

博士論文

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

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 1729012003

学生氏名 二木 梓

主任指導教員 加藤 将夫 教授

目次

緒言	-3-
方法	-6-
結果	-13-
考察	-17-
引用文献	-22-
図表	-29-
謝辞	-44-
参考文献	-45-

略語一覽

AUC _{0-2h}	area under plasma concentration–time curve from time 0 to 2 hours
C _{liver,2h}	hepatic concentration at 2 hours after administration of rosuvastatin
CL _{uptake,tissue}	tissue uptake clearance
CP-I	coproporphyrin I
CP-III	coproporphyrin III
CsA	cyclosporin A
DDI	drug–drug interaction
d-HDA	deuterium-labeled hexadecanedioic acid (1,16-hexadecanedioic-D28 acid)
HDA	hexadecanedioate
HEK	human embryonic kidney
HSA	human serum albumin
IC ₅₀	concentrations required to inhibit transport by 50%
KH buffer	Krebs–Henseleit buffer
K _{p,tissue}	tissue-to-plasma concentration ratio
LC-MS/MS	liquid chromatography–tandem mass spectrometry
LLOQ	lower limits of quantitation
MRM	multiple reaction monitoring
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion–transporting polypeptide
ODA	octadecanedioate
PBD	probenecid
PTV	pitavastatin

RIF	rifampicin
RSV	rosuvastatin
TDA	tetradecanedioate
$V_{\text{bile},1.5-2\text{h}}$	bile efflux velocity from time 1.5 to 2 hours

緒言

Organic anion transporting polypeptide 1Bs (OATP1Bs)は肝臓のシヌソイド側膜に発現しており、rosuvastatin (RSV)等の基質薬物の体内動態を決定する重要な因子である¹。OATP1Bsの阻害剤は基質薬物の血漿中濃度を上昇させ^{2,3}、薬効変動及び副作用リスクの増大に関与する⁴。したがって、新薬がOATP1Bsを阻害し、薬物間相互作用 (drug-drug interaction: DDI)が生じる可能性を研究開発段階で予測する必要がある。近年、OATP1Bs阻害剤投与及び遺伝子多型によるOATP1Bsの輸送活性変動により、この内因性基質の血漿中濃度が上昇することが臨床において報告されてきた。中でも、coproporphyrin (CP)-I, CP-III, hexadecanedioate (HDA), tetradecanedioate (TDA), octadecanedioate (ODA), glycochenodeoxycholate sulfate は、強力なOATP1Bs阻害剤であるrifampicin (RIF)⁵⁻⁹及びcyclosporin A (CsA)^{10,11}投与、また、輸送活性を低下させる遺伝子多型 c.521T>C 変異¹¹⁻¹³により、血中濃度曲線下面積 (area under plasma concentration–time curve: AUC)を有意に上昇させる。このことから、これらの内因性基質はOATP1Bs輸送活性を評価しうるバイオマーカーとして注目されている。特にCP-I及びCP-IIIは、臨床試験第II相試験において、治験薬fenebrutinibのOATP1Bs阻害作用評価に用いられ、その有用性が示唆されている¹⁴。

しかし、OATP1Bs内因性基質を基質として認識するトランスポーターはOATP1Bs以外にも存在する。したがって、それらOATP1Bs以外のトランスポーターがOATP1Bs内因性基質の体内動態に影響する可能性がある。例えば、HDA及びTDAはOATP1Bs以外にもorganic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6)及びOAT3/SLC22A8の基質である¹⁰。OAT1及びOAT3はヒト腎臓において血管側に発現しており、基質化合物の腎取り込みに働くことで、腎排泄を制御する¹⁵。したがって、これら内因性基質の体内動態において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、内因性基質の血漿中濃度の変化のみに基づい

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。また、OATP1Bs 内因性基質が主に肝臓に選択的に取り込まれたとしても、取り込み後に大部分が胆汁排泄される場合、治験薬がその胆汁排泄過程を阻害すると OATP1Bs 内因性基質の血漿中濃度が上昇する可能性もある。肝臓、腎臓のいずれのトランスポーター阻害が血漿中濃度に影響しているかは、内因性基質自身の体内動態特性、特に肝臓と腎臓のクリアランスへの寄与率によって決まる。OATP1Bs を介した DDI 予測における偽陽性/偽陰性を避けるためには、OATP1Bs 内因性基質の主要排泄経路等の体内動態特性に関する情報が不可欠であるが、その多くにおいて肝臓、腎臓の寄与率は十分解明されていない。

Probenecid (PBD)は OAT1 及び OAT3 の強い阻害剤であるが¹⁶、*in vitro* において OATP1B1 阻害作用も認められている¹⁷⁻¹⁹。近年の臨床試験にて、PBD との共投与により、OATP1Bs プローブ基質である RSV の AUC が 2.2 倍程度上昇したことが報告された²⁰。このことから、*in vivo* において、PBD は OATP1Bs を阻害する可能性が示唆された。PBD による OATP1Bs 内因性基質の血漿中濃度への影響についても調べられており、PBD とフロセミドの共投与により、フロセミド単独投与時と比べ HDA 及び TDA の AUC は 1.62 倍、2.27 倍上昇することが示された¹⁹。これはサルにおいても同様であり、PBD 投与によって HDA 及び TDA の AUC が 1.9 倍、2.8 倍まで上昇することが報告されている²¹。しかしながら、PBD による HDA 及び TDA の血漿中濃度上昇の詳細なメカニズムは未解明であり、腎 OATs の阻害が原因である可能性も考えられる。さらに、PBD は、ラットにおいてイリノテカン及びその代謝物の胆管側膜透過過程を阻害し、胆汁中排泄を低下させる²²。したがって、OATP1Bs 内因性基質の胆汁中排泄過程を阻害する可能性も考えられる。以上より、PBD による血漿中濃度上昇の機序を説明するためには、OATP1Bs 内因性基質の主要な消失過程の解明が不可欠である。

ヒトを対象とした試験においては、プローブ化合物の血漿中濃度が変動した場合においても、その作用機序を十分に解明することは困難である。一方、動物実験では、標識

化合物の投与、臓器中濃度の測定、胆管カニューレによる腸肝循環の影響評価等が可能であり、OATP1Bs 内因性基質の体内動態特性の理解に有用である可能性がある。

したがって、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 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。

方法

試薬

PBD 及び pitavastatin (PTV)は FUJIFILM Wako Pure Chemical (Osaka, Japan)より、RSV, HDA, ODA, TDA, 及び RIF は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)より、deuterium-labeled hexadecanedioate (1,16-hexadecanedioic-D28 acid; d-HDA)は CDN isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada)より、CsA は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)より、CP-III は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)より購入した。上記以外の試薬はすべて市販試薬特級を用いた。

動物

Sprague Dawley系ラットを三協ラボから購入した。8から9週齢の雄ラットを実験に用いた。動物はすべて標準食で適切な温度、明るさの環境において飼育され、水及び食餌は自由摂取とした。動態試験及びラット肝細胞単離の18時間前から絶食を開始した。動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

ラットにおける動態試験

胆管カニューレシヨンのため、イソフルラン麻酔下のラットを固定し、胆管にポリエチレンカテーテル (SP31; Natsume, Tokyo)を挿入した。非処置群においてもカテーテル挿入以外の処置を同様に行った。PBD は 2N NaOH, 1 M Tris 及び phosphate-buffered saline (3:17:80)に溶解し、pH を 7.3 に調節したものをを用いた。また、RIF は DMSO, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 及び生理食塩水 (5:13:82)に溶解したものをを用いた。胆管カニューレ処置開始 20 分後に PBD (100 mg/kg), RIF (10, 25 mg/kg), もしくは溶媒のみを大腿静脈から投与し、その 5 分後に RSV を 5 mg/kg となるように 0.5% methyl cellulose 溶液に懸濁させたものを経口投与した。RSV 投与後から、胆汁は 30 分間隔で、血液は 0.5, 1, 2 時間後

に尾静脈から回収した。血液サンプルは回収後すみやかに 3,913 g、5 分で遠心し、上清を血漿サンプルとして用いた。2 時間後の血漿を回収後、ラットを安楽死させ、肝臓と腎臓をすみやかに回収した。臓器中分布は、組織 1 g あたりの取り込み量を血漿中濃度で補正した値である組織-血液間分配係数 ($K_{p,tissue}$)を用いて評価した²³。

腎結紮処置のため、イソフルラン麻酔下のラットを固定し、縫合糸 (Natsume, Tokyo, Japan)を用いて左右両方の腎臓の腎動脈及び腎静脈を結紮した。結紮した腎の切除後、腹筋及び皮膚を縫合して傷口を閉じた。Sham 処置群においても腎結紮及び切除以外の処置を同様に行った。麻酔解除後、PBD (100 mg/kg)もしくは溶媒のみを静脈内投与し、その後、胆管カニューレ処置ラットと同様に血漿及び組織を回収した。

さらに、HDA の臓器取り込み解析のため、イソフルラン麻酔下のラットに PBD (100 mg/kg)もしくは溶媒のみを左大腿静脈より投与し、その 5 分後に d-HDA 1 mg/kg (DMSO, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, and saline (5:13:82)に溶解)を右大腿静脈より投与した。血液は、d-HDA 投与開始から 0.25, 0.5, 1, 5 分後に回収し、上記と同様の処理を行って血漿を回収した。また、1 分または 5 分後にラットを安楽死させ、すみやかに肝臓及び腎臓を回収した。血漿、肝臓、腎臓中 d-HDA 濃度を測定した。

0 分から t 分後までの AUC (AUC_{0-t})は線形台形法より計算した。血漿中濃度 (C_p)で補正した組織 1 g あたりの d-HDA 取り込み量 (X_t)は下記の式 (1)のように記述できる。

$$\frac{X_t(t)}{C_p(t)} = CL_{uptake,tissue} \times \frac{AUC_{0-t}}{C_p(t)} + V(0) \quad (1)$$

$V(0)$ は 0 分後における分布容積を示す。式 (1)に基づいて $AUC_{0-t}/C_p(t)$ 値に対する $X_t(t)/C_p(t)$ 値を各ラットについてプロットし、この回帰直線から臓器中取り込みクリアランス ($CL_{uptake,tissue}$)を得た。

