

審査の結果の要旨

氏名 三宅 健之

尿中排泄は生体内の主要な薬物排泄経路の1つであり、糸球体ろ過、尿細管分泌、尿中からの再吸収の3つの過程からなる。尿細管分泌は近位尿細管で行われ、その上皮細胞の細胞膜に発現する種々トランスポーターが、薬物ならびに内在性代謝物の効率的な輸送を担っている。中でも、OCT2/MATEs は種々のカチオン性薬物の尿細管分泌を担う主要な薬物トランスポーターであり、併用薬がそれらを阻害した場合、基質薬の動態変動が起こる（薬物間相互作用）ことから、アメリカ食品医薬局、欧州医薬品庁、我が国の医薬品医療機器総合機構の発行するガイドラインにおいて、医薬品開発の過程で相互作用を検討すべきトランスポーターとしてリストアップされている。

上記のガイドラインでは、*in vitro* 試験の結果から薬物相互作用の発生が疑われる場合、当該トランスポーター分子種選択的に代謝・輸送されるプローブ薬物をそれぞれ被験者に投与して、新薬の有無による血中濃度推移の変動をみる臨床試験が行うことが強く推奨されている。このような試験は医薬品開発後期に計画されるが、新たに臨床試験を計画・実施することによる経済的・時間的コストの問題や、偽陰性・偽陽性の問題が生じる。一方、トランスポーターの内在性基質をマーカーとして *in vivo* でトランスポーターの機能変動が評価できれば、プローブ薬物を投与することなく第1相試験において薬物間相互作用リスクを評価することが可能となるほか、複数化合物を同時にモニターすることにより偽陰性・偽陽性の確率を下げることができる。

この方法論は国内外の製薬企業や、国際的なトランスポーター研究者のコンソーシアムから注目を集めており、当研究室においてもトランスポーター阻害剤の単回投与で動態変動を生じる内在性基質の探索を行ってきた。OCT2/MATEs については、その血漿中濃度あるいは腎クリアランスがトランスポーター機能を反映する基質として、*creatinine* や *N¹-methylnicotinamide* (NMN) が見出されてきた。しかしこれらの化合物には、腎排泄におけるトランスポーターの寄与が小さい (*creatinine*) ことや、全身クリアランスに占める腎排泄の寄与が小さく、トランスポーターの機能低下によって血漿中濃度が変動しない (NMN) といった欠点がある。

申請者である三宅は、感度および特異性に優れた OCT2/MATEs の機能マーカーを新たに見出すべく研究に取り組んだ。本論文の第1章では、OCT2/MATEs の基質として新たに *N¹-methyladenine* (*m¹A*) を同定し、そのトランスポーター機能マーカーとしての適性を評価するために行った一連の前臨床試験・ヒト臨床試験の結果を示している。第2章では、併用薬によるトランスポーターや代謝酵素の阻害と同じく、薬物動態の個人差を生む要因として、遺伝子多型に注目して研究を行った。*m¹A* が OCT2 の機能を反映する血漿マーカーとなりうるという知見と、ヒトメタボロームに関するゲノムワイド関連解析を行った先行研究を組み合わせたアプローチにより、OCT2 の発現調節に関わる可能性のある新たな遺伝

子多型を探索した。

第1章 腎有機カチオントランスポーターOCT2/MATEsの新規機能マーカー探索

1-1. OCT2 および MATEs の基質としての *N*¹-methyladenosine の同定

申請者は、OCT2/MATE の内在性基質の新規探索のため、野生型および Oct1/2 double KO (dKO) マウスの血漿・尿サンプルを用いて、Non-targeting なメタボローム解析を実施した。検出された 819 化合物のうち、tRNA を構成する修飾核酸である *N*¹-methyladenosine (*m*¹A) が、Oct1/2 dKO マウスにおいて血漿中濃度が顕著に増加し、尿中排泄量が減少する唯一の化合物として見出された。トランスポーターを安定発現させた HEK293 細胞を用いて輸送実験を行ったところ、*m*¹A はマウス Oct1/2 および *Mate*1 の基質であること、ヒト OCT2 および MATE2-K の基質であるがヒト MATE1 の基質でないことが明らかとなった。

1-2. *m*¹A のマウス体内動態における Oct1/2 および *Mate*1 の寄与の検討

*m*¹A のマウス静脈内投与試験を行ったところ、野生型マウスにおける *m*¹A の全身クリアランスの 7 割程度を腎クリアランスが占めていた。Oct1/2 dKO マウス、および *Mate*1 阻害剤である pyrimethamine (PYR) を予め投与したマウスでは、*m*¹A の腎クリアランスが対照群の 50% (糸球体濾過速度 (GFR) と同程度) まで低下し、それに伴って *m*¹A の血漿中濃度は 2 倍程度高い値を示した。他方、*Mate*1 とともに尿細管上皮細胞の管腔側に発現する P 糖タンパクや breast cancer resistance protein といったトランスポーターのノックアウトマウスでは、*m*¹A の動態が野生型と変わらなかった。以上の結果から、マウスにおいて、Oct1/2 および *Mate*1 が *m*¹A の尿細管分泌および全身曝露を担う主要な分子であると考えられた。

