

氏名	二木 梓
学位の種類	博士 (創薬科学)
学位記番号	医薬保博甲 465 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	げっ歯類を用いた膜輸送体 OATP1Bs 内因性基質群の肝腎取り込み解析
論文審査委員	主査 加藤 将夫 副査 玉井 郁巳 副査 松下 良 副査 深見 達基 副査 白坂 善之

学位論文要旨

Abstract

The aim of the present study was to investigate changes in plasma concentrations and tissue distribution of endogenous substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1Bs, hexadecanedioate (HDA), octadecanedioate (ODA), tetradecanedioate (TDA), and coproporphyrin-III, induced by its weak inhibitor, probenecid (PBD), in rats. PBD increased the plasma concentrations of these four compounds regardless of bile duct cannulation, whereas liver-to-plasma ($K_{p,liver}$) and kidney-to-plasma concentration ratios of HDA and TDA were reduced. The effects of PBD on plasma concentrations and $K_{p,liver}$ of HDA, ODA, and TDA were similar, including in kidney-ligated rats, suggesting a minor contribution of renal disposition to the overall distribution of these three compounds. Tissue uptake clearance of deuterium-labeled HDA (d-HDA) in liver was 16-fold higher than that in kidney, and was reduced by 80% by PBD. This was compatible with inhibition of d-HDA uptake by PBD in isolated rat hepatocytes. Such inhibitory effects of PBD were also observed in the human OATP1B1-mediated uptake of d-HDA, which were observed only in the presence of albumin. Overall, the disposition of HDA is mainly determined by hepatic OATP-mediated uptake, which is inhibited by PBD. HDA might, thus, be a biomarker for OATPs minimally affected by urinary and biliary elimination in rats.

要旨

【序論】

Organic anion transporting polypeptide 1Bs (OATP1Bs)は肝臓のシヌソイド側膜に発現しており、この基質薬物の体内動態に影響する重要な因子である。OATP1Bs の阻害剤は基質薬物の血漿中濃度を上昇させ、薬効や副作用の変化を引き起こす可能性がある。したがって、新薬の研究開発段階において、*in vivo*における OATP1Bs 阻害による薬物間相互作用 (drug-drug interaction; DDI)リスクを評価することは極めて重要である。近年、OATP1Bs 輸送活性低下に伴って、血漿中濃度が上昇する内因性基質 coproporphyrin (CP)-I, CP-III, hexadecanedioate (HDA), tetradecanedioate (TDA), octadecanedioate (ODA)等が見出されており、*in vivo*における OATP1Bs バイオマーカーとして注目されている。一方で、これら内因性基質は OATP1Bs 以外のトランスポーターにも基質として認識される。例えば、HDA 及び TDA は *in vitro* で Organic anion transporter (OAT)1 及び OAT3 の基質であることが報告されている。したがって、これら内因性基質の消失に OATs を介した腎取り込み過程が大きく寄与する場合、OATs 阻害によっても血漿中濃度が上昇する可能性がある。すなわち、これら内因性基質の血漿中濃度のみに基づいた解析では、OATP1Bs DDI リスクの誤評価につながる危険性がある。この誤評価を回避するためには、標識体投与による臓器中分布、クリアランス等を含む体内動態解析により、OATP1Bs 内因性基質の主要な消失過程の解明が必要であるが、ヒトにおけるこれらの解析は困難である。そこで、本研究では、胆管カニューレ処置もしくは腎結紮処置を行ったラットを用いて OATP1Bs 内因性基質の体内動態解析を行うこととした。さらに、OATP1Bs 及び OATs を含む複数のトランスポーターを阻害する薬物 probenecid (PBD)による影響を検討した。これらの解析より、OATP1Bs 内因性基質の体内動態を決定する因子を同定することで、OATP1Bs バイオマーカーとしての妥当性を評価することを目的とした。

【本論】 PBD による OATP1Bs 内因性基質の体内動態への影響を調べるために、ラットに PBD を静脈内投与して血漿中及び臓器中の HDA, ODA, TDA 及び CP-III 濃度を定量した。PBD 投与群に

において HDA, ODA, TDA 及び CP-III 血漿中濃度は上昇した (図 1)。また、PBD はこれら内因性基質の肝臓-血液間分配係数 ($K_{p,liver}$) を有意に低下させたため (図 2)、これらの化合物が血中から肝臓中へ取り込まれており、さらに、PBD がこの肝取り込み過程を阻害することが示唆された。これら内因性基質の体内動態に腸肝循環が影響するか調べるため、ラットに実験