ラット肝細胞を用いた d-HDA 取り込み試験

ラット肝細胞は二段階コラゲナーゼ灌流法²⁴にしたがって単離した。単離した肝細胞は 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 含有 William's E 培地に懸濁し、トリパンブルー染色で生細胞を計数した。その後、collagen I コートした 24 ウェルディッシュに生細胞数が 2.4×10^5 cells/cm² となるよう播種した²⁵。細胞は 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で 2 時間培養した。取り込み実験は、既報にしたがって dish 法で行い²⁵、非特異的吸着防止のための変更を加えた。すなわち、開始前に William's E 培地を除去し、Krebs–Henseleit (KH) buffer (118 mM NaCl, 4.83 mM KCl, 5 mM D-glucose, 1.53 mM CaCl₂, 0.96 mM KH₂PO₄, 1.20 mM MgSO₄, 23.1 mM NaHCO₃, and 12.5 mM HEPES, pH 7.4) で wash したのち 37°C, 10 分間プレインキュベーションした。KH buffer を除去し、薬液を添加した。薬液として、10 µM fatty acid free human serum albumin (HSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)^{23,26} を溶解させた KH buffer に、基質 (d-HDA, RSV, PTV) 及び阻害剤 (PBD, RIF, CsA) もしくは DMSO を加えたものを用いた。30 分後、薬液を除去し、ice-cold KH buffer で 3 回 wash した。細胞は風乾した後、300 µL の水とともに細胞をセルスクレーパーで回収し、ソニケーションで細胞を破壊した。サンプルは内標 (verapamil) を含んだアセトニトリルを加えて 21,500 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清をもう一度遠心して得た上清を測定に用いた。LSMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて d-HDA, PTV, RSV を測定した。タンパク濃度はブラッドフォード法で測定した。

HEK293/hOATP1B1 細胞を用いた d-HDA 取り込み試験

HEK293 細胞にヒト OATP1B1 遺伝子 (*hOATP1B1*) もしくはベクター (pcDNA3) のみを安定発現させた HEK293/hOATP1B1 細胞と HEK293/mock 細胞を Izumi らの報告¹⁸にしたがい培養した。細胞は、10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate 及び 80 µg/ml hygromycin 含有ダルベッコ改変イーグル培地を用いて 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。取り込み実験は dish 法¹⁸ に非特異的吸

着防止のための変更を加えて行った。すなわち、実験開始前に、細胞は poly-l-lysine コートした 24 well dish に 2.0×10^5 cells/cm² で播種し、37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で培養した。48 時間後、培地を除去し、KH buffer で wash したのちに 37°C, 10 分間プレインキュベーションした。KH buffer を除去し、基質 (d-HDA, RSV, PTV) 及び 10 µM HSA 含有 KH buffer を添加した。10 分後、薬液を除去し、ice-cold KH buffer で 3 回 wash した。細胞は風乾した後、300 µL の水とともに細胞をセルスクレーパーで回収し、ソニケーションで細胞を破壊した。サンプルは内標 (verapamil) を含んだアセトニトリルを加えて 21,500 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清をもう一度遠心して得た上清を測定に用いた。LSMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて d-HDA, PTV, RSV を測定した。タンパク濃度はブラッドフォード法で測定した。

OATP1B1 を介した取り込みは、HEK293/hOATP1B1 細胞の取り込み量と HEK293/mock 細胞の取り込み量の差から計算した。PBD 及び CsA が OATP1B1 による取り込みを 50% 阻害するのに必要な濃度 (IC₅₀) と取り込み量の関係は式(2)で示される²⁷。

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

V_{control} 及び V_{Inhibitor} は阻害剤非添加時、添加時の取り込み活性をそれぞれ示しており、また、I は阻害剤の薬液中濃度、γ はヒル係数である。MULTI プログラムを用いて、非線形最小二乗法にて式(2)にデータをフィッティングすることで IC₅₀ を算出した²⁸。

組織試料の前処理

-80°C で保存した組織を氷上に移し、300 mg を秤量して 900 µL のメタノールを添加した。ジルコニアシリカビーズ 1.2 mm (Biomedical Science, Tokyo, Japan) を入れ、ビーズ式 homogenizer (Precellys 24 homogenizer, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) を用い、6,500 rpm で 90 秒 (30 秒×3 回、インターバル 30 秒) かけてホモジナイズした。得られたホモジネートに内標準物質 (verapamil) を含んだアセトニトリルを加

えて 21,500 g、4 °Cで 10 分間遠心した。上清を採り、さらに遠心して得た上清を測定に用いた。

OATP1Bs 内因性基質及び薬物の濃度測定

HDA, ODA, TDA, CP-I, CP-III, d-HDA, PTV, RSV, PBD の測定は、LC システム (Nexera, Shimadzu)を接続した LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan)、LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて行った。カラムは Cosmosil C18-MS-II packed column (3 µm particle size, 2.0 mm I.D. × 50 mm; Nacalai Tesque)を用いた。流速は 0.4 mL/min とした。CP-I 及び CP-III の分子量及び precursor/product ion は同じであるため、既報⁵を参考に保持時間の差により区別し、CP-I は 2.99 分、CP-III は 3.23 分のピークから定量した。各化合物の測定条件及び定量限界 (lower limits of quantitation: LLOQ)を下記に示す。

<LC-MS/MS condition> (HDA, ODA, TDA, d-HDA, PTV, RSV, PBD)

Instrument : LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Mobile Phase : A) 0.1 % HCOOH

B) 0.1 % HCOOH in methanol

Time (min)	% of A	% of B
0	95	5
1.0	95	5
4.0	5	95
4.5	5	95
5.5	95	5

<LC-MS/MS condition> (CP-I and CP-III)

Instrument : LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Mobile Phase : A) 0.1 % HCOOH,

B) 0.1 % HCOOH in acetonitrile

Time (min)	% of A	% of B
0	70	30
0.3	70	30
6.0	50	50
6.5	2	98
7.5	2	98
8.0	70	30

<MRM precursor/product ion transitions>

Compounds	Ion mode	Q1 [Da]	Q3 [Da]	LLOQ (nM)
Hexadecanedioate	Negative	285.30	223.20	14
Octadecanedioate	Negative	313.10	251.30	14
Tetradecanedioate	Negative	257.30	239.15	14
Hexadecanedioic d-28 acid	Negative	313.40	250.50	1.4
Coproporphyrin I	Positive	655.40	523.45	4.2
Coproporphyrin III	Positive	655.40	523.45	0.42
Pitavastatin	Positive	422.10	290.10	1.4
Rosuvastatin	Positive	482.00	258.05	4.2
Probenecid	Negative	284.20	239.95	14
Verapamil	Positive	455.20	165.05	---

統計解析

全ての結果は平均値±標準偏差として示した。有意差検定として、対応の無い2群間の比較には Student の t 検定を適用した。また、多群間の比較には one-way ANOVA とそれに続く Tukey-Kramer test を用いて計算した。p 値<0.05 を有意差ありとした。分析及びグラフの作成には Windows 用 GraphPad Prism (Prism7, GraphPad Software, Inc., CA)を使用した。

結果

胆管カニューレ処置ラットにおける PBD の OATP1Bs 内因性基質体内動態への影響

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, CP-I 及び CP-III 濃度を定量した。PBD 投与群において血漿中 HDA, ODA, TDA 及び CP-III 濃度は上昇し (Fig. 1A-D)、各化合物の AUC_{0-2h} は有意に上昇した (Table 1)。一方、CP-I は全ての血漿サンプルにおいて定量限界以下 (<4.2 nM) であった。さらに、PBD は $K_{p,liver}$ を低下させたことから (Fig. 2A-D)、これらの化合物の肝臓中への分布が減少していることが示唆された。また、これらの内因性基質はいずれも Control 群における $K_{p,liver}$ の絶対値が細胞外容積 (0.2~0.3) と比べて十分に高いため (Fig. 2A-D)、[1] 肝臓への取り込みが大きい、[2] 肝臓で生合成されている、もしくはこれら両方が原因として考えられた。PBD は HDA 及び TDA の $K_{p,kidney}$ を有意に低下させた (Fig. 2F, H)。さらに、OATP1Bs の強力な阻害剤である RIF によってこれら化合物の血漿中濃度は顕著に上昇し (Fig. 3A-D)、HDA、TDA 及び CP-III の $K_{p,liver}$ は有意に低下した (Fig. 3F-I)。コントロール群における各化合物の肝臓中濃度は、HDA 及び ODA では腎臓中濃度の 5 倍以上高値であった一方、CP-III は腎臓中濃度の 2 倍程度、TDA については腎臓中濃度とほぼ同程度であった (Fig. 2)。

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 (Fig. 1A-D, F-I)。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 (Table 1)。さらに、胆管カニューレ処置ラットにおいても PBD 投与に

より血漿中 HDA, ODA, TDA 及び CP-III 濃度が上昇した (Fig. 1 F-I)。以上より、腸肝循環は HDA, ODA, 及び TDA 及び CP-III の体内動態において重要ではないことが示された。ヒト及びげっ歯類における OATP1Bs *in vivo* 基質である RSV についても同様に PBD の影響を評価した。PBD は RSV の血漿中濃度を上昇させたが、この AUC 上昇は有意ではなかった (Fig. 1E, J, Table 1)。RSV の $K_{p,liver}$ に関しても、PBD による低下傾向が見られたものの、その有意性は認められなかった (Fig. 2E)。一方、RIF によって RSV の血漿中濃度は著しく上昇した (Fig. 3E)。この原因として、PBD は RIF よりも OATP1Bs 阻害作用が弱いことが考えられる。また、胆管カニューレ処置ラットと非処置ラットにおける PBD 血漿中濃度を比較したが、両者にほとんど差はなかった (Fig. 4A, B)。

腎結紮ラットにおける PBD の OATP1Bs 内因性基質体内動態への影響

PBD による腎 Oats 阻害が OATP1Bs 内因性基質の体内動態に及ぼす影響を評価するために、PBD を腎結紮処置ラットに投与した。PBD 投与した腎結紮処置ラットにおいて、血漿中 HDA, ODA, TDA 及び CP-III 濃度は上昇した (Fig. 5A-D, Table 2)。また、PBD 投与した腎結紮処置ラットの HDA, ODA 及び TDA の $K_{p,liver}$ は、溶媒のみを投与した腎結紮処置ラットと比較して有意に低下した (Fig. 5E-G)。さらに、OATP1Bs 内因性基質の血漿中濃度は、腎結紮処置ラットと非処置ラットとでほとんど差がなかった (Fig 5A-D, Table 2)。以上より、HDA, ODA, TDA 及び CP-III の血漿中濃度には腎消失がほとんど影響しないことが示唆された。

