

# 博士論文

## 論文題目

**OATP1B1** を介した薬物間相互作用の適正  
評価に向けた前臨床プローブ基質の最適化  
ならびに新規蛍光阻害評価系の構築

和泉 沙希

(戸籍名：相良 沙希)

第一章	序論.....	5
第一節	トランスポーターとは.....	5
第二節	肝臓に発現する OATP ファミリートランスポーター.....	7
第三節	OATP1B1 阻害リスク評価.....	13
第四節	in vitro OATP1B1 阻害評価系の課題.....	16
第二章	臨床基質薬を用いた基質依存的な阻害の検証.....	19
第一節	基質依存的な阻害.....	19
第二節	臨床基質薬の OATP1B1 を介した輸送の速度論的パラメータ.....	20
第三節	CsA, RIF, GEM, および GEM-glu の OATP1B1 に対する阻害活性.....	25
第三章	OATP1B1 阻害評価に適した RI 標識基質の探索.....	29
第一節	RI プローブ基質を用いた阻害試験.....	29
第二節	基質依存的な阻害が DDI リスク評価に与える影響.....	36
第三節	基質依存的な阻害のメカニズムの検証.....	41
第四章	新規 OATP1B1 蛍光基質の探索と蛍光法に基づく阻害評価系の構築.....	46
第一節	蛍光法阻害評価系構築の意義と既存の蛍光基質の問題点.....	46
第二節	新規 OATP ファミリートランスポーターの蛍光基質の探索.....	49
第三節	OATP1B1 蛍光基質の精査.....	53
第四節	OATP1B1 阻害試験に適した蛍光基質の選出.....	55
第五節	DCF と E <sub>2</sub> G の相互阻害様式の検討.....	60
第五章	総括と今後の展望.....	63
第六章	実験の部.....	68
第一節	Materials and Methods.....	68
第二節	Transporter-expressing cells.....	68
第三節	Uptake and Inhibition Studies Using Transporter-expressing Cell.....	69
第四節	Determination of Kinetic Parameters.....	71
第五節	Statistical Analysis.....	73
第六節	Prediction of OATP1B1-mediated Drug-drug Interactions with a Static Model.....	74
第七章	特許出願・学会発表.....	76
第八章	引用文献.....	79

## Abbreviations

ABC	ATP binding cassette
AUC	area under the curve
BCRP	breast cancer resistance protein
BSP	sulfobromophthalein
CsA	cyclosporin A
CYP	cytochrome P450
DDI	drug-drug interaction
DCF	2', 7'-dichlorofluorescein
DBF	4', 5'-dibromofluorescein
E <sub>2</sub> G	estradiol-17 $\beta$ -glucuronide
E <sub>1</sub> S	estrone-3-sulfate
EMA	European Medicines Agency
8-FcA	8-fluorescein-cAMP
FDA	Food and Drug Administration
FL	fluorescein
GEM	gemfibrozil
GEM-glu	gemfibrozil-O- $\beta$ -glucuronide
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
K <sub>i</sub>	inhibition constant
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten constant
MATE	multidrug and toxin extrusion protein
MHLW	Ministry and Health, Labour and Welfare
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
OG	Oregon green
P-gp	P-glycoprotein
PK	pharmacokinetics
RI	radio isotope
RIF	rifampin
SLC	solute carrier
TCA	taurocholate

# 第一章

## 序論

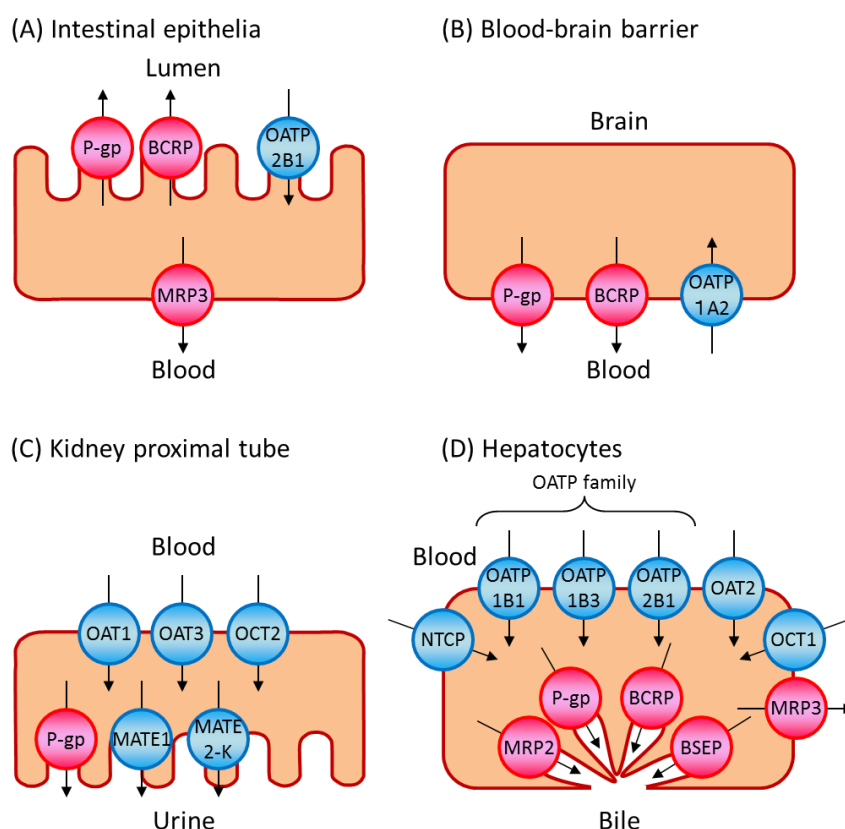
## 第一章 序論

### 第一節 トランスポーターとは

トランスポーターは小腸，肝臓，腎臓，脳などの様々な組織に発現する膜タンパク質であり，生体物質や医薬品の細胞膜内外への輸送を担っている．トランスポーターを介する輸送は大別して促進拡散と能動輸送に分類され，前者は細胞膜内外における基質薬物の濃度勾配に従う輸送でありエネルギーを必要としないが，後者は基質薬物の濃度勾配に逆らう輸送でありエネルギーを必要とする．能動輸送はさらに一次性能動輸送と二次性能動輸送に分類される．前者は adenosine triphosphate (ATP) のエネルギーを駆動力としており，トランスポーターの分子内に ATP 結合部位ならびに ATP 加水分解部位を有することから ATP binding cassette (ABC) トランスポーターと称される．後者は一次性能動輸送により蓄積されたエネルギーを駆動力としており， $H^+$ ， $Na^+$  などの共役イオンと同方向に物質が輸送される共輸送と，逆方向に輸送される逆輸送の二種類がある．生体内には多くの種類のトランスポーターが存在しており，ABC トランスポータースーパーファミリーと Solute carrier (SLC) トランスポータースーパーファミリーの 2 つのスーパーファミリーに分類され，さらにそれぞれが複数のファミリーを有している．

