

# 学位論文内容要旨

氏名： 齋藤 麻美

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

要旨：

薬物間相互作用とは、ある薬物の効果/副作用が、同時期に併用される別の薬物によって増強/減弱する現象である。特に、薬物の血中・組織中濃度の変動が起きる薬物動態学的相互作用は、代謝酵素やトランスポーター等薬物動態の制御に関わる分子の基質認識性が薬効群を超えて極めて広範であることから、多様な薬物の組み合わせによる相互作用が臨床上見られると共に、薬物の薬理学的特性から相互作用リスクを予見しづらい特徴がある。従って、薬物療法の有効性・安全性を確保するためには、薬物間相互作用の分子機序を理解した上で、定量的な相互作用リスクを予測し、臨床における適切な処方設計を立案することが求められる。

腎臓は、肝臓と並び薬物排泄を担う主要な器官の一つである。腎臓を介した薬物のクリアランスは、糸球体濾過に加え、尿細管上皮細胞に発現する多様なトランスポーターを介した能動的な分泌や再吸収によって決定される。糸球体濾過は、血漿タンパク質に非結合形の薬物のみが尿へと排泄する。一方、尿細管上皮細胞では、OAT (organic anion transporter; 有機アニオントランスポーター), OCT (organic cation transporter; 有機カチオントランスポーター), MATE (multidrug and toxin extrusion; 多剤排出トランスポーター) ファミリーに属する複数種のトランスポーターが、血管側から基質薬物を取り込み、尿細管側へ分泌する役割を果たしている。これら腎トランスポーター群の輸送能が、遺伝的素因や併用薬物の影響により低下する時、基質薬物の尿排泄が低下、血中濃度が上昇し、副作用の発現リスクが増加する臨床事例が知られている。従って、薬物間相互作用における腎トランスポーターの役割を理解することは、薬物療法の最適化や副作用の回避に不可欠である。それ故、現在製薬会社では、薬物相互作用に関するレギュラトリーガイドラインに従い、全ての開発化合物について、薬物動態学的相互作用の可能性を機序別に定量的に評価し、医薬品添付文章等で適切に医療関係者に情報提供しなければならないとされている。

MATE ファミリートランスポーターは、 $\text{Na}^+$ や $\text{H}^+$ の細胞内外の濃度勾配を利用して様々な基質化合物を細胞内から細胞外へと排出する。ヒトでは、hMATE1 (SLC47A1)が 2005 年に同定され、肝臓の胆管側膜と腎臓の近位尿細管上皮細胞の頂端膜側に局在し、 $\text{H}^+$ との対向輸送で様々な基質化合物を輸送することが知られている。hMATE1 は、主に有機カチオン類を輸送するが、他にもセフェム系抗生物質 (cefalexin 等) のような両性イオンや、estrone-3-sulfate といったアニオン性化合物などを幅広く認識する。臨床では、hMATE1 が糖尿病治療薬 metformin

やプラチナ系抗がん剤 **cisplatin** 等の尿細管分泌に関与し、その機能変動が副作用発現を変動させる可能性が報告されている。**hMATE1** の *in vitro* 機能評価には、HEK293 細胞、CHO 細胞、MDCK 細胞等不死化細胞株に **hMATE1** 遺伝子を発現させた強制発現系や細胞膜ベシクルが用いられてきた。**hMATE1** による基質の排出輸送を観察するには、基質をまず細胞内に **preload** する必要があり、実験技術的に困難な点が課題である。一方で、**hMATE1** による輸送は、輸送駆動力の勾配の向きに対応して双方向性を示すことから、生理的条件とは逆向きの  $H^+$  勾配（細胞外<細胞内）を人工的に作り出し、基質の細胞内への取り込みを観察する実験系も報告されている。本実験系は細胞外に基質を加えるのみで簡便であり、スクリーニングに適していると考えられる。実際、レギュラトリーガイドラインにも、**hMATE1** を介した相互作用リスクの評価において、細胞取り込み試験系の活用が例示されている。しかしながら、生理的な **hMATE1** の排出輸送とは逆向きの輸送方向で評価した基質の輸送能力や阻害強度が、生理的な **hMATE1** の排出輸送機能を反映しているかについては、これまで系統的な妥当性の評価がされてこなかった。

そこで、本研究では **hMATE1** を介した薬物間相互作用リスクを細胞取り込み試験として評価することの妥当性を、①阻害薬のトランスポーター阻害強度、②基質認識性および輸送能力の 2 つの側面から複数の化合物を用いて検証を実施した。

## 1. ヒト **hMATE1** 試験系の輸送方向の相違が阻害薬の阻害強度評価に与える影響に関する検討

新規開発化合物が **hMATE1** を阻害する場合、併用投与された **hMATE1** 基質薬物の腎クリアランス低下を引き起こす可能性がある。そこで本研究では、**hMATE1** の阻害薬の阻害強度を定量的に評価するための手法として、新たに排泄方向の基質輸送に対する **hMATE1** 阻害薬の阻害定数( $IC_{50}$ )の算出法を開発すると共に、その手法を用いて 12 種類の既知の **hMATE1** 阻害薬の  $IC_{50}$  値が、取り込み方向と排出方向で異なるかについて検討した。