PBD による Oats 阻害を評価するために、ヒト及びげっ歯類において Oats 内因性基質であることが報告されている *indoxyl sulfate*^{29,30} の血漿中濃度を調べた。PBD は血漿中 *indoxyl sulfate* 濃度を上昇させ、また、 $K_{p,kidney}$ を有意に低下させた (Fig. 6A, B)。一方で、 $K_{p,liver}$ はほとんど変動させなかった (Fig. 6C)。さらに、腎結紮ラットの血漿中 *indoxyl sulfate* 濃度は非処置ラットと比較して高値であり、 AUC_{0-2h} は有意に上昇した (Fig. 7A,

B)。一方、腎結紮処置ラットにおいて、PBD 投与群及び溶媒のみを投与した群間では AUC_{0-2h} はほとんど差がなかった (Fig. 7B)。以上より、この PBD 投与実験において、PBD が腎 Oats を阻害していることが示された。

PBD による d-HDA 肝腎取り込みクリアランスへの影響

本研究で対象とした OATP1Bs 内因性基質 4 化合物のうち、HDA 及び TDA は PBD 投与により他の化合物よりも著しく AUC_{0-2h} が増大し (Fig. 1, Table 1)、さらに、HDA 及び ODA は $K_{p,liver}$ の絶対値が $K_{p,kidney}$ と比較し著しく高値であった (Fig. 2)。したがって、HDA についてさらなる検討を行うこととし、この化合物の臓器取り込み ($CL_{uptake,tissue}$) を評価するため、安定同位体標識体 d-HDA をラットに静脈内投与し、インテグレーションプロット解析を行った。Control 群について得られた回帰直線の y 切片は、肝臓で 0.21 $\mu\text{L/g tissue}$ 、腎臓で 0.16 $\mu\text{L/g tissue}$ であり、ラットにおける肝臓、腎臓の細胞外容積に近い値であった (Fig. 8)。また、PBD 投与により、d-HDA の $CL_{uptake,liver}$ は Control 群の 19.4%、 $CL_{uptake,kidney}$ は 63.9% にまで低下した (Table 3)。また、Control 群の $CL_{uptake,liver}$ は $CL_{uptake,kidney}$ の約 16 倍であり、d-HDA の体内動態において、腎取り込みよりも肝取り込みの寄与が大きい可能性が示された。

ラット肝細胞における d-HDA 取り込み実験

HDA の肝取り込みを PBD が阻害するか直接評価するため、ラット肝臓から単離した肝細胞を用いて d-HDA 取り込み実験を行った。基質 d-HDA 及び阻害剤 (PBD, CsA, 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。最初に、KH buffer に HSA 添加せずに実験を行ったところ、OATP1Bs の強力な阻害剤である CsA 又は RIF を添加しても d-HDA の取り込みは減少しなかった (Fig. 9A)。また、d-HDA の取り込みは 4°C においても減少しなかった (Fig. 9A)。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づら可能性が示唆された。そこで、非特異的吸着の影響を抑えるために、HSA を添加して取り込みを評価することとした。その結果、PBD, CsA 及び RIF は 100 μ M 添加時に d-HDA の取り込みを有意に低下させ、阻害剤非添加時の 55.4%, 39.3% 及び 20.2% であった (Fig. 9B)。また、d-HDA の取り込みは 4°C において 34.9% まで減少した。さらに、これら阻害剤は RSV 及び PTV の取り込みも有意に低下させた (Fig. 9C, D)。PBD にも RSV 及び PTV の肝取り込みを低下させる作用が認められたが、取り込み減少率として CsA 及び RIF よりも小さいことから、これら基質に対して PBD は CsA 及び RIF よりも肝取り込み阻害作用が弱いことが示唆された (Fig. 9C, D)。

HEK293/hOATP1B1 細胞における d-HDA 取り込み実験

ヒト OATP1Bs の分子種として OATP1B1 及び OATP1B3 があるが、既報において、OATP1B1 が HDA 及び TDA を基質として認識する一方で、OATP1B3 はこれら化合物を基質として認識しないことが示唆されている¹⁰。そこで、ヒト OATP1B1 遺伝子を過剰発現させた HEK293/hOATP1B1 細胞を用いて輸送実験を行い、PBD による OATP1B1 を介する d-HDA 取り込み阻害を評価した。ラット肝細胞における輸送実験と同様に、HSA 非添加時には、PBD は HEK293/hOATP1B1 細胞への d-HDA 取り込みを低下させなかった (Fig. 10A)。また、100 μ M の CsA を添加した場合でも d-HDA 取り込みは低下しなかった (Fig. 6A)。一方、HSA 添加時において、PBD と CsA どちらにおいても d-HDA の取り込みが見られ (Fig. 10B)、これら阻害剤の IC₅₀ を算出したところ、CsA に比べ PBD の方が約 20 倍大きかった (Fig. 10B, Table 4)。また、OATP1B1 の阻害は基質依存的であることが既報において報告されているため¹⁸、PTV 及び RSV についても PBD の阻害作用を評価した。PBD はこれら基質の取り込みを低下させたが、その阻害強度は CsA よりも弱いことが示された (Fig. 10C, D, Table 4)。

考察

本研究より、ラットにおいて OATP1Bs 内因性基質の肝取り込みは PBD によって阻害されることが示された。対象とした OATP1Bs 内因性基質の肝臓への分布は PBD 投与によって低下し (Fig. 2A-D)、血漿中濃度は上昇した (Fig. 1A-D)。4 化合物のうちのひとつである HDA の標識体 d-HDA については、肝取り込みクリアランス $CL_{\text{uptake,liver}}$ をインテグレーションプロット解析によって算出し、PBD によって顕著に低下することを定量的に示した (Fig. 8, Table 3)。Vehicle 投与群における $CL_{\text{uptake,liver}}$ は 340 mL/h/kg (Table 3)であったが、これはラットにおける肝血流速度 $3.3 \times 10^3 \text{ mL/h/kg}^{31}$ よりも著しく低いことから、d-HDA の肝取り込みにおける律速段階は肝血流ではなく、シヌソイド側膜の透過であることが示唆された。PBD は内因性 HDA の血漿中濃度 (Fig. 1A, Table 1)及び肝分布 (Fig. 2A)だけでなく、d-HDA の肝取り込み過程 (Fig. 8A, Table 3)にも影響を及ぼすことがわかった。以上より、本研究では、HDA の血漿中濃度及び肝分布は主に肝取り込み過程によって制御され、さらに、PBD が d-HDA の肝取り込みを直接的に阻害することで HDA 血漿中濃度上昇が生じたことを初めて示した。ラット *in vivo* 実験における PBD 非結合形血漿中濃度は、ラット血漿中における PBD の非結合型分率 0.243³² を考慮すると、48.6-306 μM であり (Fig. 4)、ラット肝細胞を用いた取り込み実験で設定した PBD 濃度 (100 μM)よりも一部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の阻害作用がある可能性が示唆された。この結果は、HDA がラットにおいて OATP1Bs の有用なバイオマーカーとなりうる可能性を支持する。

腎結紮ラットに PBD 投与を行った群の AUC が、PBD 非投与群と比較して有意に上昇したこと及び腎結紮処置と sham 処置ラットでほとんど差がなかったこと (Fig. 3, Table 2)から、本研究で対象とした 4 種の OATP1Bs 内因性基質の消失において肝臓が主要経路であることが示唆された。したがって、HDA 及び TDA が *in vitro* において腎取

り込みトランスポーターOAT1 及び OAT3 の基質であると報告されているが¹⁰、PBD 投与による OATP1Bs 内因性基質血漿中濃度上昇は腎取り込みの阻害によるものではないと考えられる。この仮説は、OATP1Bs 内因性基質が腎臓よりも肝臓に高く分布すること (Fig. 2)、d-HDA の $CL_{\text{uptake,liver}}$ が $CL_{\text{uptake,kidney}}$ よりも著しく高いこと (Fig. 8, Table 3)からも支持される。PBD は内因性 HDA 及び TDA の腎臓への分布を減少させ (Fig. 2F, H)、また、d-HDA の $CL_{\text{uptake,kidney}}$ を低下させたことから (Fig. 8B, Table 3)、PBD はこれら化合物の腎取り込みを阻害していたことが示唆される。さらに、PBD は、Oat1 及び Oat3 の典型基質である *indoxyl sulfate*^{29,30} の血漿中濃度を上昇させ、また、腎分布を低下させた (Fig. 6A, B)。したがって、PBD による腎 Oats 阻害作用は今回のラットを用いた実験においても確認できたといえる。腎結紮処置ラットにおいては、PBD 非投与群においても Sham 処置ラットと比較して *indoxyl sulfate* 血漿中濃度が上昇し、さらに、腎結紮処置ラットにおいて PBD 投与群と非投与群間ではその血漿中濃度にほとんど差が認められなかった (Fig. 7)。これは OATP1Bs 内因性基質で見られた傾向と対照的である (Fig. 5, Table 2)。これらより、PBD による *indoxyl sulfate* 血漿中濃度上昇 (Fig. 6A)はその主要な消失経路が腎臓であることに由来し、一方で HDA 及び TDA は腎臓への分布が OATs で媒介されているものの、その腎取り込みによる血漿中濃度への影響が小さいことが、少なくともラットにおいて示された。本研究で用いたラット血漿における PBD 非結合型濃度は上記で述べたように 40 μM 以上であり (Fig. 4)、ラット Oat1 及び Oat3 の IC_{50} (4.97–10.9, 1.68–2.37 μM ^{33–36}) よりもはるかに高かったことから、本研究において PBD による腎 Oats 阻害作用があったことが示唆される。

生体内における HDA の消失経路には、肝臓における代謝が大きく寄与すると考えられる。本研究では、投与した d-HDA のうち約 55%が 5 分後に採取した肝臓で検出されたが、これは既報において ³⁵S-labeled 2-mercapto-1,16-HDA が腎臓よりも肝臓に主に分布したことと一致する³⁷。内因性 HDA はパルミチン酸から ω 酸化を介して生合成され

^{38,39}、この反応に関与する酵素は肝臓、脳、肺、腎臓等の臓器に発現する⁴⁰⁻⁴³。生合成された HDA は β 酸化を介して、コハク酸などの短鎖ジカルボン酸となり、糖新生に用いられる^{38,44,45}。本研究では、胆管カニューレ処置群及び非処置群において、HDA の血漿中濃度にほとんど差はなく (Fig. 1A, F, Table 1)、また、胆汁中で検出されなかったことから (Table 1)、腸肝循環による影響はないと考えられた。d-HDA の $CL_{\text{uptake,liver}}$ (340 mL/h/kg, Table 3) 及び内因性 HDA の血漿中濃度 (~20 ng/mL, Fig. 1A) より、定常状態における HDA の肝取り込み速度は 6.8 $\mu\text{g/h/kg}$ (~24 nmol/h/kg) と計算できる。一方で、HDA の胆汁中濃度が検出限界以下であり (0.42 nM, Table 1)、ラットにおける胆汁流速 3.75 mL/h/kg³¹ を考慮すると、HDA の胆汁中流出速度は高く見積もっても 1.6 pmol/h/kg となり、肝臓への取り込み速度の 10,000 倍以上低いことが分かる。このことから、HDA の消失においては胆汁中排泄の寄与が小さく、 β 酸化による代謝が主であると示唆される。