数多く存在するトランスポーターのうち，P-glycoprotein (P-gp)，breast cancer resistance protein (BCRP)，organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1，OATP1B3，organic anion transporter (OAT) 1，OAT3，organic cation transporter (OCT) 2，multidrug and toxin extrusion protein (MATE) 1，および MATE-2K は多様な薬物の輸送を担い，これらのトランスポーターを介した薬物間相互作用 (drug-drug interaction; DDI) や遺伝的多型に起因する医薬品の体内動態の変動について多くの臨床報告がなされていることから，

薬物動態上特に重要なトランスポーターとして認識されている<sup>1,2</sup>。上記 9 つのトランスポーターのうち、P-gp, BCRP は小腸, 肝臓, 腎臓, および血液脳関門などに発現する ABC トランスポーターであり, 医薬品の消化管吸収や中枢移行を妨げるとともに, 胆汁・尿中排泄に関与している<sup>3</sup>。OATP1B1 および OATP1B3 は肝臓特異的, OCT2 は腎臓特異的に発現する SLC トランスポーターであり, 医薬品の血中から肝臓または腎臓への取り込みに関与している。さらに MATE1, MATE-2K は腎臓に発現し, 医薬品の腎臓から尿中への排泄に関与している (Figure 1)。



**Figure 1.** Drug transporters expressed in the intestine (A), brain (B), kidney (C), and liver (D) in human.

## 第二節 肝臓に発現する OATP ファミリートランスポーター

肝臓は薬物の代謝および排泄に特に大きな役割を果たす臓器であり、肝細胞、類洞内皮細胞、肝星細胞、クッパー細胞、単球由来マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などの複数の細胞から構成されている。このうち肝細胞は肝臓を構成する主要な細胞であり、肝臓で行われる薬物の代謝および排泄において中心的な役割を担っている。市販薬の約 8 割が肝代謝排泄 (クリアランス) 型に分類されており、肝臓における異物解毒能力 (肝クリアランス) は、循環血における滞留性ならびに経口投与時のバイオアベイラビリティに関連している。そのため、医薬品開発において、適切な肝クリアランスを有する化合物を選別することは極めて重要なポイントであり、肝ミクロソームや肝細胞などを用いた *in vitro* 試験法の開発、ならびに *in vitro* 試験結果に基づいた肝クリアランスの予測法 (*in vitro-in vivo correlation*) が開発されてきた。

肝臓内で薬物が代謝あるいは胆汁中に排泄されるためには、血中から肝細胞中に取り込まれる必要がある。細胞膜は脂質二重膜から構成されており、膜透過性の高い化合物は受動拡散により速やかに血中から肝細胞中へ分布する。一方、膜透過性の低い化合物では受動拡散による細胞膜透過は限定的であるが、肝細胞膜上には複数のトランスポーターが発現しており、その基質となる場合には効率的に肝細胞内へ取り込まれ、代謝や胆汁排泄を受ける。

ヒト肝臓の血管側膜上に発現する SLC トランスポーターのうち、OATP ファミリー (SLCO) トランスポーターは生理的条件下で負電荷を有するアニオン性化合物を主な基質とするが、一部の中性化合物や双性イオン化合物も基質として認識し、Table 1 および Figure 2 に代表される医薬品の肝細胞への能動的な輸送に主要な役割を果たしている<sup>45</sup>。ヒトの肝臓には OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の 3 分子種が発現している。OATP1B1 と OATP1B3 のアミノ酸配列の相同性は 80%にのぼり、前者が肝小

葉に広く発現しているのに対し、後者は中心静脈周辺に発現している<sup>6</sup>。一方 OATP1B1 / 1B3 と OATP2B1 との相同性は 40%程度である<sup>4</sup>。これら 3 分子種のうち蛋白レベルで最も高発現しているのは OATP1B1 であるが<sup>7</sup>、OATP1B1 と OATP1B3 は類似の基質認識性を有しているため、医薬品の肝取り込みにおける両トランスポーターの寄与を明らかにする研究がなされてきた。その結果、多くの化合物において OATP1B3 よりも OATP1B1 の寄与が大きいことが報告されている<sup>8-12</sup>。著者らも OATP1B1 および OATP1B3 強制発現細胞とヒト肝細胞を用い、それぞれの評価系における OATP1B1 および OATP1B3 の選択的基質の取り込み比を算出し、この比を用いてこれらトランスポーターが複数の OATP 基質薬の取り込みに果たす寄与率を検討した結果、OATP1B1 が肝取り込みに主要な役割を果たしていることを明らかにした (Figure 3)。このように、OATP1B1 は様々な医薬品を基質とし、さらに OATP1B1 を介した肝取り込み過程は経口投与後の初回通過効果ならびに全身血中からの薬物のクリアランスに關与し得ることから、医薬品の体内動態決定因子の一つとなる。そのため OATP1B1 は薬物動態上重要なトランスポーターとされている。また、OATP1B1 は医薬品に加え taurocholate (TCA) などの胆汁酸、甲状腺ホルモン、ビリルビンやそのグルクロン酸抱合代謝物、estradiol-17 $\beta$ -glucuronide (E<sub>2</sub>G) や estrone-3-sulfate (E<sub>1</sub>S) といった内因性物質も基質とすることが知られている<sup>4</sup>。

この他、OATP1B1 が薬物動態上重要なトランスポーターとされている理由として、OATP1B1 に機能変化を伴う遺伝的多型が存在することが挙げられる<sup>4,5,13</sup>。変異の多くは一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) であり、変異の頻度到人種差が観察されている。代表的な OATP1B1 の遺伝的多型は exon 5 の c.521T>C であり、細胞膜上の OATP1B1 の発現量が低下することにより OATP1B1 を介した肝取り込みが減少し、基質薬である atorvastatin, pravastatin などの HMG-CoA 還元酵素阻害剤の血漿中