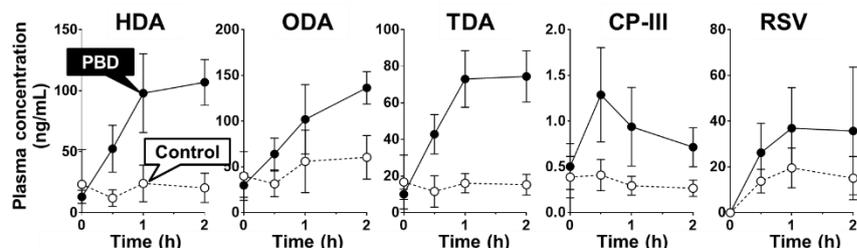


図1 胆汁カニューレ非処置ラットにおけるOATP1Bs内因性基質及びRSVの血漿中濃度へのPBDの影響

開始 20 分前から胆管カニューレ処置を行い、胆汁を全量回収することで、胆汁が消化管に供給されない系を作製した。胆汁カニューレ処置及び非処置ラットで比較したところ、HDA, ODA, TDA 及び CP-III の血漿中濃度はほとんど差がなかった。さらに、回収した胆汁中における濃度を定量したところ、HDA, ODA, 及び TDA は検出されなかった (検出限界: 0.42 nM)。また、CP-III については検出されたものの、胆汁中排泄速度は PBD によって低下しなかった。以上より、胆汁中排泄及び腸肝循環は HDA, ODA, 及び TDA の体内動態において重要ではないことが示された。また、PBD は HDA 及び TDA の腎臓-血液間分配係数 ($K_{p,kidney}$) を有意に低下させたことから (図 3)、*in vivo* においても腎 Oats が HDA 及び TDA の腎取り込みを制御している可能性がある。HDA の $K_{p,liver}$ 絶対値は $K_{p,kidney}$ より約 7 倍高いが、TDA では両者にほとんど差はない (図 2, 3) ことから、HDA は肝取り込みが血漿中濃度に及ぼす影響が大きいように予想されたが、生合成による影響とも考えられ、この結果のみから肝腎取り込みのどちらがより重要であるか判断することは困難である。そこで、腎結紮処置を施したラットで評価することで、OATP1Bs

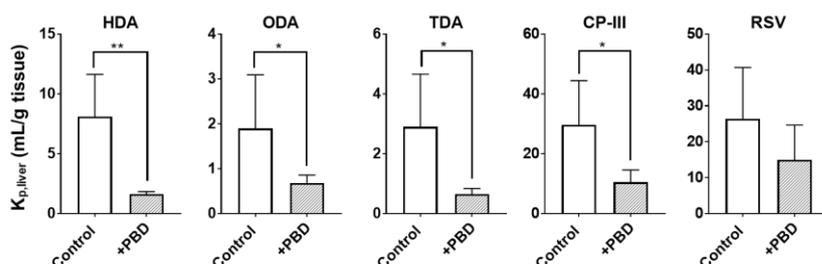


図2 胆汁カニューレ非処置ラットにおけるOATP1Bs内因性基質及びRSVの肝臓-血液間分配係数 ($K_{p,liver}$) へのPBDの影響

内因性基質の体内動態への肝腎取り込みの寄与を調べられるのではないかと考えた。腎結紮処置ラットの PBD 投与群・非投与群間では、HDA, ODA, TDA 及び CP-III 血漿中濃度が PBD 投与群で著しく上昇し、また、HDA, ODA 及び TDA の $K_{p,liver}$ は有意に低下した (図 4)。一方で、これら内因性基質の血漿中濃度及び $K_{p,liver}$ は、PBD 非投与の腎結紮処置ラットと非処置ラット間でほとんど差がなかった (図 4)。以上より、HDA, ODA 及び TDA の血漿中濃度に腎取り込みはほとんど影響せず、肝取り込みの寄与が大きいことが示唆された。上記の結果より、内因性基質 4 化合物のうち、HDA が最も肝取り込みが体内動態に及ぼす影響が大きいと考えられたため (図 1-4)、HDA に重点を置き、この安定標識体 deuterium-labeled HDA (d-HDA) を用いて、インテグレーションプロット解析により臓器中取り込みクリアランス (CL_{uptake}) を評価することとした。この結果、d-HDA の $CL_{uptake,liver}$ は $CL_{uptake,kidney}$ の約 16 倍と著しく高値であった。さらに、また、PBD 投与により、 $CL_{uptake,liver}$ は Control 群の 19.4%、 $CL_{uptake,kidney}$ は 63.9% まで低下した。このことから、腎取り込みよりも肝取り込みが体内動態に及ぼす寄与が大きい可能性が示唆され、腎結紮処置ラットで得られた結果との

