





学位論文審査結果報告書

報告番号	北里大 乙 第 1703 号	氏 名	齋藤 麻美
論文審査担当者	(主査) 教授 田中 信忠 (副査) 教授 中原 努 (副査) 教授 成川 衛 (副査) 教授 前田 和哉	   	
<p>[論文題目] 「Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) に起因する薬物間相互作用リスクの in vitro 評価法に関する妥当性評価」</p> <p>[論文審査結果の要旨] 薬物療法の安全性・有効性を確保するため、薬物間相互作用を理解し、適切な投与管理を行うことの重要性は言うまでもない。中でも薬物動態学的な薬物間相互作用は、薬物の体内動態を支配する要因となる分子（代謝酵素・トランスポーター等）の機能が、併用薬によって変化することにより、被相互作用薬の血中動態が変動し、薬効・副作用に影響が生じるものである。代謝酵素・トランスポーター等一連の異物解毒系分子は、一般に基質認識性が薬効群を超えて広範であることから、しばしば予期せぬ医薬品同士の相互作用が引き起こされる。それ故、新規医薬品の開発過程においては、現行のレギュラトリーガイドラインに基づき、新薬が相互作用薬となるリスク、被相互作用薬となるリスクの両方を in vitro 試験により評価し、ヒト臨床相互作用試験の必要性を判断する必要に迫られている。従って、相互作用評価に用いられる in vitro 試験のデータの信頼性の担保が求められる。</p> <p>腎臓は薬物排泄の主要な器官の一つであるが、医薬品の尿細管分泌は、様々な薬物トランスポーター群によって制御されている。Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) は、ナトリウムイオンもしくはプロトンの濃度勾配を利用して医薬品を含む様々な異物を細胞外へ排出する。ヒト MATE1 (hMATE1) は主に有機カチオンを輸送するが、抗生物質（セファレキシンなど）の両性イオンやエストロン3 硫酸といったアニオン化合物など広範な薬物を基質として認識し、基質薬物を腎尿細管上皮細胞内から尿細管側へ分泌する過程を担っている。</p> <p>hMATE1 の in vitro 機能評価には、HEK293 細胞、CHO 細胞、MDCK 細胞など種々の不死化細胞株に hMATE1 遺伝子を発現させた強制発現系や膜ベシクルを用いることができる。中でも、細胞内外の逆向きのプロトン勾配を薬物処理等により人工的に作り出し、基質の細胞内への取り込みを観察することで hMATE1 の輸送機能を評価する方法が簡便であり、一般的にも繁用されているが、生理学的な hMATE1 の輸送方向である細胞内から外への排出輸送</p>			

とは逆向きの輸送を評価していることに懸念があった。そこで本研究では、hMATE1 を介した薬物間相互作用リスクを *in vitro* 細胞取り込み試験で評価することの妥当性を調べるべく、①薬物の hMATE1 阻害剤としての阻害強度の評価②薬物のマウス Mate1 (mMate1) に対する基質性の評価、の2つの側面から検証した。

