーションなし及びあり条件の可逆的阻害に基づく DDI 予測式を R_0 及び R_1 とし、さらに基質の肝細胞への取り込みに対する OATP1B1 の寄与率を考慮した DDI 予測式を R_0' 及び R_1' した。

$$R_0 \text{ or } R_1 = 1 / ((1 / R_1') \cdot f + (1 - f)) \quad (5)$$

$$R_0' \text{ or } R_1' = 1 + I_{u,inlet,max} / K_i \quad (6)$$

$I_{u,inlet,max}$: 肝臓入り口の血液中での推定最大非結合形阻害剤濃度

K_i : プレインキュベーションなし又はあり条件における阻害定数

f : 肝細胞への取り込みに対する OATP1B1 の寄与率

本検討の *in vitro* 試験における基質濃度は、 K_m 値に比べて十分に低い濃度で試験を実施したため、 K_i 値には *in vitro* 試験より算出した IC_{50} 値を用いた。 $I_{u,inlet,max}$ は、以下の式より算出した (Ito *et al.*, 1998)。

$$I_{u,inlet,max} = f_{u,p} \times (I_{max} + (k_a \times F_a F_g \times Dose) / Q_h / R_B) \quad (7)$$

$f_{u,p}$: 血漿蛋白非結合率

I_{max} : 阻害剤の最高血漿中濃度

k_a : 吸収速度定数

$F_a F_g$: 阻害剤の消化管アベイラビリティ

Dose : 阻害剤の投与量

Q_h : 肝血流速度

R_B : 血液/血漿濃度比

本検討では、OATP1B1 活性の不活化及び回復に基づく DDI 予測式を R_2 及び R_2' とした。

$$R_2 = 1 / ((1 / R_2') \cdot f + (1 - f)) \quad (8)$$

$$R_2' = (k_{obs} + k_{recovery}) / k_{recovery} \quad (9)$$

k_{obs} : 不活化速度定数

$k_{recovery}$: 見かけの回復速度定数

$k_{recovery}$ は OATP1B1 活性の回復試験において、OATP1B1 活性を縦軸に阻害剤を含まない培地での培養時間を横軸にしたときのシグママイナスプロットの直線回帰より算出した。

k_{obs} は以下の式より算出した。

$$k_{obs} = k_{inact} \times I_{u,inlet,max} / (K_I + I_{u,inlet,max}) \quad (10)$$