HSA 非存在下において、PBD 及び OATP1Bs の強力な阻害剤である RIF 及び CsA は、d-HDA のラット肝細胞における取り込みを低下させなかったが (Fig. 9A)、HSA 存在下ではいずれの阻害剤添加群でも低下が認められた (Fig. 9B)。同様の傾向は、OATP1B1 発現細胞における取り込み実験でも確認された (Fig. 10A, B)。この原因として、我々がこれまでに他化合物で報告してきたように^{23,26}、細胞膜及び取り込み実験用器具への基質の非特異的吸着を HSA 添加により防ぐことができたことが考えられる。しかしながら、HSA 非添加時においても、HEK293/OATP1B1 細胞の d-HDA 取り込みは HEK293/mock 細胞よりも高く、OATP1B1 を介した取り込みがあることが示唆された。したがって、d-HDA 取り込みへの PBD 等の阻害剤の影響が見えるようになったことを、HSA による非特異的吸着の防止のみでは十分に説明できない。他の考えられる要因としては、Miyachi らによって提唱されているアルブミンによる有機アニオン取り込み促進機構がある⁴⁶。アルブミンによる d-HDA 取り込み及び PBD 阻害への影響は、構造を

変えたアルブミンを用いた実験によって調べることで、HDA の分布特性の詳細な解明につなげる必要がある。

近年、Zhang らはヒトにおいても PBD 投与により内因性 HDA 血漿中濃度が上昇することを示した¹⁹。しかし、彼らの研究において、HDA 濃度の増加はフロセミドを PBD と共投与した場合にのみ、PBD と共投与しなかった時と比較することで認められており、一方で、PBD のみを投与した場合はベースラインと比較してほとんど差が認められなかった¹⁹。すなわち、フロセミドを投与した条件でのみ PBD による HDA 濃度の増加が認められている¹⁹。したがって、PBD のみでの OATP1Bs 阻害は、臨床研究の結果を十分に説明できないと考えられる。Zhang らの臨床研究において、循環血中における PBD 非結合型濃度は、本研究で得られた OATP1B1 阻害 IC₅₀ (25.8 μM, Fig. 10B, Table 4) に到達せず、これはフロセミドを共投与した場合でも同様であった¹⁹。著者らはフロセミド血漿中濃度が PBD 投与により上昇することを述べており、これにより、HDA の肝取り込み阻害が強く生じた可能性が考えられる。Stopfer らは、OATP1Bs 典型基質である RSV の AUC がフロセミドを投与した場合に上昇し、腎クリアランスは変動しないことを報告した^{47,48}。フロセミドは OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であることは報告されているが、OATP1Bs への阻害作用は明らかではない⁴⁹。したがって、フロセミドが HDA の体内動態に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要と考えられる。

近年、OATP1Bs 内因性基質は、新薬による薬物間相互作用の可能性を評価するためのバイオマーカーとして注目されている。さらに、ラット等の実験動物における体内動態解析は、新薬の研究開発において頻繁に行われているため、新薬投与により OATP1Bs 内因性基質がどのような体内挙動の変化を示すかという情報は重要である。したがって、今回得られた結果は、ラットにおいて OATP1Bs 内因性基質 HDA が Oatps を介した肝取り込み阻害作用を評価するバイオマーカーとして有用である可能性を示した。しかしながら、HDA 及び TDA を輸送することが知られている OAT3 の局在はヒトとラット間

で違いがあるため、注意する必要がある。げっ歯類において Oat3 は肝臓と腎臓の両方に発現するが^{50,51}、ヒトでは腎臓のみに発現する^{52,53}。本研究では、OAT3 の内因性基質である indoxyl sulfate の肝臓中分布を用いて評価した。 $K_{p,liver}$ は $K_{p,kidney}$ よりも著しく低値であり、また、PBD 投与による低下は認められなかった (Fig. 6B, C)。したがって、肝取り込みにおける OAT3 の関与は示されなかった。今後、ラット肝臓における詳細な Oat3 機能解析が必要と考えられる。近年、ヒト肝移植キメラマウスの代謝酵素及びトランスポーターの発現レベルの解析が進められており、ヒトと同程度の発現が一部認められている^{54,55}。ヒト肝移植キメラマウスを用いることで、よりヒトに近い環境で評価できる可能性がある。

結論として、本研究では、HDA がラットにおいて胆汁中排泄及び腎取り込みの影響をほとんど受けない、Oatps を介した肝取り込みの変動を評価するためのバイオマーカーになりえることを示した。HDA の血漿中濃度は OATP1Bs の強力な阻害剤である RIF、それよりも弱い阻害剤である PBD の両方で上昇した。したがって、ラットで HDA を用いて新薬の Oatps 阻害作用を評価することで、OATP1Bs を介した DDI リスク評価に役立つ可能性がある。しかしながら、OATP1Bs/Oatps バイオマーカーに関するヒト-実験動物間の橋渡し研究は不十分であり、実験動物を用いて OATP1Bs を介した DDI リスクを評価することに関する妥当性を解明していく必要がある。

引用文献

1. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: Their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 2013;34(1):45-78.
2. Maeda K. Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(2):155-168.
3. Patel M, Taskar KS, Zamek-Gliszczynski MJ. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *J Clin Pharmacol.* 2016;56 Suppl 7:S23-S39.
4. Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther.* 2006;112(1):71-105.
5. Lai Y, Mandlekar S, Shen H, et al. Coproporphyrins in plasma and urine can be appropriate clinical biomarkers to recapitulate drug-drug interactions mediated by organic anion transporting polypeptide inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;358(3):397-404.
6. Shen H, Chen W, Drexler DM, et al. Comparative evaluation of plasma bile acids, dehydroepiandrosterone sulfate, hexadecanedioate, and tetradecanedioate with coproporphyrins I and III as markers of OATP inhibition in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(8):908-919.
7. Takehara I, Terashima H, Nakayama T, et al. Investigation of Glycochenodeoxycholate Sulfate and Chenodeoxycholate Glucuronide as Surrogate Endogenous Probes for Drug Interaction Studies of OATP1B1 and OATP1B3 in Healthy Japanese Volunteers. *Pharm*

- Res.* 2017;34(8):1601-1614.
8. Takehara I, Yoshikado T, Ishigame K, et al. Comparative Study of the Dose-Dependence of OATP1B Inhibition by Rifampicin Using Probe Drugs and Endogenous Substrates in Healthy Volunteers. *Pharm Res.* 2018;35(7):138.
 9. Mori D, Kimoto E, Rago B, et al. Dose-Dependent Inhibition of OATP1B by Rifampicin in Healthy Volunteers: Comprehensive Evaluation of Candidate Biomarkers and OATP1B Probe Drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;107(4):1004-1013.
 10. Yee SW, Giacomini MM, Hsueh CH, et al. Metabolomic and Genome-wide Association Studies Reveal Potential Endogenous Biomarkers for OATP1B1. *Clin Pharmacol Ther.* 2016;100(5):524-536.
 11. Yee SW, Giacomini MM, Shen H, et al. Organic Anion Transporter Polypeptide 1B1 Polymorphism Modulates the Extent of Drug–Drug Interaction and Associated Biomarker Levels in Healthy Volunteers. *Clin Transl Sci.* 2019;12(4):388-399.
 12. Mori D, Kashihara Y, Yoshikado T, et al. Effect of OATP1B1 genotypes on plasma concentrations of endogenous OATP1B1 substrates and drugs, and their association in healthy volunteers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2019;34(1):78-86.
 13. Suzuki Y, Sasamoto Y, Koyama T, et al. Substantially Increased Plasma Coproporphyrin-I Concentrations Associated With OATP1B1*15 Allele in Japanese General Population. *Clin Transl Sci.* Published online 2020.
 14. Jones NS, Yoshida K, Salphati L, Kenny JR, Durk MR, Chinn LW. Complex DDI by Fenebrutinib and the Use of Transporter Endogenous Biomarkers to Elucidate the Mechanism of DDI. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;107(1):269-277.
 15. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clin J Am*

- Soc Nephrol.* 2015;10(11):2039-2049.
16. Li M, Anderson GD, Wang J. Drug-drug interactions involving membrane transporters in the human kidney. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(4):505-532.
 17. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(7):1229-1236.
 18. Izumi S, Nozaki Y, Komori T, et al. Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: Comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17 β -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(10):1859-1866.
 19. Zhang Y, Holenarsipur VK, Kandoussi H, et al. Detection of Weak Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B Inhibition by Probenecid with Plasma-Based Coproporphyrin in Humans. *Drug Metab Dispos.* 2020;48(10):841-848.
 20. Wiebe ST, Giessmann T, Hohl K, et al. Validation of a Drug Transporter Probe Cocktail Using the Prototypical Inhibitors Rifampin, Probenecid, Verapamil, and Cimetidine. *Clin Pharmacokinet.* Published online 2020.
 21. Shen H, Nelson DM, Oliveira R V., et al. Discovery and validation of pyridoxic acid and homovanillic acid as novel endogenous plasma biomarkers of organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 in Cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(2):178-188.
 22. Horikawa M, Kato Y, Sugiyama Y. Reduced gastrointestinal toxicity following inhibition of the biliary excretion of irinotecan and its metabolites by probenecid in rats. *Pharm Res.* 2002;19(9):1345-1353.
 23. Ellawatty WEA, Masuo Y, Fujita K, et al. Organic cation transporter 1 is responsible for hepatocellular uptake of the tyrosine kinase inhibitor pazopanib. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(1):33-40.