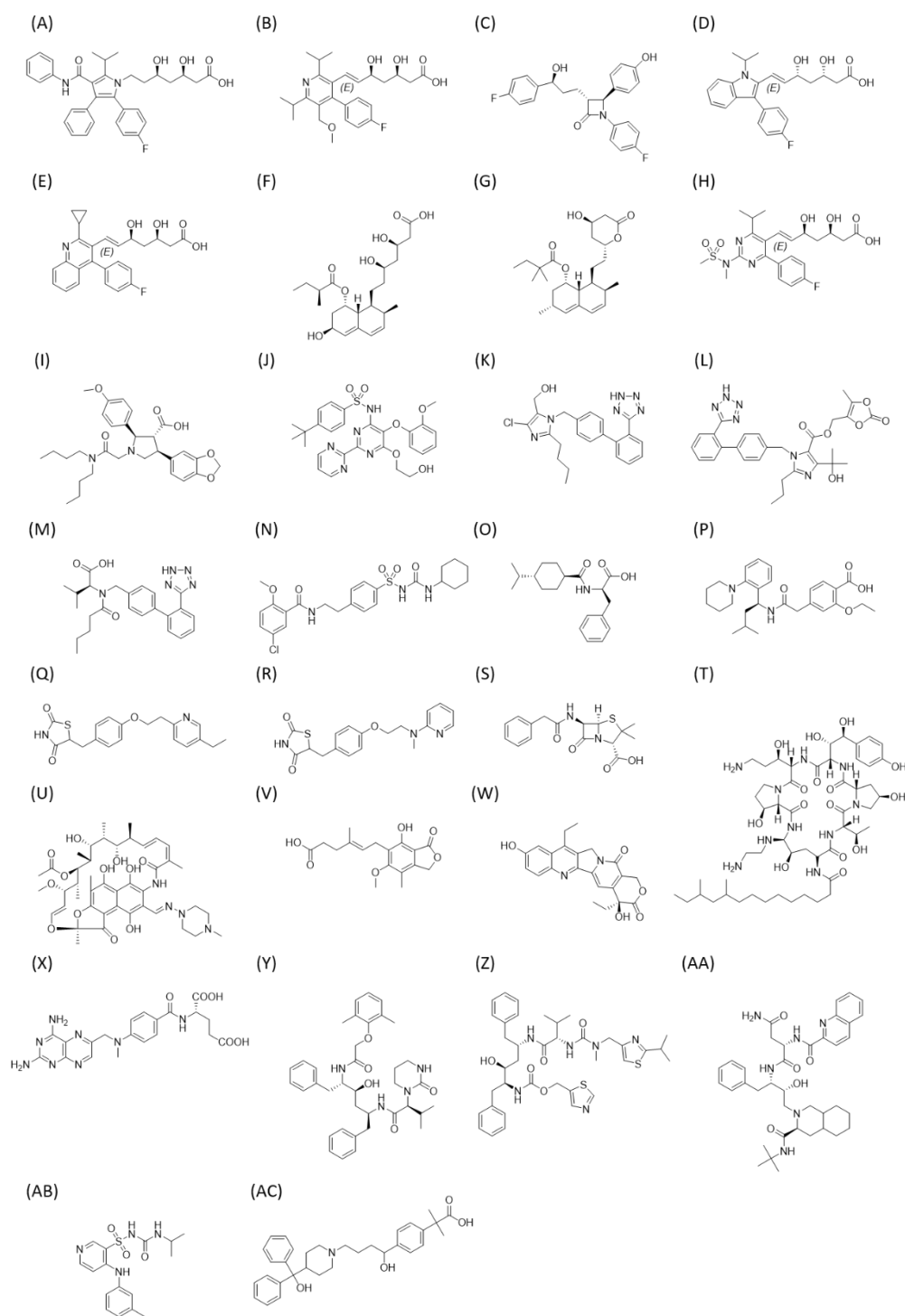
濃度が他の遺伝子型キャリアーよりも高いことが知られている<sup>45</sup>。また、pravastatinの血漿中濃度はコーカソイドの方がアフリカ系アメリカ人よりも高く<sup>14</sup>、rosuvastatinの血漿中濃度はアジア人の方がコーカソイドよりも高い<sup>15</sup>。しかしながら最近の研究では、OATP1B1の遺伝子変異の頻度のみではOATP1B1基質薬の血漿中濃度の人種差は説明できていないことが報告されている<sup>16-18</sup>。HMG-CoA還元酵素阻害剤の血漿中濃度上昇に伴う副作用として横紋筋融解症やミオパシーが挙げられる。ゲノムワイド関連解析によって、simvastatinにより誘発されたミオパシーと第12染色体上にあるOATP1B1の一塩基多型rs4363657との間に強い相関( $p = 4 \times 10^{-9}$ )が認められていることから<sup>19</sup>、simvastatinの肝取り込み低下が招く血中曝露の増大がミオパシーの原因とされている。この他、先天性のビリルビン異常疾患であるRotor症候群は、OATP1B1およびOATP1B3遺伝子の変異による抱合型および非抱合型ビリルビンの排泄異常に起因している<sup>20</sup>。

さらに、OATP1B1に関する臨床上留意すべき事柄として、OATP1B1を介したDDIが挙げられる<sup>45</sup>。DDIとは複数の薬物が併用された場合に薬効が減弱あるいは増強される事象であり、特に安全域の狭い薬物の血中濃度の上昇は重篤な副作用につながり得るため、医薬品を開発する際には注意が必要である。OATP1B1は広範な基質認識性を有していることが知られている。本特性は生体にとって異物である薬物を体外へ効率よく排泄する上で合理的であるが、一方で複数の薬物を併用した際にOATP1B1の分子上で異なる薬物同士が競合し得るため、DDIを引き起こす原因となっている。臨床において、OATP1B1基質薬の血中濃度が、cyclosporin A (CsA) や rifampin (RIF) などのOATP阻害剤と併用した場合に上昇することが報告されている<sup>45, 21-23</sup>。例えばpravastatinのarea under the curve (AUC)は、CsAおよび単回投与のRIFによりそれぞれ9.9 – 23倍、2.6 – 4.6倍上昇する<sup>24</sup>。薬物に加え、内因性基質であるビリルビンとその

