

論文の内容の要旨

論文題目

OATP1B 介在性薬物相互作用リスク評価に向けた

内在性バイオマーカー活用のための薬物動態研究

氏名 望月 達貴

第 1 章 OATP1B 内在性バイオマーカーの合成過程に関する検討

[背景・目的]

薬物トランスポーター介在性の薬物間相互作用(DDI)のリスクを予測するための手法として、内在性バイオマーカーを用いた top-down アプローチが現在注目されている。中でも、アニオン性薬物の肝取り込みを担うトランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP)1B 介在性 DDI に対して本手法を適用する際には、内在性バイオマーカーの血漿中濃度、およびそこから算出される血漿中濃度時間曲線下面積(AUC)を元に予測を行うのが一般的である。これらは、OATP1B によるクリアランス速度のみならず、生体内での合成速度によっても規定される値であるが、内在性バイオマーカーの合成過程に関する知見は非常に限られているのが現状である。そこで、内在性バイオマーカーの主要な合成酵素の検討および合成速度をモニターするための指標（合成マーカー）の確立を目的とした研究を行った。

[方法・結果]

胆汁酸抱合体 glycochenodeoxycholate-3-sulfate (GCDCA-S)および glycochenodeoxycholate-3-glucuronide (GCDCA-G)は、良好な OATP1B 内在性バイオマーカーになることが知られているものの、生体内での主要な合成酵素については検討されていない。そこで、過去に報告された内在性代謝物の血清中濃度に関するゲノムワイド関連解析(Genome-wide association study, GWAS)データ (Shin *et al.*, 2014)を参照し、これらの主要な合成酵素を同定することを試みた。

GCDCA-S の血清中濃度と相関する single nucleotide polymorphism (SNP)を調査したところ、19 番染色体上の遺伝子 *SULT2A1* 近傍に、有意に相関する SNP が濃縮されていることが分かった。*SULT2A1* によりコードされているタンパク質 SULT2A1 は in vitro で胆汁酸の硫酸抱合活性を持つ酵素であることが報告されていた(Huang *et al.*, 2010)。そこで、GCDCA-S

血清中濃度と相関する SNP が SULT2A1 の活性に影響するかを検討したところ、相関する SNP もしくはそれと連鎖不平衡の関係にある複数の SNP が SULT2A1 の発現調節領域に存在することや、SULT2A1 発現との相関報告があることが分かった。また、3'非翻訳領域 (3'UTR) に存在する相関 SNP rs296365 および rs296366 は、その minor allele 導入により上流遺伝子の発現が低下することが luciferase reporter assay から明らかとなった。これらの結果から、SULT2A1 は GCDCA-S の主要な合成酵素であることが示唆された。

GCDCA-G については、上記 GWAS データから合成に関わることが想定される遺伝子が同定されなかったため、ヒト生体内でグルクロン酸抱合を担う UGT 発現ミクロソームを用いた合成酵素の検討を行った。結果として、UGT1A3, UGT1A4, UGT2B7 が GCDCA-G が同程度の合成活性を持つことが明らかとなったことから、GCDCA-G 血中濃度は一酵素の機能変動の影響を受けにくい内在性バイオマーカーであることが示唆された。

OATP1B 内在性バイオマーカーとして最も研究が進んでいる coproporphyrin I (CP-I) については、被験薬投与検体を用いた DDI リスク予測に応用できるよう、合成速度をモニターするための合成マーカーの検討を行った。その候補化合物として、前駆体 uroporphyrinogen I の酸化体である UP-I に着目した。結果として、*in vitro* 試験から、UP-I は OATP1B1 および OATP1B3 の基質にならないことが明らかとなり、複数の OATP1B 阻害剤投与試験の検体中の UP-I を測定したところ、UP-I 血漿中濃度は OATP1B 機能変動の影響を受けないことが明らかとなったことから、UP-I が CP-I の合成マーカーとなる可能性が示唆された。

[考察・結論]

以上の検討から、OATP1B 内在性バイオマーカーの合成速度を評価するために必要な、合成酵素もしくは合成マーカーに関する知見を得ることができた。今後は、本知見を OATP1B 介在性 DDI リスク予測に活用するための *in vitro* 実験系およびパラメーターの確立や、それらの情報の生理学的薬物速度論(PBPK)モデルへの導入法を検討することが必要である。

第2章 ATP1B 阻害剤 Cyclosporin A の用量依存性評価臨床試験に基づいた内在性バイオマーカーの特性および有用性の検証

[背景・目的]

OATP1B 内在性バイオマーカーを用いた top-down アプローチによる OATP1B 介在性 DDI リスク予測を指向した臨床研究は、現在までに複数行われてきた。中でも特に、OATP1B 典型基質 rifampicin (RIF) による用量依存的な内在性バイオマーカーの動態評価試験 (Takehara *et al.*, 2018; Mori *et al.*, 2020)、および本試験結果に基づく PBPK モデルを用いた top-down アプローチの検証試験 (Yoshikado *et al.*, 2018) は、本手法の有効性を直接的に示した報告である。一方で、RIF 以外の OATP1B 阻害剤を用いた上記のような検証試験は存在しないことから、本手法の汎用性については不明である。また、内在性バイオマーカーの有用性を決定づける重要な要素であるトランスポーターの阻害検出感度について、CP-I や GCDCA-S を含む複数の OATP1B 内在性バイオマーカーでの比較検討はこれまでになされて

いない。そこで本研究では、OATP1B 阻害剤 cyclosporin A (CysA) の OATP1B 阻害効果の用量依存性を検証する特定臨床試験 (CysA 投与試験) を実施し、内在性バイオマーカーの特性の比較検討および DDI リスク予測に際する top-down アプローチの有用性の検証を行うこととした。