24. Maeda K, Sugiyama Y. The use of hepatocytes to investigate drug uptake transporters. *Methods Mol Biol.* 2010;640:327-353.
25. Ménochet K, Kenworthy KE, Houston JB, Galetin A. Simultaneous assessment of uptake and metabolism in rat hepatocytes: A comprehensive mechanistic model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;341(1):2-15.
26. Takeuchi K, Sugiura T, Umeda S, et al. Pharmacokinetics and hepatic uptake of eltrombopag, a novel platelet-increasing agent. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(6):1088-1096.
27. Taguchi T, Masuo Y, Kogi T, Nakamichi N, Kato Y. Characterization of Long-Lasting Oatp Inhibition by Typical Inhibitor Cyclosporine A and In Vitro–In Vivo Discrepancy in Its Drug Interaction Potential in Rats. *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2231-2239.
28. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn.* 1981;4(11):879-885.
29. Wikoff WR, Nagle MA, Kouznetsova VL, Tsigelny IF, Nigam SK. Untargeted metabolomics identifies enterobiome metabolites and putative uremic toxins as substrates of organic anion transporter 1 (Oat1). *J Proteome Res.* 2011;10(6):2842-2851.
30. Bush KT, Wu W, Lun C, Nigam SK. The drug transporter OAT3 (SLC22A8) and endogenous metabolite communication via the gut–liver– kidney axis. *J Biol Chem.* 2017;292(38):15789-15803.
31. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993;10(7):1093-1095.
32. Horikawa M, Kato Y, Tyson CA, Sugiyama Y. The Potential for an Interaction between MRP2 (ABCC2) and Various Therapeutic Agents: Probenecid as a Candidate Inhibitor of the Biliary Excretion of Irinotecan Metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet.*

- 2002;17(1):23-33.
33. Zhou D, Xu Y, Wang Y, Li J, Gui C, Zhang H. Interaction of Organic Anion Transporter 3-Mediated Uptake of Steviol Acyl Glucuronide, a Major Metabolite of Rebaudioside A, with Selected Drugs. *J Agric Food Chem.* 2020;68(6):1579-1587.
 34. Taniguchi T, Ashizawa N, Matsumoto K, et al. Pharmacological evaluation of dotinurad, a selective urate reabsorption inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;371(1):162-170.
 35. Nakakariya M, Shima Y, Shirasaka Y, Mitsuoka K, Nakanishi T, Tamai I. Organic anion transporter OAT1 is involved in renal handling of citrulline. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009;297(1).
 36. Deguchi T, Ohtsuki S, Otagiri M, et al. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int.* 2002;61(5):1760-1768.
 37. Livni E, Davis MA, Warner VD. Synthesis and Biologic Distribution of Mercapto Derivatives of Palmitic Acid. *J Med Chem.* 1979;22(5):580-583.
 38. Wada F, Usami M. Studies on fatty acid omega-oxidation. Antiketogenic effect and gluconeogenicity of dicarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1977;487(2):261-268.
 39. Bjorkhem I. On the quantitative importance of omega-oxidation of fatty acids. *J Lipid Res.* 1978;19(5):585-590.
 40. Palmer CNA, Richardson TH, Griffin KJ, et al. Characterization of a cDNA encoding a human kidney, cytochrome P-450 4A fatty acid ω -hydroxylase and the cognate enzyme expressed in *Escherichia coli*. *BBA - Gene Struct Expr.* 1993;1172(1-2):161-166.
 41. Ito O, Alonso-Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 1998;274(2):F395-404.
 42. Alexander JJ, Snyder A, Tonsgard JH. Omega-oxidation of monocarboxylic acids in rat brain. *Neurochem Res.* 1998;23(2):227-233.

43. Zhu D, Zhang C, Medhora M, Jacobs ER. CYP4A mRNA, protein, and product in rat lungs: Novel localization in vascular endothelium. *J Appl Physiol*. 2002;93(1):330-337.
44. Jin SJ, Tserng KY. Biogenesis of dicarboxylic acids in rat liver homogenate studied by ¹³C labeling. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1991;261(6):E719-724.
45. Suzuki H, Yamada J, Watanabe T, Suga T. Compartmentation of dicarboxylic acid β -oxidation in rat liver: importance of peroxisomes in the metabolism of dicarboxylic acids. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1989;990(1):25-30.
46. Miyauchi S, Masuda MM, Kim SJ, et al. The phenomenon of albumin-mediated hepatic uptake of organic anion transport polypeptide substrates: Prediction of the in vivo uptake clearance from the in vitro uptake by isolated hepatocytes using a facilitated-dissociation model. *Drug Metab Dispos*. 2018;46(3):259-267.
47. Stopfer P, Giessmann T, Hohl K, et al. Pharmacokinetic Evaluation of a Drug Transporter Cocktail Consisting of Digoxin, Furosemide, Metformin, and Rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;100(3):259-267.
48. Stopfer P, Giessmann T, Hohl K, et al. Effects of Metformin and Furosemide on Rosuvastatin Pharmacokinetics in Healthy Volunteers: Implications for Their Use as Probe Drugs in a Transporter Cocktail. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2018;43(1):69-80.
49. Ebner T, Ishiguro N, Taub ME. The Use of Transporter Probe Drug Cocktails for the Assessment of Transporter-Based Drug-Drug Interactions in a Clinical Setting - Proposal of a Four Component Transporter Cocktail. *J Pharm Sci*. 2015;104(9):3220-3228.
50. Kusuhara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, et al. Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13675-13680.

51. Buist SCN, Klaassen CD. Rat and mouse differences in gender-predominant expression of organic anion transporter (Oat1-3; Slc22a6-8) mRNA levels. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(6):620-625.
52. Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol.* 2001;59(5):1277-1286.
53. Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ. Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255(2):508-514.
54. Nishimura M, Yoshitsugu H, Yokoi T, et al. Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica.* 2005;35(9):877-890.
55. Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, et al. Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: Protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(6):1039-1043.

Table 1

Effects of coadministration of PBD (100 mg/kg) on pharmacokinetic parameters of endogenous OATPIBs substrates and RSV in rats with and without bile duct cannulation ^a

Parameters	without cannulation		with cannulation	
	Vehicle	PBD	Vehicle	PBD
HDA				
AUC _{0-2h} (ng × h/mL)	39.8 ± 24.4	156 ± 41 ^b	33.2 ± 3.7	96.1 ± 29.1 ^b
C _{liver,2h} (ng/g tissue)	142 ± 77	173 ± 37	179 ± 60	251 ± 82
V _{bile,1.5-2h} (ng/h)	-	-	ND	ND
ODA				
AUC _{0-2h} (ng × h/mL)	98.2 ± 44.2	184 ± 46 ^b	90.9 ± 27.2	145 ± 31 ^b
C _{liver,2h} (ng/g tissue)	81.9 ± 26.3	88.4 ± 22.3	71.6 ± 20.4	108 ± 77
V _{bile,1.5-2h} (ng/h)	-	-	ND	ND
TDA				
AUC _{0-2h} (ng × h/mL)	29.8 ± 11.9	116 ± 21 ^b	13.5 ± 4.4	32.8 ± 9.1 ^b
C _{liver,2h} (ng/g tissue)	41.5 ± 15.5	49.0 ± 17.0	33.2 ± 16.5	40.1 ± 15.3
V _{bile,1.5-2h} (ng/h)	-	-	ND	ND
CP-III				
AUC _{0-2h} (ng × h/mL)	0.658 ± 0.232	1.83 ± 0.59 ^b	1.22 ± 1.17	2.57 ± 2.26
C _{liver,2h} (ng/g tissue)	6.97 ± 0.99	7.36 ± 2.91	12.2 ± 5.0	9.17 ± 2.48
V _{bile,1.5-2h} (ng/h)	-	-	201 ± 166	274 ± 188
RSV				
AUC _{0-2h} (ng × h/mL)	29.2 ± 11.7	58.7 ± 29.6	37.4 ± 15.5	49.0 ± 27.8
C _{liver,2h} (ng/g tissue)	407 ± 55	492 ± 367	769 ± 644	367 ± 131
V _{bile,1.5-2h} (μg/h)	-	-	90.4 ± 47.9	76.1 ± 21.4

AUC_{0-2h} (ng×h/mL): Area under the plasma concentration-time profile over 2 h; C_{liver,2h}: Hepatic concentration at 2 h, V_{bile,1.5-2h}: bile efflux velocity from time 1.5 to 2 h; ND, not determined because biliary concentrations of HDA, ODA, and TDA were below the detection limit (< 0.42

nM)

^a Mean \pm SD (n = 5–6).

^b Significant difference compared to vehicle alone (P < 0.05)

Table 2

AUC_{0-2h} of endogenous OATP1Bs substrates after intravenous administration of PBD (100 mg/kg) in rats with renal ligation or sham operation ^a

Compounds	Sham + vehicle ^b	Renal ligation + vehicle	Renal ligation + PBD ^c
HDA	24.9 ± 7.8	28.2 ± 7.4	76.8 ± 24.5 ^{d,e}
ODA	46.5 ± 7.5	49.3 ± 15.0	92.7 ± 11.1 ^{d,e}
TDA	17.9 ± 8.4	21.2 ± 6.4	36.0 ± 14.1
CP-III	1.62 ± 0.65	2.03 ± 1.04	2.94 ± 1.39

^a AUC was calculated using a linear trapezoidal method and represented as mean ± SD (n = 4).

^b Vehicle alone was intravenously administered in sham-operated rats.

^c Vehicle alone or PBD was intravenously administered in kidney-ligated rats.

^d P < 0.01, significant difference compared to sham + vehicle group

^e P < 0.01, significant difference compared to the renal ligation + vehicle group.

Table 3

$CL_{\text{uptake,tissue}}$ values of d-HDA after intravenous co-administration of PBD or vehicle alone

	Vehicle ^a	PBD ^a
$CL_{\text{uptake,liver}}$ (mL/h/kg) ^b	340	66.0
$CL_{\text{uptake,kidney}}$ (mL/h/kg) ^b	20.8	13.3

^a PBD (100 mg/kg) or vehicle alone was intravenously administered and, 5 min later, d-HDA (1 mg/kg) was administered intravenously.