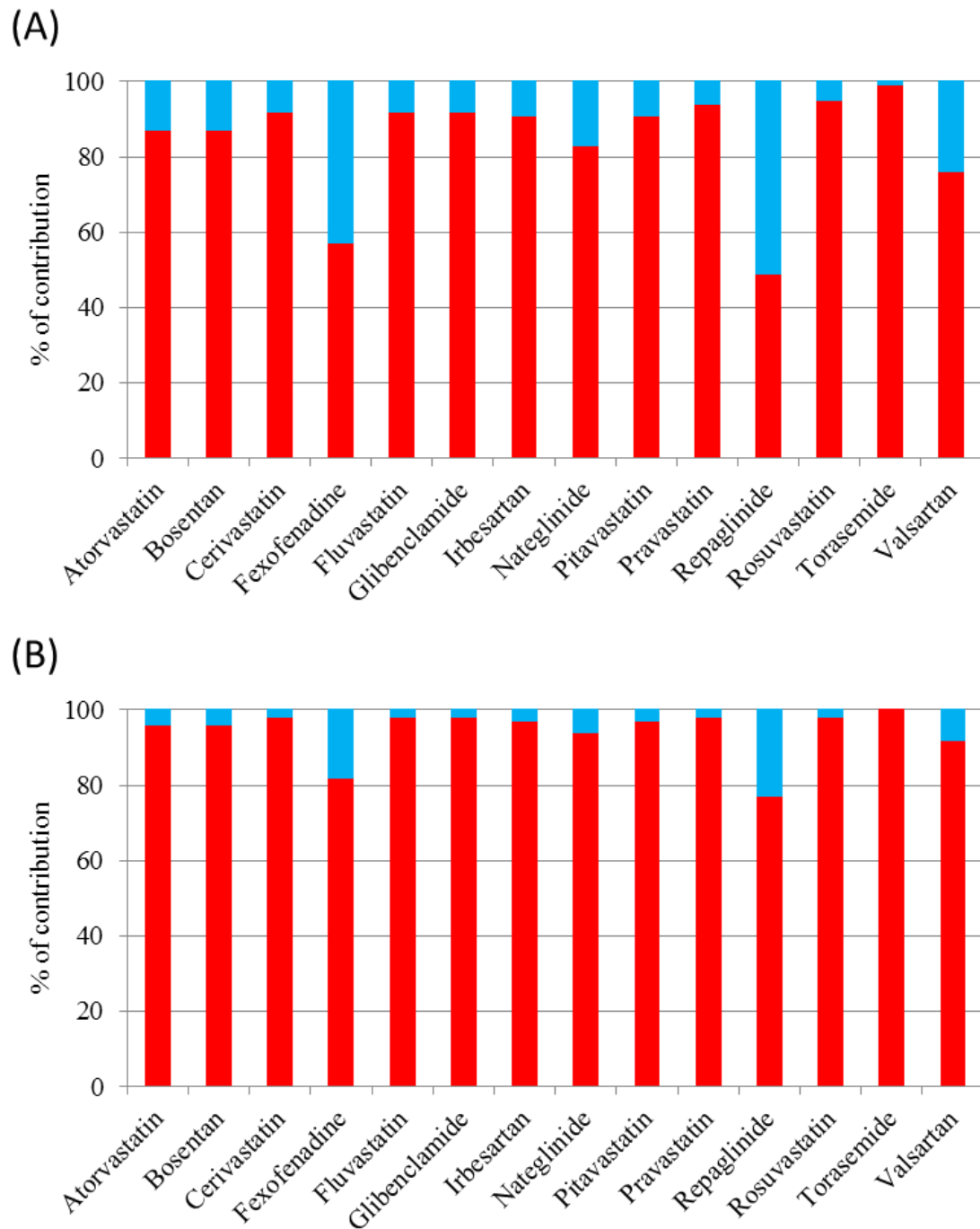
グルクロン酸抱合代謝物も併用薬による OATP 阻害により血中濃度が高くなることが報告されている<sup>25-26</sup>。このように、OATP1B1 阻害に起因する DDI は臨床安全性上の問題につながり得ることから、European Medicines Agency (EMA)、Food and Drug Administration (FDA)、および厚生労働省 (Ministry and Health, Labour and Welfare; MHLW) から近年発出された DDI (ドラフト) ガイドライン・ガイダンス<sup>27-29</sup>において、医薬品候補化合物が OATP1B1 に対して阻害作用を有するか否かを *in vitro* 試験で検討すること、さらに阻害作用を有する場合には OATP1B1 を介した DDI リスクを臨床 DDI 試験で適切に評価することが推奨されている。

**Table 1.** OATP ファミリートランスポーターの代表的な基質薬

高脂血症治療薬	Atorvastatin Cerivastatin Ezetimib	Fluvastatin Pitavastatin Pravastatin	Simvastatin Rosuvastatin
高血圧治療薬	Atrasentan Bosentan	Losartan Olmesartan	Valsartan
糖尿病治療薬	Glibenclamide Nateglinide	Repaglinide Pioglitazone	Rosiglitazone
抗菌剤	Benzylpenicillin Caspofungin	Rifampin Mycophenolic acid	
抗癌剤	SN-38	Methotrexate	
抗 HIV 薬	Lopinavir	Ritonavir	Saquinavir
利尿薬	Torsemide		
抗アレルギー薬	Fexofenadine		



**Figure 2.** Chemical structures of representative OATP substrate drugs. (A) atorvastatin, (B) cerivastatin, (C) ezetimib, (D) fluvastatin, (E) pitavastatin, (F) pravastatin, (G) simvastatin, (H) rosuvastatin, (I) atrasentan, (J) bosentan, (K) losartan, (L) olmesartan, (M) valsartan, (N) glibenclamide, (O) nateglinide, (P) repaglinide, (Q) pioglitazone, (R) rosiglitazone, (S) benzylpenicillin, (T) caspofungin, (U) rifampin, (V) mycophenolic acid, (W) SN-38, (X) methotrexate, (Y) lopinavir, (Z) ritonavir, (AA) saquinavir, (AB) torasemide, and (AC) fexofenadine.