[方法・結果]

全身クリアランスに対する OATP1B の寄与が大きいプローブ薬の体内動態は CysA の投与量依存的に上昇していたことから、CysA の用量依存的な OATP1B 阻害効果が確認された。また、測定した内在性化合物のうち、複数の化合物で最大血漿中濃度比や AUC 比 (AUCR) に CysA 用量依存性が認められた。このような化合物は OATP1B 内在性バイオマーカーとして、DDI リスク評価に有用であることが示唆された。

続いて、上記結果を過去に行われた RIF 用量依存性評価試験 (Mori, *et al.*, 2020) の結果と比較したところ、内在性バイオマーカー間の AUCR には差があることを見出した。本現象の原因を明らかにするために、プローブ薬物およびバイオマーカー化合物の肝取り込みにおける OATP1B1 を初めとした複数のトランスポーターの寄与率を推定したところ、プローブ薬物間ならびにバイオマーカー化合物間で OATP1B1 と OATP1B3 の寄与率が異なることが示唆された。RIF の阻害効果は OATP1B1 と OATP1B3 で同等であることが報告されていた (Takehara *et al.*, 2017; Yoshikado *et al.*, 2018) ため、それぞれのトランスポーターに対する CysA の阻害効果を発現細胞への基質取り込み試験から評価したところ、OATP1B1 に比して OATP1B3 では、CysA preincubation 時の阻害効果が弱いことが明らかとなった。これらの結果から、CysA 投与試験では、OATP1B3 阻害が OATP1B1 阻害に比較して弱いため、OATP1B3 の寄与率が高い化合物について、AUCR の増加が低かったものと推測している。

さらに、生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルを用いて、DDI リスク予測に対する top-down アプローチの有用性検証を行った。PBPK モデルに対して、CysA および内在性バイオマーカーの血中濃度を fitting することで求めたパラメーターを用いることで、CysA 併用時のプローブ薬の血漿中濃度を説明することができた。一方で、*in vitro* 試験により決定した CysA の OATP1B1 に対する阻害定数では、CysA 併用によるプローブ薬の血中濃度の上昇は再現できなかった。すなわち、従来の bottom-up アプローチでは、CysA の OATP1B 介在性 DDI のリスクを定量的に予測することは困難であり、このような化合物の DDI リスクを開発段階で把握するためには、臨床開発段階で内在性バイオマーカーの変動を確認しておくことが重要であると考えられる。変動が認められた場合には、top-down アプローチにより、既存薬の薬物動態に与える影響を推定することで、OATP1B 介在性 DDI の重篤度を判定し、プローブ薬を用いた臨床試験による検証を進めることが望まれる。

[考察・結論]

本研究から、OATP1B 内在性バイオマーカーの中でも、肝取り込みに対する OATP1B1 および OATP1B3 の寄与の差により、OATP1B の阻害検出感度が異なることが示された。また、

内在性バイオマーカーを用いた top-down アプローチによる DDI リスク予測が RIF 以外の OATP1B 阻害剤で成功することを実証したことにより、その有用性が大きく補強されたものと考えており、本結果は本手法の医薬品開発への応用に大きく貢献するものと考えている。

[参考文献]

- Huang J, Bathena SP, Tong J, Roth M, Hagenbuch B, and Alnouti Y (2010) Kinetic analysis of bile acid sulfation by stably expressed human sulfotransferase 2A1 (SULT2A1). *Xenobiotica* **40**:184–194.
- Mori D, Kimoto E, Rago B, Kondo Y, King-Ahmad A, Ramanathan R, Wood LS, Johnson JG, Le VH, Vourvahis M, David Rodrigues A, Muto C, Furihata K, Sugiyama Y, and Kusuhara H (2020) Dose-Dependent Inhibition of OATP1B by Rifampicin in Healthy Volunteers: Comprehensive Evaluation of Candidate Biomarkers and OATP1B Probe Drugs. *Clin Pharmacol Ther* **107**:1004–1013.
- Shin S-Y, Fauman EB, Petersen A-K, Krumsiek J, Santos R, Huang J, Arnold M, Erte I, Forgetta V, Yang T-P, Walter K, Menni C, Chen L, Vasquez L, Valdes AM, Hyde CL, Wang V, Ziemek D, Roberts P, Xi L, Grundberg E, Multiple Tissue Human Expression Resource (MuTHER) Consortium, Waldenberger M, Richards JB, Mohny RP, Milburn M V, John SL, Trimmer J, Theis FJ, Overington JP, Suhre K, Brosnan MJ, Gieger C, Kastenmüller G, Spector TD, and Soranzo N (2014) An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat Genet* **46**:543–550.
- Takehara I, Terashima H, Nakayama T, Yoshikado T, Yoshida M, Furihata K, Watanabe N, Maeda K, Ando O, Sugiyama Y, and Kusuhara H (2017) 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* **34**:1601–1614.
- Takehara I, Yoshikado T, Ishigame K, Mori D, Furihata K, Watanabe N, Ando O, Maeda K, Sugiyama Y, and Kusuhara H (2018) Comparative Study of the Dose-Dependence of OATP1B Inhibition by Rifampicin Using Probe Drugs and Endogenous Substrates in Healthy Volunteers. *Pharm Res* **35**:1–13.
- Yoshikado T, Toshimoto K, Maeda K, Kusuhara H, Kimoto E, Rodrigues AD, Chiba K, and Sugiyama Y (2018) PBPK Modeling of Coproporphyrin I as an Endogenous Biomarker for Drug Interactions Involving Inhibition of Hepatic OATP1B1 and OATP1B3. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **7**:739–747.