^b $CL_{\text{uptake,tissue}}$ (mL/h/kg) of d-HDA was calculated from the slope of the integration plot (Fig. 8) and converted to per kg values using the weight of the liver and kidney (40 and 8.0 g of tissue/kg body weight, respectively).³¹

Table 4

IC₅₀ values for inhibitory effects of PBD and CsA on OATP1B1-mediated uptake of each substrate

^a

Inhibitors	d-HDA		RSV	PTV
	HSA (-)	HSA (+)		
PBD	---	25.8 ± 11.3 μM	20.4 ± 18.0 μM	42.4 ± 2.29 μM
CsA	---	1.38 ± 1.15 μM	< 1 μM	< 1 μM

^a IC₅₀ values were estimated by non-linear least-squares regression analysis of the data shown in

Fig. 10 and expressed as mean ± calculated SD

Fig. 1

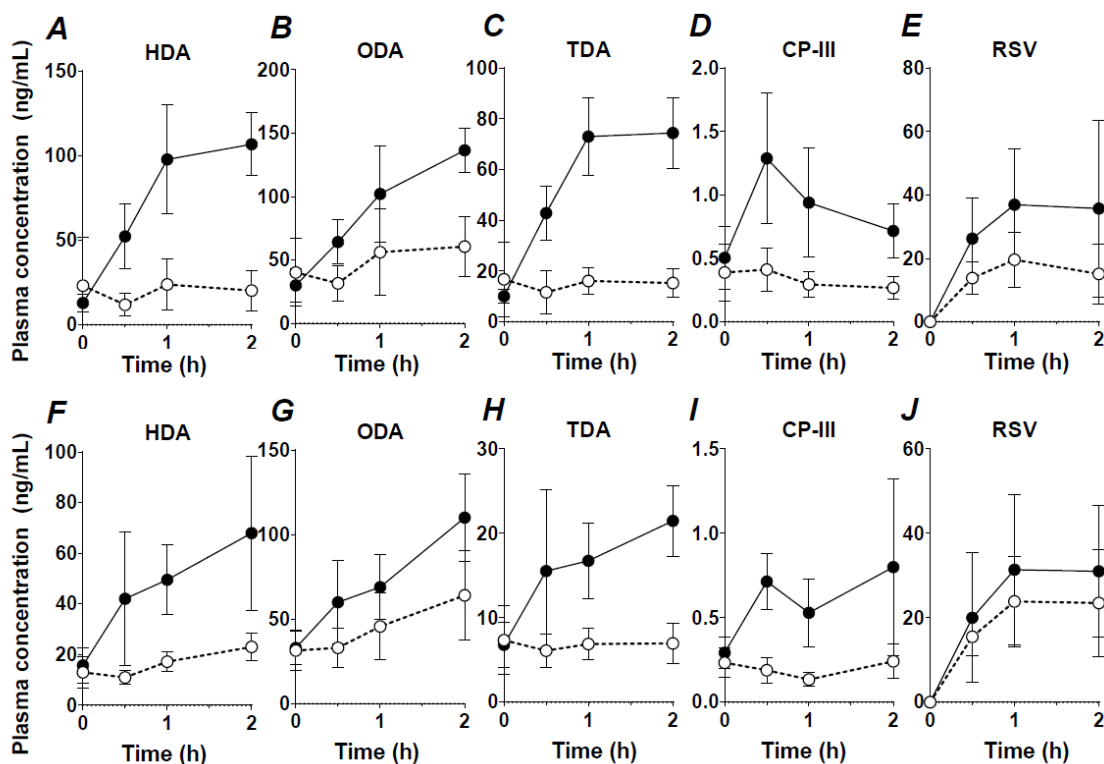


Figure 1. Effects of PBD on plasma concentration-time profiles of endogenous OATP1Bs substrates (A-D, F-I) and RSV (E, J) in rats

Five minutes after intravenous administration of PBD (100 mg/kg; closed circles) or vehicle alone (open circles), RSV (5 mg/kg) was administered orally. In some rats, the bile duct was cannulated 20 min before PBD administration (F-J). Plasma samples were collected at the designated times after RSV administration, and the concentration of each compound was measured by LC-MS/MS. Each value represents mean \pm SD (n = 5–6).

Fig. 2

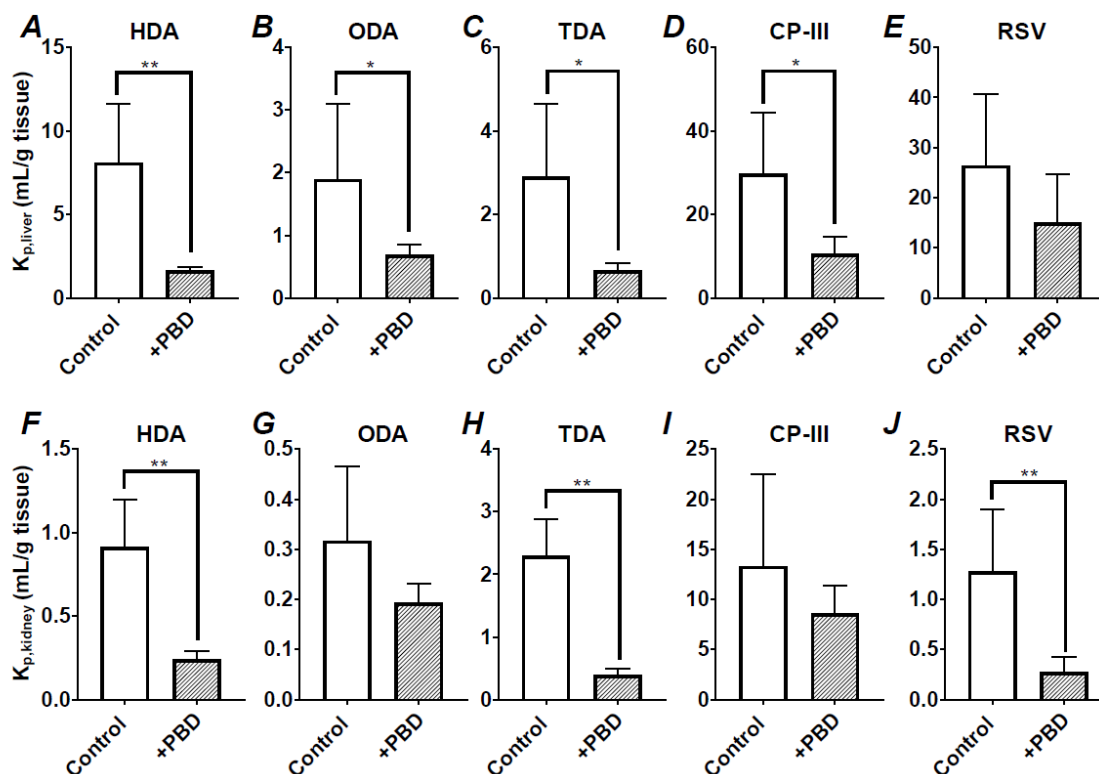


Figure 2. Effects of PBD on tissue-to-plasma concentration ratios of endogenous OATP1Bs substrates (A-D, F-I) and RSV (E, J) in rats

Five minutes after intravenous administration of PBD (100 mg/kg; closed bars) or vehicle alone (open bars), RSV (5 mg/kg) was orally administered to rats without bile duct cannulation. Liver and kidney samples were collected 2 h after RSV administration, and the concentration of each compound was measured by LC-MS/MS and normalized to plasma levels to obtain liver-to-plasma and kidney-to-plasma concentration ratios ($K_{p,liver}$ and $K_{p,kidney}$, respectively). Each value represents mean \pm SD ($n = 5-6$). * Significantly different from vehicle-treated rats ($P < 0.05$).

Fig. 3

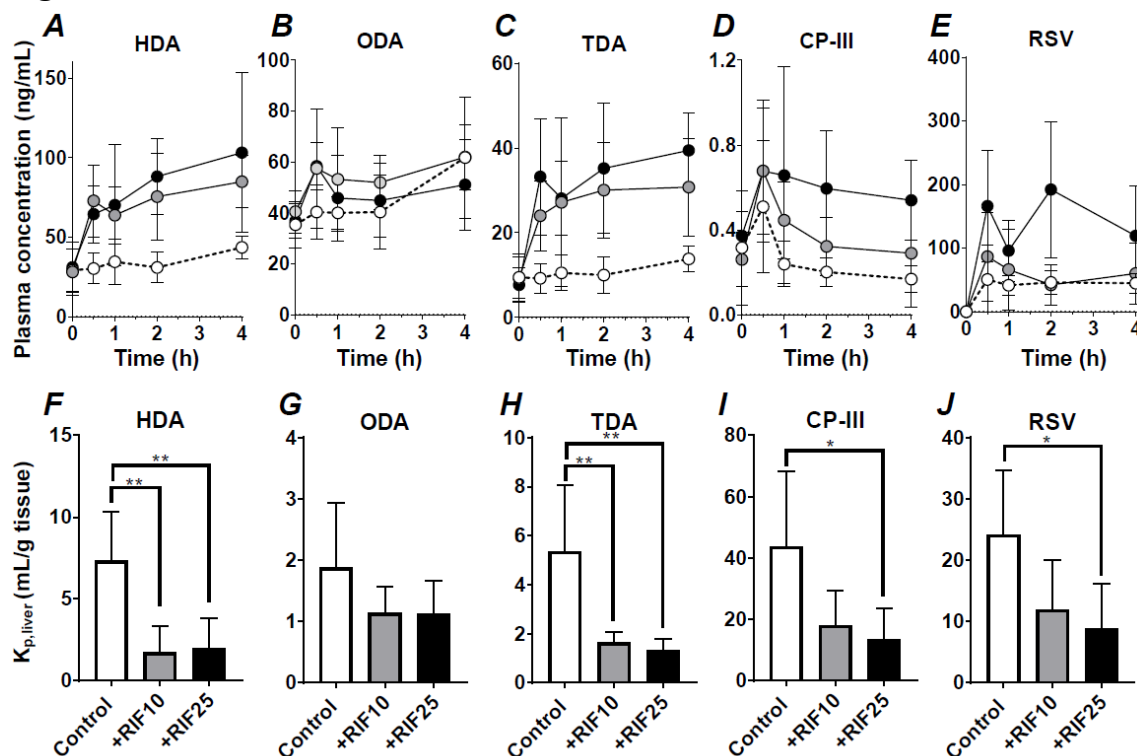


Figure 3. Effects of RIF on plasma concentration-time profiles and liver-to-plasma concentration ratios ($K_{p,liver}$) of endogenous OATP1Bs substrates and RSV in rats

Five minutes after intravenous administration of RIF (10 and 25 mg/kg) or vehicle alone, RSV (5 mg/kg) was orally administered to rats without bile duct cannulation. Plasma samples were collected at the designated times, and liver and kidney samples were collected 4 h after RSV administration. Open, gray, and closed circles represent mean values of plasma concentration in vehicle-, RIF (10 mg/kg)-, and RIF (25 mg/kg)-treated rats, respectively (A-E). The $K_{p,liver}$ values of each compound are shown in panels F-J. Each value represents mean \pm SD ($n = 5-6$). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Fig. 4