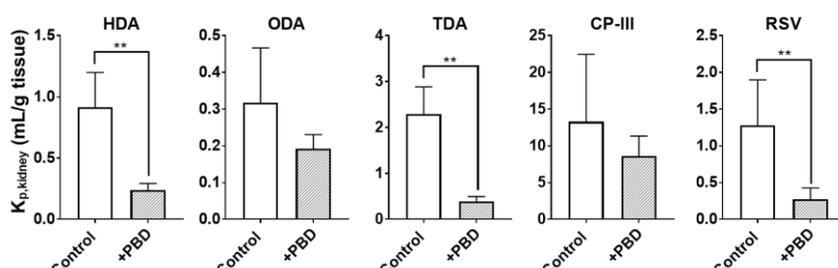


図3 胆汁カニューレ非処置ラットにおけるOATP1Bs内因性基質及びRSVの腎臓-血液間分配係数 ($K_{p,kidney}$) へのPBDの影響

腎結紮処置ラットの PBD 投与群・非投与群間では、HDA, ODA, TDA 及び CP-III 血漿中濃度が PBD 投与群で著しく上昇し、また、HDA, ODA 及び TDA の $K_{p,liver}$ は有意に低下した (図 4)。一方で、これら内因性基質の血漿中濃度及び $K_{p,liver}$ は、PBD 非投与の腎結紮処置ラットと非処置ラット間でほとんど差がなかった (図 4)。以上より、HDA, ODA 及び TDA の血漿中濃度に腎取り込みはほとんど影響せず、肝取り込みの寄与が大きいことが示唆された。上記の結果より、内因性基質 4 化合物のうち、HDA が最も肝取り込みが体内動態に及ぼす影響が大きいと考えられたため (図 1-4)、HDA に重点を置き、この安定標識体 deuterium-labeled HDA (d-HDA) を用いて、インテグレーションプロット解析により臓器中取り込みクリアランス (CL_{uptake}) を評価することとした。この結果、d-HDA の $CL_{uptake,liver}$ は $CL_{uptake,kidney}$ の約 16 倍と著しく高値であった。さらに、また、PBD 投与により、 $CL_{uptake,liver}$ は Control 群の 19.4%、 $CL_{uptake,kidney}$ は 63.9% まで低下した。このことから、腎取り込みよりも肝取り込みが体内動態に及ぼす寄与が大きい可能性が示唆され、腎結紮処置ラットで得られた結果との

対応が認められた。また、d-HDA 肝取り込みにおけるラット Oatps の影響を調べるため、ラット肝臓から単離した肝細胞を用いて取り込み実験を行った。基質 d-HDA 及び阻害剤 (PBD, cyclosporin A (CsA), rifampicin (RIF))を同時にラット肝細胞に曝露させ、d-HDA の取り込みを評価した。ヒト血清アルブミン (Human serum albumin; HSA)非添加で実験を行ったところ、d-HDA の取り込みは、Control (37°C)と 4°Cにおいてほとんど差が認められなかった。このことから、HSA 非添加時には、d-

HDA の非特異的吸着によりトランスポーターを介した輸送が見えなかったという可能性を考え、HSA 10 μM を添加した薬液を用いて取り込み実験を行ったところ、PBD, CsA 及び RIF により d-HDA の取り込みは有意に低下し、Control の 55.4%, 39.3%及び 20.2%であった。また、OATP1Bs プロブ基質である pitavastatin (PTV)及び rosuvastatin (RSV)を基質として PBD の影響を評価したところ、これらの取り込みは有意に低下した。以上より、d-HDA は Oatps によって取り込まれ、PBD が Oatps を阻害することで肝取り込み低下が生じたと考えられる。ラット *in vivo* 実験における PBD 非結合型血漿中濃度は、48.6-306 μM であり、この取り込み実験で設定した PBD 濃度 (100 μM)よりも高く推移しているため、ラットで内因性 HDA 血漿中濃度が PBD によって上昇した機序として、肝取り込みトランスポーター Oatps の阻害作用がある可能性が示唆された。さらに、ヒト OATP1Bs の代表的な分子種であるヒト OATP1B1 遺伝子を過剰発現させた HEK293 細胞 (HEK293/OATP1B1 細胞)を用いて輸送実験を行ったところ、PBD 及び CsA による d-HDA 取り込み阻害は、ラット肝細胞使用時と同様、HSA 添加時には認められた一方、HSA 非添加時には認められなかった。さらに、50%阻害濃度 (IC₅₀)を算出したところ、PBD で 25.8 μM 、CsA で 1.38 μM であった。ラット肝細胞における HDA 取り込みに Oatps が関与することから、ヒト肝細胞においても HDA が取り込まれる可能性が考えられる。しかしながら、今のところ報告はなく、また、生体内における肝取り込みの体内動態に及ぼす影響も未解明であるため、今後検証していく必要がある。