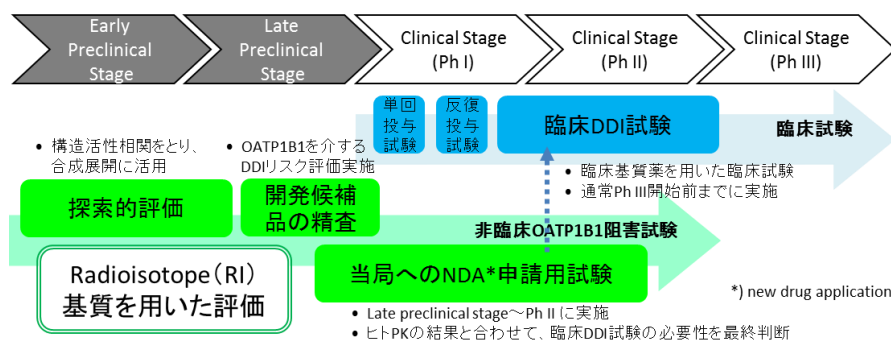


**Figure 3.** Contribution of OATP1B1 (red) and OATP1B3 (blue) to the hepatic uptake of OATP substrate drugs in 2 batches of human cryopreserved hepatocytes (A, lot VRR; B, lot OJE) estimated by RAF method. E<sub>1</sub>S and cholecystokinin octapeptide (CCK-8) were used as specific substrates for OATP1B1 and OATP1B3, respectively.

### 第三節 OATP1B1 阻害リスク評価

医薬品開発において、医薬品候補化合物が臨床にて相互作用を受ける可能性、および相互作用を与える可能性を検証することは極めて重要である。製薬会社では cytochrome P450 (CYP) などの代謝酵素や OATP1B1 などのトランスポーターを介する DDI リスク評価のため、代謝酵素やトランスポーターの強制発現系またはヒト組織を用いた *in vitro* 試験を行い、必要に応じて臨床 DDI 試験を実施する。

合成化合物の OATP1B1 に対する阻害作用は、創薬のステージに応じて段階的に評価される (Figure 4)。創薬初期段階では多検体を対象としたスクリーニング評価が実施され、多くの場合単一濃度における阻害強度をもとに構造活性相関を取得し、合成展開に活用する。その後、絞り込まれた医薬品候補化合物の阻害活性を精査することとなるが、ここでは複数の化合物濃度を評価することで OATP1B1 に対する定量的な阻害能パラメータ (inhibition constant ( $K_i$ ) または half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )) を算出し、非臨床データから各化合物の DDI リスクを予備的に評価する。さらに、臨床導入前後より当局申請を目的とした *in vitro* 試験が実施され、より確度の高い  $K_i$  値あるいは  $IC_{50}$  値を取得するとともに、臨床試験で得られたヒト pharmacokinetic (PK) データと併せて本化合物の DDI リスクが最終判断され、リスクを排除できない場合には臨床 DDI 試験により OATP1B1 に対する阻害作用を確認することとなる。



**Figure 4.** Schematic flow of evaluation of OATP1B1 inhibition potency during drug discovery and development.

臨床 DDI 試験の必要性は、規制当局により定められた決定樹に従って判断される。一例として、厚生労働省より発出された「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」<sup>29</sup>に記載されている、被験薬が OATP1B1 (及び OATP1B3) の阻害薬になる可能性を検討するための決定樹を Figure 5 に示した。

OATP1B1 を介する DDI リスク評価はまず static model に従って実施され、以下の式より被験薬の R 値を算出する。

$$R = 1 + \frac{[I]_{u,inlet,max}}{K_i}$$

$[I]_{u,inlet,max}$  は、被験薬の門脈血液中における推定最大非結合形濃度を示す。R 値がカットオフ値 (1.25, 厚生労働省及び FDA ; 1.04, EMA) 以上の場合、被験薬の OATP1B1 阻害による DDI リスクを排除できないため、臨床 DDI 試験の実施を考慮する必要がある。本方法は、簡便さを優先し、被験薬の  $[I]_{u,inlet,max}$  が常に維持されているという仮定の下で行うリスク評価であるため<sup>30-31</sup>、DDI リスクを過大評価する傾向があるが、false-negative prediction を回避する上で有効である<sup>24</sup>。本手法は、必要とされるパラメータの数が限られており簡便であるため、医薬品開発早期から適用可能である。

Static model より算出された R 値がカットオフ値を超えた場合、臨床 DDI 試験を実施する、あるいは生理学的薬物動態速度論 (physiologically-based pharmacokinetic, PBPK) モデルなどに代表される dynamic model を用いた、より高次のリスク評価が必要となる。本 PBPK モデルにより、阻害薬および基質薬の血中濃度推移を考慮したより定量的な DDI リスク評価が可能となるが<sup>32-33</sup>、信頼性の高いヒト PK モデルの樹立には非臨床データに加え、臨床ヒト PK データも必要となるため、臨床開発中期から後期に活用されることが多い。

いずれの評価法においても、医薬候補化合物の OATP1B1 に対する  $K_i$  値または  $IC_{50}$  値は必須パラメータとなっている。即ち、DDI リスクの適正評価を成し遂げる上で、信頼性の高い  $K_i$  値または  $IC_{50}$  値を *in vitro* 試験から算出することが必要不可欠である。

図 6-5: 被験薬が OATP1B1 及び OATP1B3 の *in vivo* 阻害薬となる可能性の検討



- a) ヒト肝細胞を用いる場合は、典型基質(表6-5)の有意な取り込みが認められ、かつ典型阻害薬(表6-5)により、阻害薬の添加濃度と  $K_i$  値より理論的に見積られる程度、有意に阻害されることを確認する。OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞株を用いる場合は、典型基質(表6-5)の発現系細胞への取り込みが、コントロール細胞の2倍以上で、典型阻害薬(表6-5)により、阻害薬の添加濃度と  $K_i$  値より理論的に見積られる程度、有意に阻害されることを確認する。 $IC_{50}$  値を求める際の典型基質および推奨濃度は、表6-5を参照のうえ、十分に  $K_i$  値より低い濃度を用いること。阻害試験に用いる被験薬の濃度範囲の設定は、OATP1B1 及び OATP1B3 に曝露される被験薬の臨床濃度(門脈血液中濃度)を考慮して設定すること。
- b)  $R$  値 =  $1 + (f_u \times I_{inlet,max} / K_i)$ 。式中、 $I_{inlet,max}$  は門脈血液中での推定最大阻害薬濃度であり、 $C_{max} + (k_a \times 用量 \times F_g F_g / Q_h)$  として計算される。 $C_{max}$  は阻害薬の最高血中濃度、用量は阻害薬の投与量、 $F_g F_g$  は投与した阻害薬の消化管アベイラビリティ、 $k_a$  は阻害薬の吸収速度定数、 $Q_h$  は肝血流速度である(例: 97 L/hr)。  $F_g F_g$  値および  $k_a$  値が不明の場合は、理論的な最高値を使用することで偽陰性の予測が避けられるため、 $F_g F_g$  および  $k_a$  にそれぞれ1および  $0.1 \text{ min}^{-1}$  を使用する<sup>30)</sup>。  $f_u$  値が0.01未満か、または蛋白結合率が高いため  $f_u$  値が正確に測定できない薬物については、偽陰性な予測を避けるため、 $f_u = 0.01$  と仮定して計算する。

Figure 5. Decision tree for evaluating an investigational drug as an inhibitor of OATP1B1 and OATP1B3 proposed by Ministry of Health, Labour and Welfare.