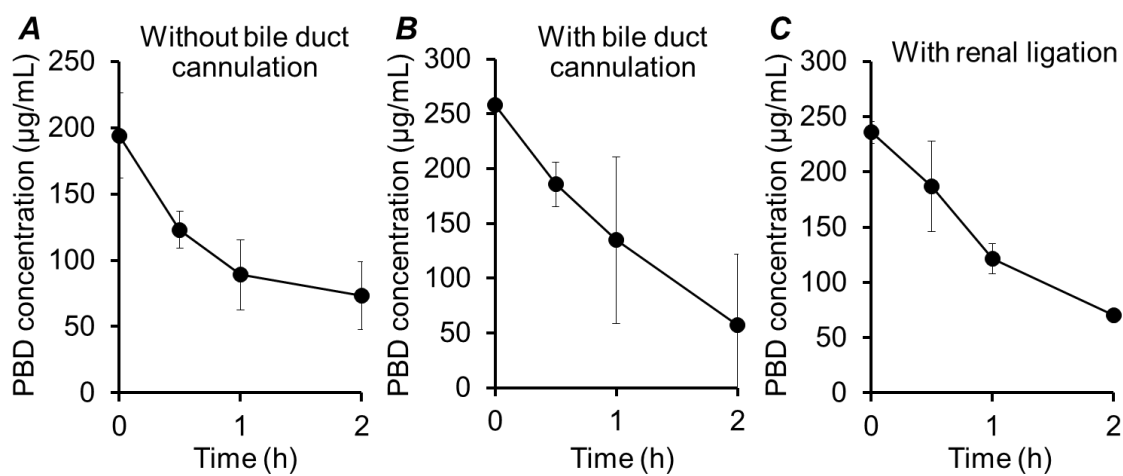


Figure 4. Plasma concentration-time profiles of PBD

PBD (100 mg/kg) was intravenously administered to rats without (A) and with (B) bile duct cannulation, and in rats with renal ligation (C). Five minutes later, RSV (5 mg/kg) was orally administered. Plasma samples were collected at the designated times after RSV administration, and concentrations of PBD are shown. Each value represents mean \pm SD (n = 4–6).

Fig. 5

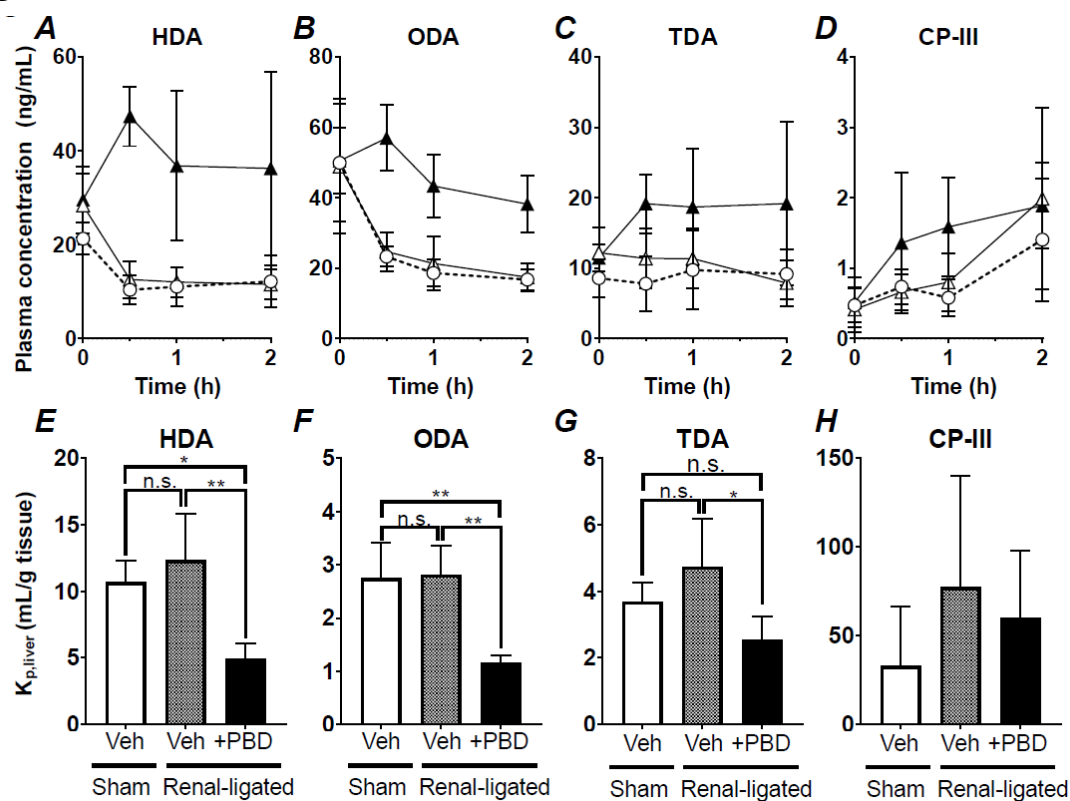


Figure 5. Effects of PBD on plasma concentrations and $K_{p,liver}$ of endogenous OATP1Bs substrates in rats with renal ligation

After sham (open circles) or renal ligation operations (open and closed triangles), PBD (100 mg/kg; closed triangles), or vehicle alone (open circles and open triangles) were intravenously administered, and plasma concentration-time profiles of endogenous OATP1Bs substrates were measured (A-D). Liver samples were collected 2 h after PBD administration to obtain $K_{p,liver}$ values (E-H). Each value represents the mean \pm SD ($n = 4$). *, Significantly different ($P < 0.05$); **, Significantly different ($P < 0.01$); n.s., Not significantly different.

Fig. 6

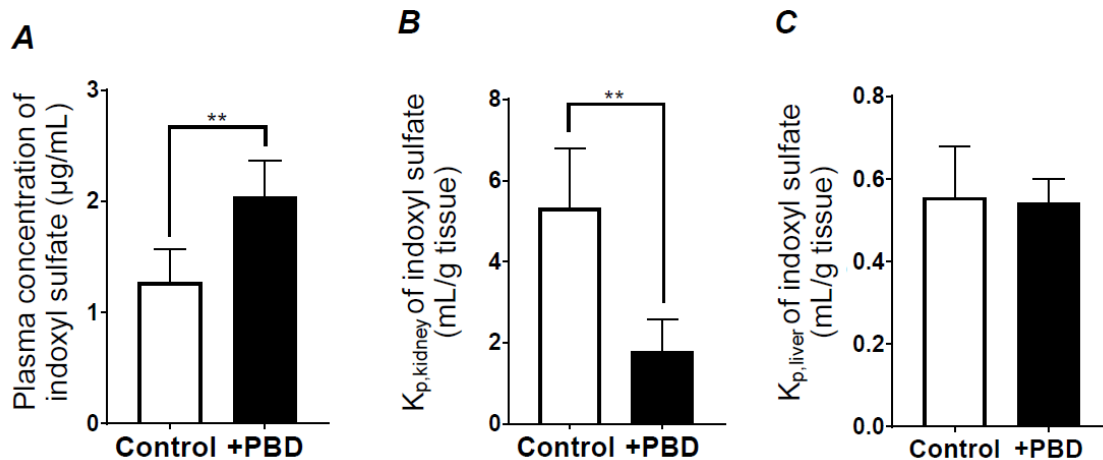


Figure 6. Effect of intravenous administration of PBD on plasma concentration (A) and tissue-to-plasma concentration ratios in kidney ($K_{p, \text{kidney}}$, B) and liver ($K_{p, \text{liver}}$, C) of indoxyl sulfate in rats

At 5 min after intravenous administration of PBD (100 mg/kg) or vehicle alone, RSV (5 mg/kg) was orally administered to rats without bile duct cannulation. Plasma, kidney, and liver concentrations of indoxyl sulfate were measured 2 h after RSV administration. Each value represents mean \pm SD ($n = 5-6$). **, $P < 0.01$

Fig. 7

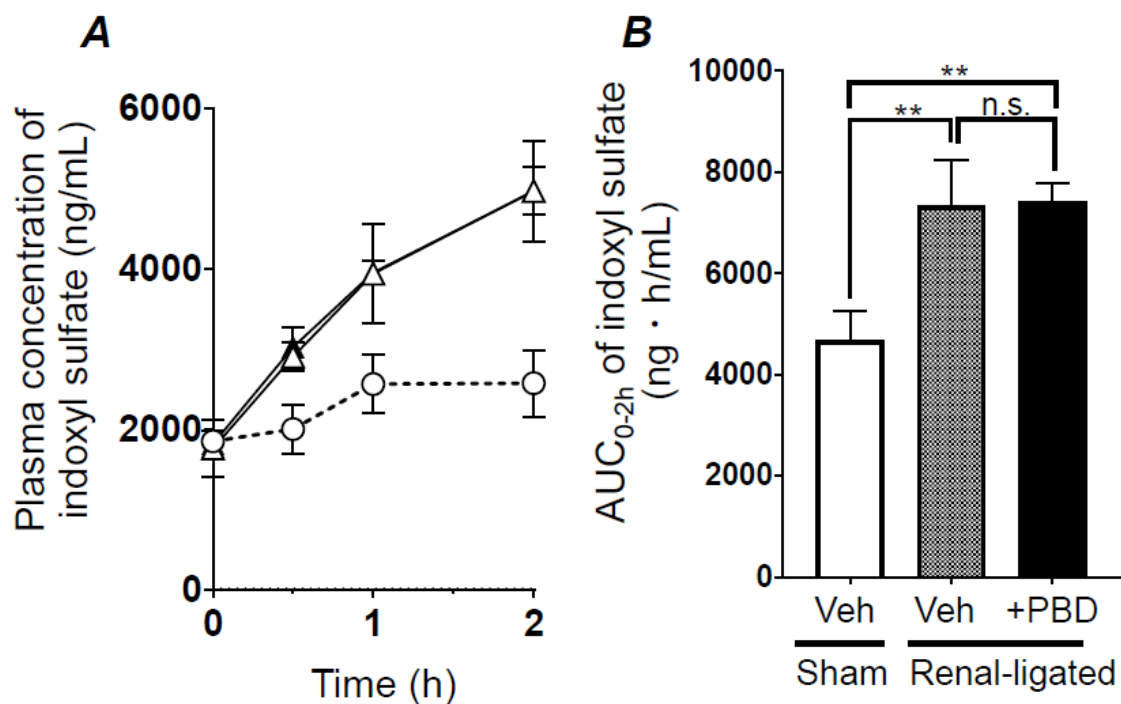


Figure 7. Effects of PBD on plasma concentration profiles of indoxyl sulfate in rats with renal ligation

After sham operation (open circles) and renal ligation (open and closed triangles), PBD (100 mg/kg; closed triangles), or vehicle alone (open circles and open triangles) were intravenously administered. Plasma concentrations of indoxyl sulfate were measured at the designated times after PBD administration (A). AUC_{0-2h} values of indoxyl sulfate levels in plasma were calculated using a linear trapezoidal method and are shown in panel (B). Each value represents the mean \pm SD (n = 4). **, P < 0.01; n.s., Not significantly different.