【結論】本研究により、ラットにおける HDA 体内動態に腎消失及び胆汁排泄がほとんど影響しない一方で、Oatps を介した肝取り込み過程が重要であることを示した。PBD は Oatps を阻害し HDA 肝取り込みを低下させて血漿中濃度上昇に関与したと考えられる。したがって、少なくともラットにおいて、HDA は Oatps のバイオマーカーになりえることが示唆された。新薬の OATP1Bs 阻害作用を評価する際に、ラットに新薬を投与した時の HDA 血漿中濃度の変化を評価項目に加えることで、OATP1Bs による DDI リスクをより正確に予測し、効率的な医薬品開発に貢献できる可能性がある。

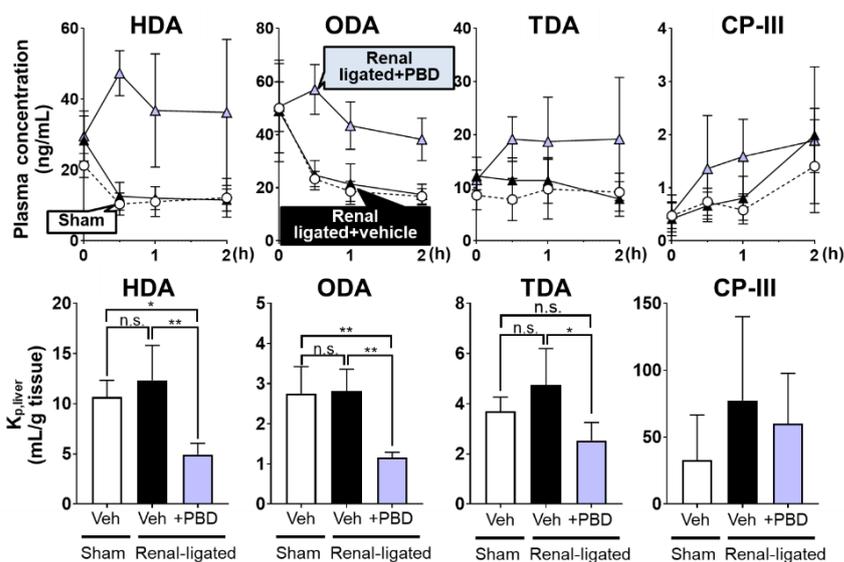


図4 腎結紮処置ラットにおけるOATP1Bs内因性基質血漿中濃度及び K_{p,liver}へのPBDの影響

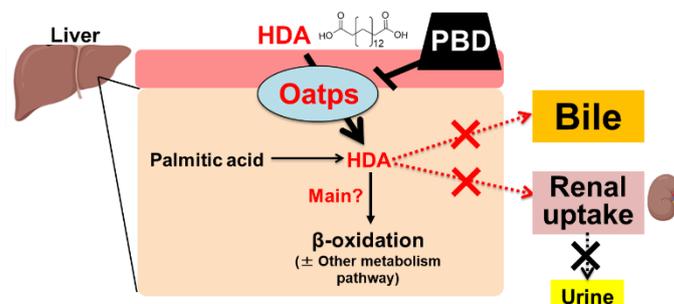


図5 ラットにおけるPBDのHDA体内動態に対する影響

審査結果の要旨

Organic anion transporting polypeptide 1Bs (OATP1Bs)は、多くの薬物の肝取り込みに働き、その阻害薬は基質薬物の血中濃度を上昇させること（薬物相互作用）がある。近年、ヒトに阻害薬物を投与した際に血中濃度が増加するOATP1Bs内因性基質が見出されている。しかしそれらの体内動態に肝取り込み過程とそれ以外がどの程度寄与するかは不明であるため、本研究はその解明を目指しラットを用い検討した。バイオマーカー(BM)としての妥当性を検証する目的で、OATP1Bs 以外に腎取り込みや胆汁排泄過程を阻害しうるprobenecid (PBD)を用いた。PBD 投与によって既知の4つの内因性基質の血中濃度は上昇し、肝臓と腎臓の対血中濃度比が低下した。腎結紮処置による血中濃度の変動はわずかであり、しかも腎結紮時にも同様のPBDの効果が見られたことから、腎消失の関与はわずかと考えられた。胆汁排泄もわずかであった。OATP1Bs 典型的阻害薬 rifampicin でも同様な影響が見られ、最も顕著な影響を受けた hexadecanedioate(HDA)について、重水素標識体を用いPBDによる肝取り込みの低下を示し、肝取り込み効率の低下と血中濃度の増加がほぼ対応することを見出したほか、ラット遊離肝細胞と OATP1B1 発現細胞での標識体取り込みとPBDによる阻害を示した。以上よりHDAがOatpsを介した肝取り込み変動を血中濃度に反映するBMである可能性が示された。本論文はげっ歯類を使った薬物相互作用スクリーニングにも道筋を示しており、博士(創薬科学)論文に値すると判定された。