#### 第四節 in vitro OATP1B1 阻害評価系の課題

In vitro OATP1B1 阻害試験では、Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) 細胞などの哺乳類動物由来細胞に OATP1B1 を安定的に発現させた OATP1B1 強制発現細胞が一般に使用されている。ヒト肝細胞を用いた評価も可能ではあるが、ヒト肝細胞には OATP1B1 以外のトランスポーターも発現していること、トランスポーター活性のロット間差が大きいこと、さらに価格が高く阻害評価に適したロットを大量に確保することが難しいことなどの問題点があり、創薬において OATP1B1 の阻害スクリーニングを目的として使用することは困難である。その他、OATP1B1 を一過的に強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞 (*Xenopus laevis* oocyte) を用いる手法もあるが、用時調製の必要があり多検体評価には不向きである。よって、データの再現性、スループット性、およびコストの観点で、哺乳類動物由来細胞を宿主とした OATP1B1 強制発現系は優位性があり、創薬の現場で広く使用されている。

被験化合物の DDI リスクの適正評価を成し遂げる上で、信頼性の高い  $K_i$  値あるいは  $IC_{50}$  値の取得は極めて重要であり、これらの値は OATP1B1 を介したプローブ基質の細胞への取り込みに対する化合物の阻害作用に基づいて算出している。この実験系は極めてシンプルであるが、以下に示す大きな課題を二つ有している。

一つ目の課題は、OATP1B1 が基質依存的な阻害を示すことである。Gemfibrozil (GEM) は OATP1B1 阻害薬の一つであるが、その in vitro 阻害活性が、用いる基質によって大きく異なることが報告されていた<sup>34</sup>。本結果は、OATP1B1 阻害試験結果が選択した基質に依存して大きく異なることを示唆するものであり、特に被験薬の阻害活性を弱く見積もり DDI リスクを見逃した場合には、臨床安全性上の問題につながる恐れがある。しかし、本現象が GEM と特定の基質間のみで観察されるものであるかについては明らかとなっていなかった。また、DDI リスクの false negative 予測を回避する上



で、OATP1B1 に対する阻害活性を鋭敏に検出できる基質を *in vitro* 阻害試験で使用する  
ことが望ましいが、どの OATP1B1 基質がそのような資質を有するか不明であった。

二つ目の課題は OATP1B1 阻害試験のスループット性が低いことである。従来の  
阻害試験系では、 $^3\text{H}$  や  $^{14}\text{C}$  などの放射性同位体 (radioisotope, RI) で標識した基質を  
使用する手法が主流であったが、サンプル処理や測定に時間と労力を要していた。特  
に、創薬初期段階では多検体スクリーニング評価を実施し、取得した情報を速やかに  
合成展開に活用することが求められるため、大きな問題となっていた。

そこで、OATP1B1 を介する DDI リスクの低いより安全な医薬品の創出に貢献  
するため、本研究では、前述の二つの課題を解決することに取り組んだ。実際には、  
① 臨床基質薬を用い、OATP1B1 の基質依存的な阻害について網羅的に検討し、②  
OATP1B1 阻害活性を鋭敏に検出し、DDI リスクを過小評価しない理想的な RI プロー  
ブ基質を選出し、さらに、③ RI 基質と等価な蛍光基質を見出し、安価かつスループッ  
ト性に優れた蛍光阻害評価系を構築した。

## 第二章

# 臨床基質薬を用いた 基質依存的な阻害の検証

## 第二章 臨床基質薬を用いた基質依存的な阻害の検証

### 第一節 基質依存的な阻害

薬物代謝酵素あるいはトランスポーターに対する阻害活性を評価する *in vitro* 試験では、使用するプローブ基質の種類によって得られる  $K_i$  (または  $IC_{50}$ ) 値が大きく異なること、即ち基質依存的な阻害作用が報告されている。これは薬物代謝酵素あるい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ことに起因すると考えられており、基質依存的な阻害を示す代表例として CYP3A が挙げられる<sup>35-36</sup>。厚生労働省から発出された「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案）」<sup>29</sup>においても、CYP3A の阻害作用は midazolam や testosterone などの基質結合部位の異なる複数の基質を用いて評価し、最も小さい  $K_i$  値を用いて DDI リスクを保守的に評価することが推奨されている。CYP3A4 の他、CYP2C9 でも同様の現象が報告されているが<sup>37</sup>、現状複数の基質を用いて阻害作用を評価することは求められていない。一方、SLC トランスポーターについては、2007 年の Noé らによる OATP1B1 に関する報告を端緒として<sup>34</sup>、OATP1B3<sup>38-40</sup>、OATP2B1<sup>41</sup>、OCT2<sup>42-43</sup>、MATE1、および MATE2-K<sup>44</sup> などについても基質依存的な阻害が報告されており、昨今この話題はトランスポーター研究者の関心を集めるものとなっている。

Noé らは、OATP1B1 に対する GEM の阻害活性を 6 つの異なる基質を用いて検討し、TCA, fluvastatin, pitavastatin, および simvastatin を基質とした場合には GEM による濃度依存的な阻害作用が検出されるが、E1S および troglitazone-sulfate を用いた場合には GEM の阻害活性を検出できないことを報告した<sup>34</sup>。本結果は、OATP1B1 阻害能が使用する基質によって大きく異なることを示唆するものであり、特に阻害活性を弱く見積もった場合には、医薬品候補化合物が OATP1B1 を阻害するリスクを見逃し、