① 薬物の hMATE1 阻害剤としての阻害強度の評価における輸送方向の影響

新規開発化合物が hMATE1 を阻害する場合、併用される hMATE1 基質薬物の腎クリアランスの減少を引き起こす可能性がある。本研究では、hMATE1 の阻害強度評価のための新たな手法として、本来の輸送方向である排泄方向の輸送に対する hMATE1 阻害剤の阻害定数 (IC₅₀) 算出法を開発した。その手法を用いて 12 種類の既知の MATE 阻害剤について IC₅₀ 値が、取り込み (uptake) 方向と排泄 (efflux) 方向の基質輸送に対する評価で異なるか否かについて検討した。HEK293 細胞に hMATE1 を強制発現させ、NH₄Cl 添加のタイミングを変化させることで細胞内外のプロトン勾配を人工的に操作し、hMATE1 の典型基質 MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) またはメトホルミンの輸送方向をコントロールした。Efflux 阻害試験では、基質を細胞内にプレロードしたのち、efflux 開始前後の細胞内基質の残存量から排泄クリアランスを算出した。阻害剤は uptake 阻害試験と同じイオン型・非結合型存在条件になるよう細胞外へのみ添加し、IC₅₀ 値を uptake 方向と efflux 方向で比較したところ、MPP⁺ を基質とした場合、8 つの阻害剤について両方向の輸送試験間で IC₅₀ 値の差は 4 倍以内であり、メトホルミンを基質とした場合、すべての阻害剤について IC₅₀ 値の差は 4 倍以内であった。MPP⁺ で排泄方向の IC₅₀ 値が大きくなる傾向を示す理由として、実施可能な最小の efflux 時間 (0.25 分) のインキュベーション中においても阻害剤が細胞内へ取り込まれ、MPP⁺ の細胞内結合やリソソームトラッピングを阻害している可能性が考えられた。次に、規制当局が薬物間相互作用ガイドラインで推奨する血漿中最大非結合形濃度と IC₅₀ 値の比 (C_{max,u}/IC₅₀) を用いて、臨床でのメトホルミンの血中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) 上昇率と臨床薬物間相互作用の可能性が示唆されるとレギュラトリーガイドラインに記載のある C_{max,u}/IC₅₀ 値のカットオフ値 (0.02) との関連について検証したところ、メトホルミンを基質にした場合、*in vitro* 試験で評価する輸送方向によって、薬物相互作用の有無の判断が異なる阻害剤は存在しなかった。以上の結果から、創薬過程においては患者に対するリスクを軽減するため保守的な判断が好まれる観点も考慮すると、メトホルミンを基質として用いる取り込み方向での阻害試験が、新規開発化合物の hMATE1 阻害剤としての IC₅₀ 値を決定するために最良の実験条件であると考えられた。

② 薬物のマウス Mate1 (mMate1) に対する基質性の評価における輸送方向の影響

新規開発化合物が hMATE1 基質である場合、併用される hMATE1 阻害剤によって腎臓からの薬物消失が遅延する可能性がある。本研究では、9 種類のカチオン性化合物を用い、hMATE1 のマウスオルソログである mMate1 を強制発現させた HEK293 細胞への uptake 試験と、mMate1 ノックアウトマウスにおける血漿中濃度、尿排泄率、腎臓内濃度を野生型マウスにおける値と比較検討した。Uptake 方向の *in vitro* 輸送実験による基質判定は、mMate1 発現細胞とコントロール細胞への取り込みとの比 (uptake ratio) > 2 を基準とし、efflux 方向の輸送

実験による基質判定は、腎臓内濃度基準の腎クリアランス ($CL_{R, \text{kidney}}$) の mMate1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの有意な変化の有無を基準とした。その結果、uptake 方向での基質判定と efflux 方向での基質判定には一貫性が見られ、in vitro uptake 試験で mMate1 の基質と判定された 6 つの化合物すべてにおいて、in vivo マウスでの腎排泄に mMate1 の関与が示された。次に、in vitro の uptake クリアランスと in vivo の腎クリアランスの定量的関係を調べたところ、uptake ratio と $CL_{R, \text{kidney}}$ のノックアウトマウスと野生型マウスの比の解析においてのみ統計的に有意な相関がみられた。この良好な相関は、mMate1 の基質認識が、基質の輸送方向に関わらず同一であることを示唆しており、uptake ratio は、mMate1 の腎排泄における重要性を示唆する有望な in vitro 指標であると考えられた。さらに、mMate1 と 78% のアミノ酸配列相同性を示す hMATE1 との間では uptake ratio の良好な相関関係が確認され、新規開発化合物の腎排泄に hMATE1 が果たす役割を評価するために、hMATE1 発現細胞における薬物の uptake ratio が有用な指標となり得ることを示唆するものである。

以上、本研究では、新規開発化合物における hMATE1 を介した薬物間相互作用のリスク評価に、hMATE1 発現系による uptake 試験を用いることの妥当性を検証した。その結果、輸送の方向性によらず、阻害剤としての IC_{50} 値は同等であること、また基質認識性も一致することを明らかとした。これらの結果は、腎臓での mMate1 および hMATE1 の機能と in vitro 評価指標の関連性を理解するための重要な一歩であり、薬物動態特性に優れた新規医薬品候補化合物の選択を効率的に実施することを可能とするものである。

よって、齋藤氏による一連の研究は、創薬過程における in vitro 試験による hMATE1 を介した薬物間相互作用のリスク評価に新たな視点を与えるものであり、創薬の加速化の一助となると認められる。研究の視点の独自性および実用性の高さの観点から、博士 (薬学) の学位に十分値するものと判断し、学位審査を合格と判定した。