**hMATE1** を強制発現させた HEK293 細胞に、 $NH_4Cl$  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** の典型的基質 **MPP<sup>+</sup>**(1-methyl-4-phenylpyridinium)および **metformin** の輸送方向をコントロールした。排出阻害試験では、基質を細胞内に **preload** したのち、排出実験開始前後の細胞内基質の残存量から排出クリアランスを算出した。阻害薬は、取り込み阻害試験時とイオン型・タンパク非結合形の存在割合が同一になるよう細胞外へ添加し、 $IC_{50}$  値を取り込み方向と排出方向の輸送に対する値で比較したところ、**MPP<sup>+</sup>**を基質とした場合、8 種の阻害薬について両実験間で  $IC_{50}$  値の差が 4 倍以内だったが、**metformin** を基質とした場合、すべての阻害薬について両実験間で  $IC_{50}$  値の差が 4 倍以内であった。**MPP<sup>+</sup>**で排泄方向の  $IC_{50}$  値が大きくなる理由として、排出実験開始後極めて短時間(0.25 分間)においても、阻害薬が細胞内へ速やかに取り込まれていることから、阻害薬が **hMATE1** を介した **MPP<sup>+</sup>**の排出輸送ではなく、**MPP<sup>+</sup>**の細胞内結合や lysosomal trapping 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中で hMATE1 の阻害強度を推定する方法として推奨する血漿中タンパク非結合形濃度の最大値と IC<sub>50</sub> 値の比 (C<sub>max,u</sub>/IC<sub>50</sub>) を指標として用い、臨床での metformin の血中 AUC (薬物濃度-時間曲線下面積) 上昇率と、AUC 上昇率が 1.25 倍以上を「薬物間相互作用あり」と考えた時の C<sub>max,u</sub>/IC<sub>50</sub> のカットオフ値 0.02 に対する大小関係について検証した。その結果、metformin を基質にした場合、取り込み阻害実験と排出阻害実験による評価の間で、相互作用のリスク判断が基質の輸送方向性によって変化する阻害薬は存在しなかった。

以上の結果から、創薬上患者に対する相互作用リスクを軽減するため保守的な判断が好まれる点も考慮すると、metformin の細胞取り込みに対する阻害試験が、新規開発化合物の hMATE1 阻害の IC<sub>50</sub> 値を決定するための最良の実験条件であると考えられた。

## 2. マウス mMate1 試験系の輸送方向の相違が基質認識性の評価に与える影響に関する検討

新規開発化合物が hMATE1 基質である場合、併用投与された hMATE1 阻害薬によって基質薬の消失が遅延し、薬効が変化したり、副作用を引き起こしたりする可能性がある。本研究では、9 種類のカチオン性化合物を用い、ヒト hMATE1 のマウスオルソログである mMate1 を強制発現させた HEK293 細胞への取り込み活性と mMate1 ノックアウトマウスでの血漿中濃度、尿中未変化体排泄率、腎臓内濃度を野生型マウスでの結果と比較して評価した。

取り込み方向の輸送に基づく基質判定は、mMate1 発現細胞と対照細胞への取り込み量との比 (uptake ratio) が 2 以上を基準とし、排泄方向の輸送に基づく基質判定は、腎臓内濃度基準の腎クリアランス (CL<sub>R,kidney</sub>) の mMate1 ノックアウトマウスと野生型マウス間の有意な変化の有無とした。その結果、取り込み方向の基質判定と排泄方向の基質判定の間には一貫性が見られ、*in vitro* 取り込み試験で mMate1 基質と判定された 6 種の化合物すべてにおいて、*in vivo* 実験で腎排泄に mMate1 の関与が示された。

次に、*in vitro* 取り込みクリアランスと *in vivo* 腎クリアランスの定量的関係を考察したところ、uptake ratio と CL<sub>R,kidney</sub> のノックアウトマウスと野生型マウスの比の関連においてのみ統計的に有意な相関がみられた (R<sup>2</sup>=0.637, p=0.00737)。一方で、ヒト臨床試験で測定可能な血漿中濃度基準の腎クリアランス (CL<sub>R,plasma</sub>) との間には有意な相関を認めなかった理由としては、CL<sub>R,plasma</sub> が mMate1 が関与しうる近位尿細管細胞の頂端側膜を介する排出のみならず、側底膜側の取り込み・排出の各固有クリアランスの複合パラメータとして構成されていることが挙げられる。そのため、近位尿細管細胞への基質薬物の取り込み過程が腎クリアランス全体の律速段階でない等限られた条件下でのみ、CL<sub>R,plasma</sub> の変動が mMate1 の排出固有クリアランスの変動と直結することが原因と考えられた。Uptake ratio と CL<sub>R,kidney</sub> が良好な相関を示したことは、mMate1 の基質認識性が、観察する輸送方向性に関わらず同一であることを示唆するものであり、*in vitro*

取り込み試験から得られた uptake ratio は、mMate1 の腎クリアランスにおける重要性を示唆する有望な指標となりうると考えられた。

さらに、mMate1 と 78% のアミノ酸配列相同性を示す hMATE1 との間で uptake ratio の良好な相関がみられた。この相関は、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、ヒト hMATE1 の uptake ratio が有用な指標となり得ることを示唆している。

以上、本研究では、新規開発化合物について hMATE1 に起因する薬物間相互作用のリスク評価に、取り込み試験を用いることの妥当性を検証した。その結果、観察する輸送の方向性によらず、阻害薬の IC<sub>50</sub> 値は同等であること、また基質認識性および輸送能力が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* 評価指標の関連性に重要な示唆を与えるものであり、新規候補化合物の選択において簡便に実施可能な *in vitro* 取り込み試験の結果が有用に使うことが期待される。本研究の成果の一般性をより担保するために、今後増えていくであろう hMATE1 に起因する薬物間相互作用の臨床事例をさらに加えていくことで、薬物相互作用リスクの予測性の向上とそれに連動する薬効・副作用評価の最適化が進むものと期待している。

以上