本検討では、OATP1B1 の可逆的阻害、不活化及び回復に基づく DDI 予測式を R_3 及び R_3' とした。

$$R_3 = 1 / (A_h \times B_h \times f + (1-f)) \quad (11)$$

$$R_3' = 1 / (A_h \times B_h)$$

A_h : 肝臓における OATP1B1 の可逆的阻害

B_h : 肝臓における OATP1B1 の不活化

A_h 及び B_h は以下の式より算出した。

$$A_h = 1 / (1 + I_{u,inlet,max} / IC_{50,pre(-)}) \quad (12)$$

$$B_h = k_{recovery} / (k_{obs} + k_{recovery}) \quad (13)$$

$IC_{50,pre(-)}$: プレインキュベーションしていない条件における阻害定数

6-12. 統計解析

統計学的な有意差は Student の t 検定又は 2 元配置分散分析を用いた。P 値が 0.05 未満のとき、統計学的に有意と判定した。

引用文献

1. Amundsen R, Asberg A, Ohm IK, and Christensen H. Cyclosporine A- and tacrolimus-mediated inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 in vitro. *Drug Metab Dispos.* 40:655-661, 2012.
2. Amundsen R, Christensen H, Zabihyan B, and Asberg A. Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 38:1499-1504, 2010.
3. Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, van Schaik RH, Marsh S, Orwick SJ, Franke RM, Hu S, Schuetz EG, Lamba V, Messersmith WA, Wolff AC, Carducci MA, and Sparreboom A. Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther.* 85:155-63, 2009.
4. Bennouna J, Deslandres M, Senellart H, de Labareyre C, Ruiz-Soto R, Wixon C, Botbyl J, Suttle AB, and Delord JP. A phase I open-label study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of pazopanib in combination with irinotecan and cetuximab for relapsed or refractory metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs.* 33:138-147, 2015.
5. Boudou-Rouquette P, Tlemsani C, Blanchet B, Huillard O, Jouinot A, Arrondeau J, Thomas-Schoemann A, Vidal M, Alexandre J, and Goldwasser F. Clinical pharmacology, drug-drug interactions and safety of pazopanib: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 12:1433-1444, 2016.
6. Center for Drug Evaluation and Research 2020. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions: Final guidance. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, 2020a. <https://www.fda.gov/media/134582/download> [accessed 30 March 2020]
7. Center for Drug Evaluation and Research 2017. Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions: Final guidance. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, 2020b. <https://www.fda.gov/media/134581/download> [accessed 30 March 2020]
8. Committee for Human Medicinal Products 2012. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. European Medicines Agency, London, 2012. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf [accessed 13 September 2019].
9. de Graan AJ, Lancaster CS, Obaidat A, Hagenbuch B, Elens L, Friberg LE, de Bruijn P, Hu S, Gibson AA, Bruun GH, Corydon TJ, Mikkelsen TS, Walker AL, Du G, Loos WJ, van Schaik RH, Baker SD, Mathijssen RH, and Sparreboom A. Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin Cancer Res.* 18:4433-4440, 2012.
10. Duan P, Zhao P, and Zhang L. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Pitavastatin and Atorvastatin to Predict Drug-Drug Interactions (DDIs). *Eur J Drug Metab*

Pharmacokinet 42: 689-705, 2017.

11. Eley T, Han YH, Huang SP, He B, Li W, Bedford W, Stonier M, Gardiner D, Sims K, Rodrigues AD, Bertz RJ. Organic anion transporting polypeptide-mediated transport of, and inhibition by, asunaprevir, an inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease. *Clin Pharmacol Ther* 97:159-166, 2015.
12. Ellawatty WEA, Masuo Y, Fujita KI, Yamazaki E, Ishida H, Arakawa H, Nakamichi N, Abdelwahed R, Sasaki Y, and Kato Y. Organic Cation Transporter 1 Is Responsible for Hepatocellular Uptake of the Tyrosine Kinase Inhibitor Pazopanib. *Drug Metab Dispos.* 46:33-40, 2018.
13. Fujita K, Sugiura T, Okumura H, Umeda S, Nakamichi N, Watanabe Y, Suzuki H, Sunakawa Y, Shimada K, Kawara K, Sasaki Y, and Kato Y. Direct inhibition and down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38, an active metabolite of irinotecan, in humans. *Pharm Res.* 31:204-215, 2014.
14. Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, and Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:4555-4564, 2014.
15. Giacomini KM, Balimane PV, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, Huang SM, Sugiyama Y, Weitz D, Wen Y, Xia CQ, Yee SW, Zimdahl H, and Niemi M. International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 94:23-26, 2013.
16. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, and Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 9:215-236, 2010.
17. Goh BC, Reddy NJ, Dandamudi UB, Laubscher KH, Peckham T, Hodge JP, Suttle AB, Arumugham T, Xu Y, Xu CF, Lager J, Dar MM, and Lewis LD. An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified Cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors. *Clin Pharmacol Ther.* 88:652-659, 2010.
18. Hamberg P, Mathijssen RH, de Bruijn P, Leonowens C, van der Biessen D, Eskens FA, Sleijfer S, Verweij J, and de Jonge MJ. Impact of pazopanib on docetaxel exposure: results of a phase I combination study with two different docetaxel schedules. *Cancer Chemother Pharmacol.* 75:365-371, 2015.
19. Hong M, Hong W, Ni C, Huang J, and Zhou C. Protein kinase C affects the internalization and recycling of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Biochim Biophys Acta.* 1848:2022-2030, 2015.

20. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, and Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2): Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 274:37161-37168, 1999.
21. Ieiri I, Suwannakul S, Maeda K, Uchimaru H, Hashimoto K, Kimura M, Fujino H, Hirano M, Kusuhara H, Irie S, Higuchi S, and Sugiyama Y. SLCO1B1 (OATP1B1, an uptake transporter) and ABCG2 (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 82: 541-547, 2007.
22. Imaoka T, Mikkaichi T, Abe K, Hirouchi M, Okudaira N, and Izumi T. Integrated approach of in vivo and in vitro evaluation of the involvement of hepatic uptake organic anion transporters in the drug disposition in rats using rifampicin as an inhibitor. *Drug Metab Dispos.* 41:1442-1449, 2013.
23. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, and Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev.* 50:387-412, 1998.
24. Iwase M, Fujita KI, Nishimura Y, Seba N, Masuo Y, Ishida H, Kato Y, and Kiuchi Y. Pazopanib interacts with irinotecan by inhibiting UGT1A1-mediated glucuronidation, but not OATP1B1-mediated hepatic uptake, of an active metabolite SN-38. *Cancer Chemother Pharmacol.* 83:993-998, 2019.
25. Izumi S, Nozaki Y, Kusuhara H, Hotta K, Mochizuki T, Komori T, Maeda K, and Sugiyama Y. Relative Activity Factor (RAF)-Based Scaling of Uptake Clearance Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 in Human Hepatocytes. *Mol Pharm.* 15: 2277-2288, 2018.
26. Izumi S, Nozaki Y, Maeda K, Komori T, Takenaka O, Kusuhara H, and Sugiyama Y. Investigation of the impact of substrate selection on in vitro organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 43:235-247, 2015.
27. Kajosaari LI, Laitila J, Neuvonen PJ, and Backman JT. Metabolism of repaglinide by CYP2C8 and CYP3A4 in vitro: effect of fibrates and rifampicin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 97:249-256, 2005.
28. Kalliokoski A and Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 158:693-705, 2009.
29. Kato R, Nishide M, Kozu C, Iwamoto A, Urashima K, Suzuki K, Ijiri Y, Hayashi T, and Tanaka K. Is cyclosporine A transport inhibited by pravastatin via multidrug resistant protein 2? *Eur J Clin Pharmacol.* 66:153-158, 2010.

30. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, and Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther.* 287: 457-468, 1998.
31. Khurana V, Minocha M, Pal D, and Mitra AK. Inhibition of OATP-1B1 and OATP-1B3 by tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol Drug Interact.* 29:249-259, 2014.
32. Kunze A, Huwyler J, Camenisch G, and Poller B. Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metab Dispos.* 42: 1514-1521, 2014.
33. Lee TK, Koh AS, Cui Z, Pierce RH, and Ballatori N. N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285:371-381, 2003.
34. Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, and Kim RB. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem.* 280:9610-9617, 2005.
35. Lemaire M and Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J Pharm Pharmacol.* 34: 715-718, 1982.
36. Li CH, Sherer EA, Lewis LD, and Bies RR. Clinical trial simulation to evaluate population pharmacokinetics and food effect: capturing abiraterone and nilotinib exposures. *J Clin Pharmacol.* 55: 556-562, 2015.
37. Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, and Sugiyama Y. Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clin Pharmacol Ther.* 90: 575-581, 2011.
38. Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, and Sugiyama Y. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:1059-1067, 2005.
39. Ministry of Health, Labour and Welfare 2018. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information, 2018. <
<https://www.pmda.go.jp/files/000228122.pdf>> [accessed 3 September 2019].
40. Mück W, Mai I, Fritsche L, Ochmann K, Rohde G, Unger S, John A, Bauer S, Budde K, Roots I, Neumayer HH, and Kuhlmann J. Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 65: 251-261, 1999.
41. Nakanishi T, Shibue Y, Fukuyama Y, Yoshida K, Fukuda H, Shirasaka Y, and Tamai I.