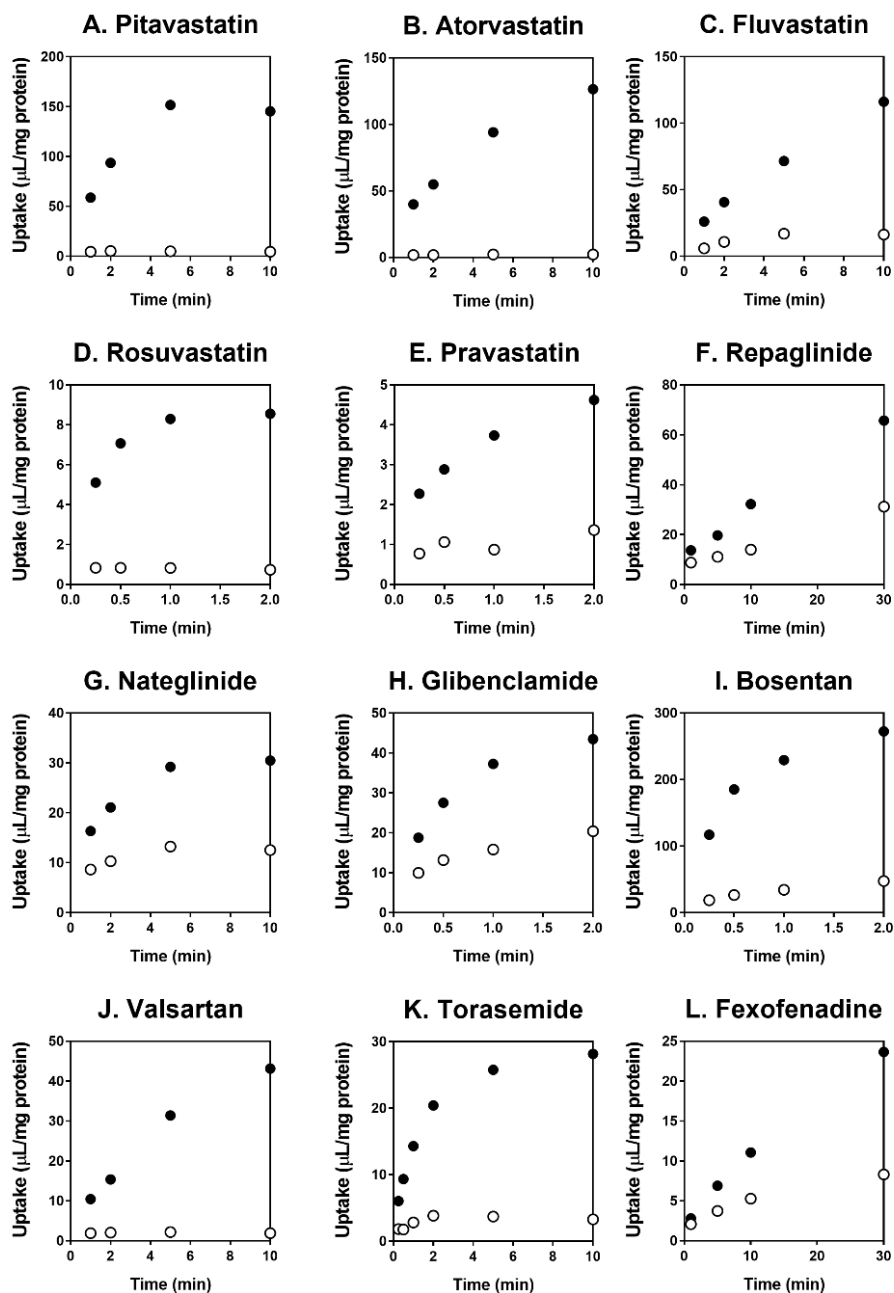
臨床で予期せぬ DDI を引き起こす恐れがある。しかし、OATP1B1 の基質依存的な阻害は GEM とこれら 6 つの基質の組み合わせに限られた現象であるのか、それ以外の基質・阻害剤の組み合わせでも生じ得るのかについては十分な検討がされていなかった。そこで本章では、臨床で OATP ファミリートランスポーターを阻害することが知られる CsA, RIF, GEM, および gemfibrozil-*O*- $\beta$ -glucuronide (GEM-glu) の OATP1B1 に対する阻害活性を、12 種類の基質薬を用いて検討し、OATP1B1 の基質依存的な阻害について網羅的に検証した。

## 第二節 臨床基質薬の OATP1B1 を介した輸送の速度論的パラメータ

OATP1B1 の基質依存的な阻害の検討に用いる基質薬として、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (pitavastatin, atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pravastatin), 高血圧治療薬 (bosentan, valsartan), 糖尿病治療薬 (repaglinide, nateglinide, glibenclamide), 利尿薬 (torasemide), 抗アレルギー薬 (fexofenadine) を選出し、これら 12 化合物の OATP1B1 強制発現細胞および control 細胞への経時的な取り込みを検討した (Figure 6)。細胞に取り込まれた基質薬は液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計で定量した。いずれの化合物も control 細胞に比べ OATP1B1 強制発現細胞で高い取り込みを示し、OATP1B1 の基質であることが確認された。以降の検討では、各基質の取り込みの初速度を反映している 0.5 分 (rosuvastatin, pravastatin, glibenclamide, bosentan, torasemide), 1 分 (atorvastatin), 2 分 (pitavastatin, nateglinide), 5 分 (fluvastatin, repaglinide, valsartan), あるいは 10 分 (fexofenadine) を取り込み反応時間として設定した。

続いて、各基質の OATP1B1 を介した濃度依存的な取り込みを検討し、速度論的パラメータを算出した (Table 2 および Figure 7)。これらの 12 基質薬は一つの飽和性コンポーネント、もしくは飽和性と非飽和性の二つのコンポーネントからなる取り込

みを示し、非飽和性コンポーネントの寄与は小さかった。得られた Michaelis constant ( $K_m$ ) 値は 0.761  $\mu\text{M}$  (atorvastatin) から 61.6  $\mu\text{M}$  (fexofenadine) であった。Repaglinide, nateglinide, glibenclamide, および fexofenadine の  $K_m$  値は本研究により初めて報告され、それ以外の基質薬については bosentan を除き文献報告値と概ね同等の  $K_m$  値であった。Bosentan の  $K_m$  値は、著者らの値の他 1 つしか報告されておらず、またその際用いられている OATP1B1 発現細胞の輸送活性値が大きく異なっている。得られた Bosentan の  $K_m$  値の妥当性については、今後さらなる情報の蓄積を待つて判断する必要がある。



**Figure 6.** Time profiles of the uptake of clinically used OATP1B1 substrate drugs in OATP1B1-expressing cells and the control cells.

