

博士論文（要約）

腎臓カチオン性トランスポーター
介在性薬物間相互作用の予測の精緻化

友田 有加菜

第一章 腎有機カチオントランスポーターにおける阻害定数の変動要因の同定

【背景・目的】

トランスポーターを介した薬物相互作用（DDI）は重篤な副作用の発現や治療効果の減弱につながることもあり、患者の不利益となるため、医薬品開発段階から未然に防ぐためのリスク評価が求められている。リスク評価は、日米 EU の規制当局の定める決定木に従い、*in vitro* 試験においてカットオフ値を超えた場合は当該トランスポーターのプロブ薬の同時投与による臨床薬物相互作用試験の実施が推奨されている。最近では、プロブ薬に代わってトランスポーターの内在性基質を用いることで、臨床開発段階早期に DDI の可能性を評価する試みがなされており、近位尿細管の上皮細胞膜に発現し、有機カチオン性薬物の輸送に関与する organic cation transporter（OCT）2 および multidrug and toxin extrusion（MATE）においては creatinine や *N*¹-methylnicotinamide（NMN）といった内在性バイオマーカーの有用性について研究が進められている。OCT2 内在性バイオマーカーである creatinine の体内動態モデルに OCT2 および MATEs 阻害剤として知られる 10 化合物の *in vitro* 試験より得られた当該トランスポーターの阻害定数（ K_i 値）を組み込み、血清 creatinine および creatinine クリアランスを予測し、実測値と比較したところ、OCT2 阻害剤 dolutegravir の予測値と実測値に 10 倍以上の乖離が認められた。この原因として、creatinine の体内動態モデルに組み込む K_i 値が大きくばらついていることが考えられた。そこで、OCT2 介在性 DDI 予測の精緻化を目指した最適な K_i 値評価法の提案に向け、 K_i 値に乖離が生じる原因の解明を行った。

【結果】

これまでの報告から、 K_i 値に乖離が生じる原因として、基質依存性、時間依存性、タンパク結合に

よる阻害効果の影響、OCT2 変異体による取り込みの変化による阻害効果の影響が考えられた。そこでこれら 4 つの要因について OCT2 安定発現 HE293 細胞を用いて検討を行ったところ、基質依存性が dolutegravir の K_i 値に最も影響する要因であることが確認された。その他 3 つの要因についても検討を行ったが、いずれも K_i 値の変動は認められなかった。

【考察・結論】

本検討では、OCT2 に対する K_i 値に影響を与えうる要因として基質依存性が最も K_i 値に影響を与えることを明らかにした。基質依存性はトランスポーターの分子内に複数の基質結合部位が存在するために生じると考えられており、他のトランスポーターでも複数報告されている。OCT2 においては、基質化合物との相互作用の複雑さから基質依存性の機序は明らかとなっておらず、今後、OCT2 を介した DDI リスク評価に基質依存性の検討項目を織り込むにあたり、適切な基質を選択するためにも基質依存性の機序を明らかにするべきであると考ええる。本研究の基質依存性の検討で得られた dolutegravir の K_i 値の中で最も小さい値を使用した場合、OCT2 プローブ薬である metformin と dolutegravir を併用した臨床試験結果を説明することが可能である。しかし、本研究で得られた metformin に対する dolutegravir の K_i 値はそれよりも大きい値であったため、基質依存性だけではなく別の変動要因があることが示唆された。

第二章 腎有機カチオントランスポーターOCT2 における阻害定数の宿主細胞依存性とその作用機序の解明

【背景・目的】

第一章の結果で得た in vitro K_i 値では、metformin と dolutegravir との薬物相互作用を説明できな

かった。そこで他の K_i 値の変動要因を探索するため、これまでに報告されている dolutegravir の K_i 値および IC_{50} を算出した文献を精査したところ、阻害試験に使用している基質に加えて、OCT2 を強制発現させた宿主細胞が異なっていることを見出した。CHO-K1 細胞を使用し算出した K_i 値は、metformin との DDI を説明できる程度の値であったことから、OCT2 介在性 DDI 予測のためには、宿主細胞依存性も検討する必要性が示唆されたため、HEK293 細胞および CHO-K1 細胞の OCT2 安定発現細胞を用いて宿主細胞依存性の可能性を検討することとした。

【結果】

HEK293 細胞および CHO-K1 細胞の OCT2 安定発現細胞において、宿主細胞依存性は確認できたが、既報とは異なり OCT2 安定発現 HEK293 細胞を用いて算出した dolutegravir の K_i 値より OCT2 安定発現 CHO-K1 細胞を用いて算出した K_i 値のほうが大きい値となったため、発現様式の差異を考慮し、各宿主細胞に OCT2 を一過性に発現させた細胞を用いて K_i 値を比較した。その結果、一過性発現細胞では CHO-K1 細胞で既報の K_i 値と同程度の値となった。以上の結果から、宿主細胞依存性およびその発現様式の差異も K_i 値の変動要因となりうる可能性が示唆された。これらの原因の機序解明に向け、OCT2 の翻訳後修飾に着目した。OCT2 は Src ファミリーに属する Yes1 キナーゼによってチロシンリン酸化されることでその機能発現が上昇することが知られている。そこで、OCT2 安定発現細胞 HEK293 細胞および CHO-K1 細胞に Yes1 キナーゼを一過性に発現させた細胞を用いて K_i 値の変動を検証したところ、CHO-K1 細胞において、dolutegravir 低濃度域での阻害が減弱し、Yes1 キナーゼの発現が dolutegravir の阻害強度に影響を与えている可能性が示唆された。

【考察・結論】

本研究を通して、OCT2 阻害剤 dolutegravir の K_i 値に乖離が生じる原因として、基質依存性だけでなく宿主細胞依存性および発現様式の差異があることが示唆された。この原因の機序解明に向けた OCT2 翻訳後修飾の検討では、CHO-K1 細胞において dolutegravir の阻害効果に Yes1 キナーゼが関与していることが示唆されたことから、今後、Yes1 キナーゼによる OCT2 の機能変化についてさらなる検討が必要である。種々の検討の結果、臨床報告を説明できる *in vitro* 阻害試験の条件を見出したが、本条件の適切性を臨床試験で検証を行う必要があるため、臨床試験を企画した。本試験の結果をフィードバックすることで、より精緻な *in vitro* 試験系の構築が実現するものと期待する。