- Quantitative time-lapse imaging-based analysis of drug-drug interaction mediated by hepatobiliary transporter, multidrug resistance-associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 39:984-991, 2011.
42. Pahwa S, Alam K, Crowe A, Farasyn T, Neuhoff S, Hatley O, Ding K, and Yue W. Pretreatment With Rifampicin and Tyrosine Kinase Inhibitor Dasatinib Potentiates the Inhibitory Effects Toward OATP1B1- and OATP1B3-Mediated Transport. *J Pharm Sci.* 106:2123-2135, 2017.
 43. Powell J, Farasyn T, Köck K, Meng X, Pahwa S, Brouwer KL, and Yue W. Novel mechanism of impaired function of organic anion-transporting polypeptide 1B3 in human hepatocytes: post-translational regulation of OATP1B3 by protein kinase C activation. *Drug Metab Dispos.* 42:1964-1970, 2014.
 44. Prueksaritanont T, Chu X, Evers R, Klopfer SO, Caro L, Kothare PA, Dempsey C, Rasmussen S, Houle R, Chan G, Cai X, Valesky R, Fraser IP, and Stoch SA. Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol.* 78:587-598, 2014.
 45. Prueksaritanont T, Tatosian DA, Chu X, Railkar R, Evers R, Chavez-Eng C, Lutz R, Zeng W, Yabut J, Chan GH, Cai X, Latham AH, Hehman J, Stypinski D, Brejda J, Zhou C, Thornton B, Bateman KP, Fraser I, and Stoch SA. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. *Clin Pharmacol Ther.* 101:519-530, 2017.
 46. Shingaki T, Takashima T, Ijuin R, Zhang X, Onoue T, Katayama Y, Okauchi T, Hayashinaka E, Cui Y, Wada Y, Suzuki M, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y, and Watanabe Y. Evaluation of Oatp and Mrp2 activities in hepatobiliary excretion using newly developed positron emission tomography tracer [¹¹C]dehydropravastatin in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 347:193-202, 2013.
 47. Shirasaka Y, Suzuki K, Nakanishi T, and Tamai I. Differential effect of grapefruit juice on intestinal absorption of statins due to inhibition of organic anion transporting polypeptide and/or P-glycoprotein. *J Pharm Sci.* 100:3843-3853, 2011.
 48. Shitara Y, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, and Horie T. Long-lasting inhibition of the transporter-mediated hepatic uptake of sulfobromophthalein by cyclosporin a in rats. *Drug Metab Dispos.* 37:1172-1178, 2009.
 49. Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, and Horie T. Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27:368-278, 2012.
 50. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, and Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 34:45-78, 2013a.
 51. Shitara Y, Takeuchi K, Horie T. Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on

- OATP1B1-mediated uptake. *J Pharm Sci.* 102:3427-2435, 2013b.
52. Shitara Y and Sugiyama Y. Preincubation-dependent and long-lasting inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) and its impact on drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 177:67-80, 2017.
 53. Sonpavde G and Hutson TE. Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Curr Oncol Rep.* 9:115-119, 2007.
 54. Sprowl JA, Ong SS, Gibson AA, Hu S, Du G, Lin W, Li L, Bharill S, Ness RA, Stecula A, Offer SM, Diasio RB, Nies AT, Schwab M, Cavaletti G, Schlatter E, Ciarimboli G, Schellens JH, Isacoff EY, Sali A, Chen T, Baker SD, Sparreboom A, and Pabla N. A phosphotyrosine switch regulates organic cation transporters. *Nat Commun.* 7:10880, 2016.
 55. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarbá JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, and Hawkins RE. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 28:1061-1068, 2010.
 56. Stivarga (Regorafenib) Tablets. Clinical pharmacology biopharmaceutics review. FDA approval package, 2012.
 57. Strolin Benedetti M, and Dostert P. Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives: a review of animal and human studies. *Environ Health Perspect.* 9:101-105, 1994.
 58. Sugiura T, Otake T, Shimizu T, Wakayama T, Silver DL, Utsumi R, Nishimura T, Iseki S, Nakamichi N, Kubo Y, Tsuji A, and Kato Y. PDZK1 regulates organic anion transporting polypeptide Oatp1a in mouse small intestine. *Drug Metab Pharmacokinet.* 25:588-598, 2010.
 59. Sunvepra (Asunaprevir) Capsules. Common technical document, 2014.
 60. Takeuchi K, Sugiura T, Matsubara K, Sato R, Shimizu T, Masuo Y, Horikawa M, Nakamichi N, Ishiwata N and Kato Y. Interaction of novel platelet-increasing agent eltrombopag with rosuvastatin via breast cancer resistance protein in humans. *Drug Metab Dispos.* 42:726-734, 2014.
 61. Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, and Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res.* 18:1262-1269, 2001.
 62. Tan AR, Dowlati A, Jones SF, Infante JR, Nishioka J, Fang L, Hodge JP, Gainer SD, Arumugham T, Suttle AB, Dar MM, Lager JJ, and Burris HA. Phase I study of pazopanib in combination with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Oncologist.* 15:1253-1261. 2010.
 63. Tassigna (Nilotinib) Oral Capsules. Clinical pharmacology biopharmaceutics review. FDA approval package, 2007.
 64. Tokui T, Nakai D, Nakagomi R, Yawo H, Abe T, and Sugiyama Y. Pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is transported by rat organic anion transporting polypeptide, oatp2. *Pharm*