Fig. 8

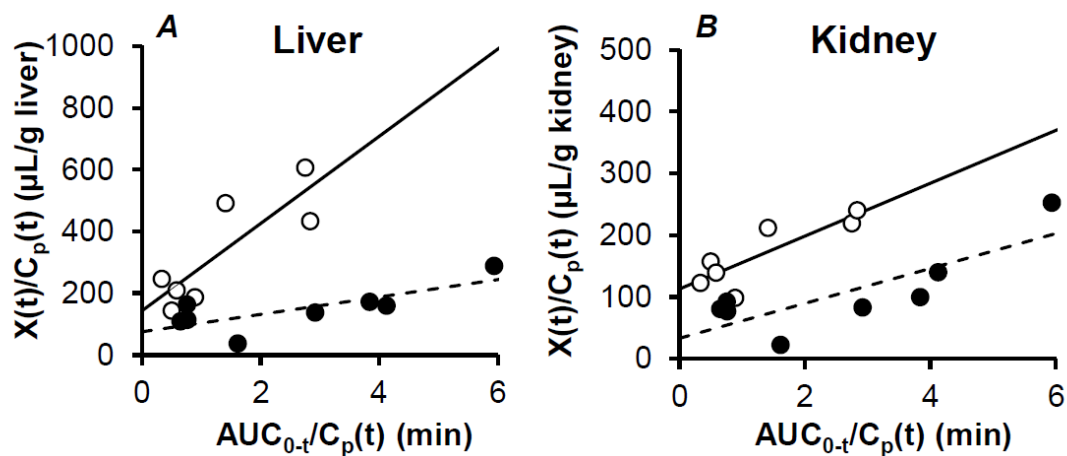


Figure. 8 Effects of PBD in initial phase of hepatic and renal d-HDA uptake

At 5 min after intravenous administration of PBD (100 mg/kg; closed circles) or vehicle alone (open circles), d-HDA (1 mg/kg) was intravenously administered, and the time profile of plasma concentrations of d-HDA ($C_p(t)$) was determined at 1 and 5 min. At these time points, tissue concentrations of d-HDA ($X(t)$) were also measured. Data are expressed as plots of $AUC_{0-t}/C_p(t)$ vs $X(t)/C_p(t)$ for liver (A) and kidney (B). $CL_{\text{uptake,tissue}}$ was obtained from the slopes of the regression lines based on Eq. 2. Each point represents data for individual rats.

Fig. 9

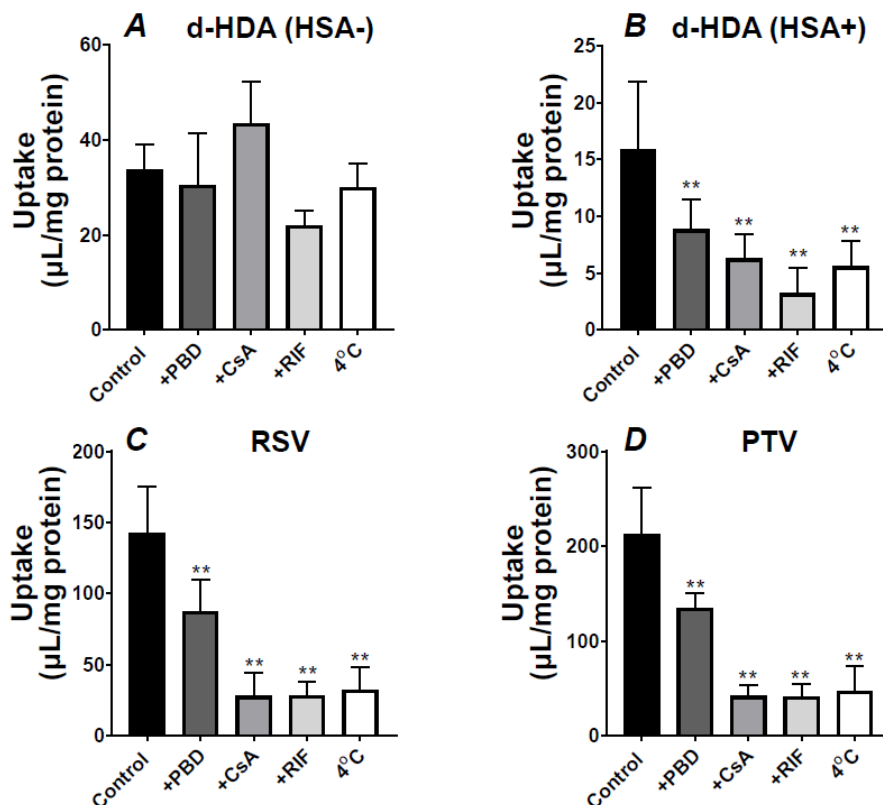


Figure 9. Effects of transporter inhibitors on d-HDA uptake in isolated rat hepatocytes

Isolated rat hepatocytes were incubated with d-HDA (10 µM; A, B) for 30 min, and RSV (1 µM; C) and PTV (1 µM; D) for 2 min at 37°C in the absence (control) and presence of PBD (100 µM), CsA (100 µM), or RIF (100 µM). The incubation buffer also contained HSA (B), or not (A, C, D). Each value represents the mean ± SD (n = 6). * Significantly different from vehicle control group at 37°C (P < 0.05).

Fig. 10

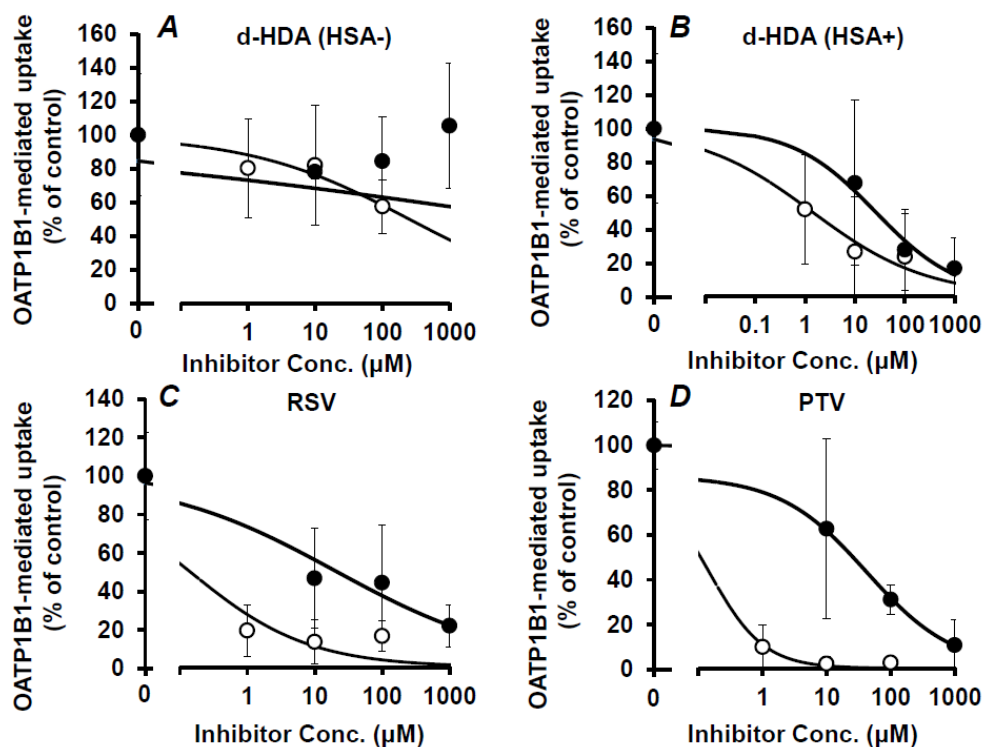


Figure 10. Concentration-dependent inhibition by PBD and CsA of OATP1B1-mediated uptake of d-HDA, RSV, and PTV

HEK293/OATP1B1 and HEK293/mock cells were incubated with d-HDA (10 μM; A, B) for 10 min, and RSV (1 μM; C) and PTV (1 μM; D) for 2 min at 37°C in the presence of various concentrations of PBD (open circles) or CsA (closed circles). The incubation buffer also contained HSA (B), or not (A, C, D). The thick and dashed lines represent the fitted lines for inhibition by PBD and CsA, respectively, which were obtained by non-linear least-squares regression analysis based on Eq. 1. Each point represents the mean ± SD (n = 6–9).

謝辞

本研究に関して、種々の有益な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研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 加藤 将夫 教授に厚く感謝の意を表します。

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研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 増尾 友佑 助教に謹んで謝意を表します。

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研究域（薬学系）分子薬物治療学研究室 石本 尚大 助教に深く感謝の意を表します。

また、本研究に関して、ご指導を頂きました金沢大学医薬保健研究域（薬学系）荒川 大 助教に感謝致します。

日々の研究生活において、有益な討論を行って頂きました分子薬物治療学研究室の諸氏に感謝致します。さらに、研究を滞りなく遂行できるよう御協力頂いた石田 利佳 技術員に感謝致します。

そして、本研究に関わる実験の遂行のために用いた数多くの動物たちに深く感謝するとともに、御冥福をお祈り致します。

最後に、有意義な学生生活を送る上で経済的、精神的に支えて戴いた両親に深く感謝致します。

参考文献

主論文

Futatsugi A, Masuo Y, and Kato Y. Effects of Probenecid on Hepatic and Renal Disposition of Hexadecanedioate, an Endogenous Substrate of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B in Rats. *Journal of Pharmaceutical Science*, in press

副論文

Futatsugi A, Masuo Y, Kawabata S, Nakamichi N, and Kato Y. L503F variant of carnitine/organic cation transporter 1 efficiently transports metformin and other biguanides. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(9): 1160-1169, 2016, September

Futatsugi A, Toshimoto K, Yoshikado T, Sugiyama Y, and Kato Y. Evaluation of alteration in hepatic and intestinal BCRP function in vivo due to ABCG2 c.421C>A polymorphism based on PBPK analysis of rosuvastatin. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(5): 749-757, 2018, May

Taguchi T, Masuo Y, **Futatsugi A**, and Kato Y. Static model-based assessment of OATP1B1-mediated drug interactions with preincubation-dependent inhibitors based on inactivation and recovery kinetics. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(9):750-758, 2020, September