1-3. *m*¹A は既知の内在性基質よりも優位な OCT2/MATE2-K 機能マーカーとなることが示唆された

上記の結果から、*m*¹A はヒトにおいて OCT2/MATE の機能を反映する血中マーカーとなることが期待される。そこで、健常成人男性 15 名 (45 歳以下の若年者 8 名、65 歳以上の高齢者 7 名) を対象とした臨床試験を行い、*m*¹A および creatinine の血漿中濃度および腎クリアランスを測定し、マーカーとしての適性を評価した。その結果、*m*¹A は健常人における日内変動や個人間差が比較的小さいことが明らかとなった。*m*¹A の腎クリアランスは creatinine と緩やかな相関を示し、またその値が GFR の 2 倍程度であったことから、OCT2/MATE2-K を介した尿細管分泌を受ける化合物であることが示唆された。OCT2/MATE の機能低下により、*m*¹A の血漿中濃度が上昇するか否かを確認するため、薬効用量で OCT2/MATEs の阻害能を有する DX-619 を、プローブ薬 metformin とともにカニクイザルに投与した。測定の結果、DX-619 投与期において、metformin と同様に *m*¹A の血漿中濃度 AUC が上昇したことから、血漿中 *m*¹A 濃度は OCT2 機能マーカーとして有用であることが示唆された。

第2章 腎有機カチオントランスポーターOCT2 の発現調節を担う遺伝子変異および転写因子の探索

最近行われた、メタボロームとゲノム情報との関連解析[Shin et al., 2014]で、ヒト血清中 m¹A 濃度が OCT2 の SNPs とのみ有意に相関することがわかっている。当該の 22 個の SNPs は、1 箇所 の 3'UTR 変異を除いて全てイントロン中の変異である。申請者は、これらの変異のいずれかが OCT2 の発現調節に関わり、m¹A の血清中濃度のみならず、基質薬の動態を変動させる可能性を考えた。イントロン中の当該の SNP(s)を含む遺伝子領域は OCT2 のエンハンサーとして機能していると仮説を立て、当該領域の同定のために以下の実験を行った。

まず、ChIP-seq のデータベース (ChIP-Atlas) を参照し、当該の SNPs を含み、かつ DNase I 感受性およびエンハンサー様ヒストン修飾が認められる遺伝子領域を、エンハンサー候補領域としてピックアップした。条件に合致した 7 つの領域を、OCT2 のプロモーター領域とともにそれぞれルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、細胞にトランスフェクションした際のルシフェラーゼ活性を比較した。その結果、HepG2 細胞および HeLa 細胞において、5 つの SNPs を含む 1171bp の領域がルシフェラーゼ活性を上昇させた。さらに、この領域中の SNPs をそれぞれ minor allele に置換したところ、rs315987 が minor allele であるとき、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した。rs315987 を含む領域に認識モチーフをもち、minor allele のとき結合能が低下する転写因子を検索したところ、数多くの遺伝子のプロモーターやその上流にある GC-box に結合し、転写を制御することの知られている Sp1 がヒットした。実際に、エンハンサー候補領域から Sp1 の認識配列を削除したレポーターベクターでは、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した。さらに、OCT2 を内因性に発現する 786-O 細胞に Sp1 阻害剤である Mithramycin A を処理すると、OCT2 の mRNA 発現量が顕著に減少した。以上の結果から、rs315987 の周辺領域が OCT2 エンハンサーとして機能すること、またその活性を Sp1 が担っていることが示唆された。

以上のように、申請者は OCT2/MATE2-K の新規内在性基質として m¹A を同定し、その血漿中濃度および腎クリアランスが、プローブ薬である metformin と同等に、かつ既知の内在性基質 (creatinine, NMN) よりも感度よく特異的に、OCT2/MATE2-K の機能低下を反映することを示した。臨床での実用に向けて、PYR のヒトにおける用量漸増試験を実施中であるほか、OCT2 阻害薬 dolutegravir についても臨床試験を計画中である。また、m¹A の血清中濃度に関するゲノムワイド関連解析の結果に基づき、OCT2 の発現調節を担う可能性のあるイントロン中の遺伝子領域および転写因子を見出した。本研究で得られた知見は、医薬品体内動態の最適化、薬物間相互作用の回避など医薬品の適正使用に大いに貢献するものと期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。