- Res. 16:904-908, 1999.
65. Vaidyanathan J, Yoshida K, Arya V, and Zhang L. Comparing Various In Vitro Prediction Criteria to Assess the Potential of a New Molecular Entity to Inhibit Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1. *J Clin Pharmacol.* 7:S59-72, 2016.
 66. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schöffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos AP, and Hohenberger P. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 379:1879-1886, 2012.
 67. Varma MV, Lai Y, Feng B, Litchfield J, Goosen TC, and Bergman A. Physiologically based modeling of pravastatin transporter-mediated hepatobiliary disposition and drug-drug interactions. *Pharm Res.* 29:2860-2873, 2012.
 68. Votrient (pazopanib hydrochloride) Tablets. Clinical pharmacology biopharmaceutics review. FDA approval package. 2009.
 69. Wang P, Wang JJ, Xiao Y, Murray JW, Novikoff PM, Angeletti RH, Orr GA, Lan D, Silver DL, and Wolkoff AW. Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1A1 on the hepatocyte surface. *J Biol Chem.* 280:30143-30149, 2005.
 70. Williamson B, Dooley KE, Zhang Y, Back DJ, and Owen. Induction of influx and efflux transporters and cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes by rifampin, rifabutin, and rifapentine. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:6366-6369, 2013.
 71. Xu CF, Reck BH, Xue Z, Huang L, Baker KL, Chen M, Chen EP, Ellens HE, Mooser VE, Cardon LR, Spraggs CF, and Pandite L. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br J Cancer.* 102:1371-1377, 2010.
 72. Xu CF, Xue Z, Bing N, King KS, McCann LA, de Souza PL, Goodman VL, Spraggs CF, Mooser VE, and Pandite LN. Concomitant use of pazopanib and simvastatin increases the risk of transaminase elevations in patients with cancer. *Ann Oncol.* 23:2470-2471, 2012.
 73. Yamada A, Maeda K, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakamura Y, and Sugiyama Y. Kinetic Interpretation of the Importance of OATP1B3 and MRP2 in Docetaxel-Induced Hematopoietic Toxicity. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 3:e126, 2014.
 74. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, and Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn.* 4:879-885, 1981.
 75. Yamazaki M, Kobayashi K, and Sugiyama Y. Primary active transport of pravastatin across the liver canalicular membrane in normal and mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. *Biopharm Drug Dispos.* 17:607-621, 1996.
 76. Yang J, Jamei M, Yeo KR, Rostami-Hodjegan A, and Tucker GT. Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance. *Drug Metab Dispos.* 35:501-502, 2007.

77. Yoshida K, Maeda K, and Sugiyama Y. Transporter-mediated drug--drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clin Pharmacol Ther.* 91:1053-1064, 2012.
78. Yoshikado T, Yoshida K, Kotani N, Nakada T, Asaumi R, Toshimoto K, Maeda K, Kusuhara H, and Sugiyama Y. Quantitative Analyses of Hepatic OATP-Mediated Interactions Between Statins and Inhibitors Using PBPK Modeling With a Parameter Optimization Method. *Clin Pharmacol Ther.* 100:513-523, 2016.
79. Zaghoul I, Ptachcinski RJ, Burckart GJ, Van Thiel D, Starzel TE, and Venkataramanan R. Blood protein binding of cyclosporine in transplant patients. *J Clin Pharmacol* 27:240-242, 1987.
80. Zhang Y, Panfen E, Fancher M, Sinz M, Marathe P, and Shen H. Dissecting the Contribution of OATP1B1 to Hepatic Uptake of Statins Using the OATP1B1 Selective Inhibitor Estropipate. *Mol Pharm.* 16:2342-2353, 2019.
81. Zhu L, Li H, Chan P, Eley T, Gandhi Y, Bifano M, Osawa M, Ueno T, Hughes E, AbuTarif M, Bertz R, and Garimella T. Population Pharmacokinetic Analysis of Asunaprevir in Subjects with Hepatitis C Virus Infection. *Infect Dis Ther.* 7:261-275, 2018.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導ならびに御鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健学域 分子薬物治療学研究室 加藤 将夫 教授に謹んで謝意を表します。

また本研究に関して、御指導と御助言ならびに御協力戴きました金沢大学医薬保健学域 分子薬物治療学研究室 増尾 友佑 助教に厚く感謝の意を表します。

さらに本研究に関して、種々の有益な御指導と御助言を戴きました金沢大学医薬保健学域 分子薬物治療学研究室 石本 尚人 助教に深く感謝の意を表します。

最後に、本研究に御協力いただきました科研製薬株式会社 薬物動態・安全性部 探索グループのメンバーに感謝致します。