

審査の結果の要旨

氏名 望月 達貴

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 は種々薬物の肝細胞への取り込みに働くトランスポーターであり、その薬物動態学的な重要性から、医薬品開発において新薬の OATP1B 介在性 DDI リスクを定量的に予測することが求められている。従来、*in vitro* 評価系と薬物の臨床投与量における血漿中濃度を考慮して、リスク評価が行われてきた。しかし、偽陽性・偽陰性が少なからず生じることも指摘されており、更なる精緻化が求められている。そこで、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 アプローチを併用することが注目されている。

本論文は、二章から構成されており、第 1 章では、OATP1B 内在性バイオマーカーの合成過程に関する検討を、第 2 章では、カルシニューリン阻害剤である Cyclosporin A を用いた臨床試験の結果に基づき、OATP1B 内在性バイオマーカーの有用性を実証することに取り組んだ成果が報告されている。

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

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が行なわれた。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。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に関する情報を検索した。GCDCA-Sの血清中濃度と相関するsingle nucleotide polymorphism (SNP)を調査した結果、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。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と結論づけられている。

第2章OATP1B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

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middle-out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。

全身クリアランスに対するOATP1Bの寄与が大きいプロブ薬の体内動態は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阻害効果が示唆された。また、測定した内在性化合物のうち、bilirubin, CP-I, 胆汁酸硫酸・グルクロン酸抱合体(GCDCA-S, GCDCA-Gなど), 長鎖ジカルボン酸(hexadecanedioateなど)についても、CysA用量依存的な血漿中濃度の上昇がみられ、これらはOATP1B内在性バイオマーカーとして機能す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, Kimoto, et al., 2020, RIF投与試験)の結果と比較したところ、内在性バイオマーカーの中でも、そのOATP1B阻害検出感度には差があることが分かった。中でも、GCDCA-Sおよ

びGCDCA-Gでは、RIF投与試験でのOATP1B阻害検出感度はCP-Iを含む他のバイオマーカーに比して高かったものの、CysA投与試験では他のバイオマーカーと同様の感度を示していたことに着目した。本現象の原因を明らかにするために、CP-IおよびGCDCA-Sの肝取り込みに対するトランスポーターの寄与率を推定したところ、CP-Iに比してGCDCA-Sの肝取り込みに対するOATP1B3の寄与が大きいことが複数の手法から明らかとなった。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、CysAのそれぞれのトランスポーターに対する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、CysA preincubation時の阻害効果は、OATP1B1に比してOATP1B3で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の阻害が不十分であったために、肝取り込みに対するOATP1B3の寄与率が高いGCDCA-Sの阻害検出能力が、OATP1B1およびOATP1B3とともに十分阻害したRIF投与試験よりも低くなったことが示唆された。さらに、CysA投与試験の結果を用いて、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。生理学的薬物速度論(PBPK)モデルを用いて、CysA、CP-Iの血中濃度をfittingすることで求めた阻害定数 K_i (fitted K_i)は0.657 nM であり、本パラメータを用いることで、CysA併用時のプローブ薬 pitavastatinおよびrosuvastatinの血漿中濃度を精度よく予測することができた。一方で、in vitro試験から求めたCysAのOATP1B1に対する K_i (19.2 nM)を用いるとCysA併用によるプローブ薬の血中濃度の上昇はほとんど再現できなかったことから、CysAによるDDIリスク予測に際するtop-downアプローチの有用性が示された。

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。OATP1B3の寄与が大きい被相互作用薬に対するDDIを予測する際には、CP-IよりもGCDCA-Sを用いることで、より精度の高い予測が可能となることが示唆された。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。

上記の通り、本研究は医薬品開発に貢献する研究成果であり、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。