Uptake of (A) pitavastatin (0.1  $\mu\text{M}$ ), (B) atorvastatin (0.1  $\mu\text{M}$ ), (C) fluvastatin (1  $\mu\text{M}$ ), (D) rosuvastatin (1  $\mu\text{M}$ ), (E) pravastatin (10  $\mu\text{M}$ ), (F) repaglinide (0.1  $\mu\text{M}$ ), (G) nateglinide (1  $\mu\text{M}$ ), (H) glibenclamide (0.1  $\mu\text{M}$ ), (I) bosentan (0.1  $\mu\text{M}$ ), (J) valsartan (1  $\mu\text{M}$ ), (K) torasemide (1  $\mu\text{M}$ ), and (L) fexofenadine (1  $\mu\text{M}$ ) in OATP1B1-expressing cells (closed circles) and the control cells (open circles) was examined over a period of 2 (rosuvastatin, pravastatin, glibenclamide, and bosentan), 10 (pitavastatin, atorvastatin, fluvastatin, nateglinide, valsartan, and torasemide), or 30 min (repaglinide and fexofenadine) at 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  SD. (n = 3).

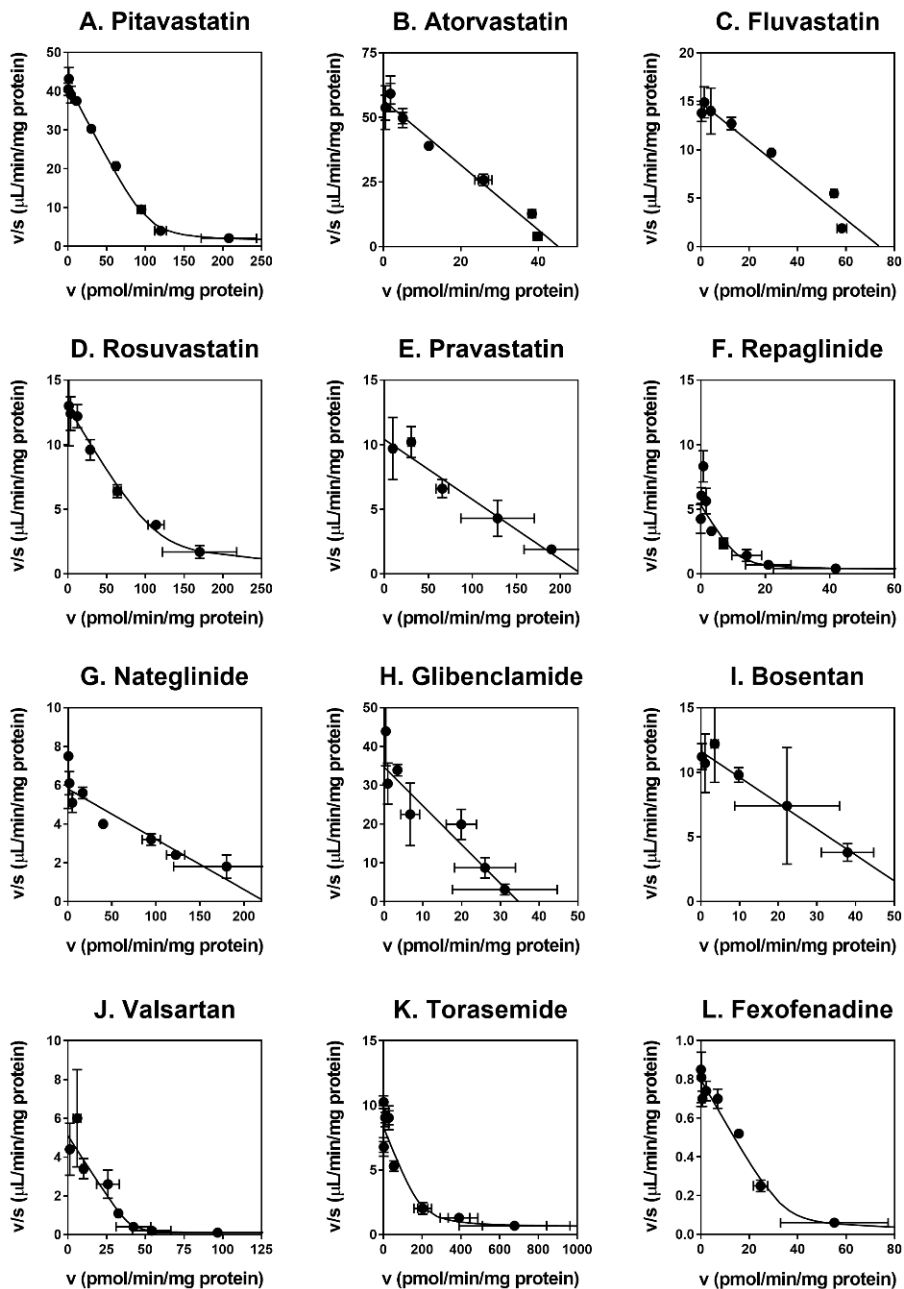
**Table 2.** Saturation kinetics of OATP1B1-mediated uptake of clinically used OATP1B1 substrate drugs

Kinetic parameters were estimated by nonlinear least-squares regression analysis based on Eqs. 1 or 2 as described under Experimental Section and Methods, and are shown as mean of two independent experiments or mean  $\pm$  SD. (n = 3 or 4).

Substrates	$K_m$ $\mu\text{M}$	$V_{\text{max}}$ pmol/min/mg protein	$P_{\text{dif}}$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein	Reported $K_m$ values $\mu\text{M}$
Pitavastatin	$2.48 \pm 0.07$	$114 \pm 15$	$0.632 \pm 0.354$	$1.3^{31}$ , $3.0^9$ , $4.8^{45}$
Atorvastatin	$0.761 \pm 0.056$	$42.2 \pm 12.0$	NA	$0.62^{31}$ , $0.77^{46}$ , $0.93^{47}$ , $12^{48}$ , $19^{49}$
Fluvastatin <sup>a</sup>	4.80 (4.98, 4.63)	87.6 (74.0, 101)	NA	$2.5^{34}$ , $12^{31}$
Rosuvastatin <sup>a</sup>	9.31 (9.15, 9.48)	103 (90.6, 116)	0.624 (0.588, 0.660)	$0.80^{11}$ , $4.0^{50}$ , $9.0^{31}$ , $13^{51}$ , $15^{44}$
Pravastatin	$27.0 \pm 8.1$	$187 \pm 32$	NA	$29^{31}$ , $35^{52}$ , $86^{48}$
Repaglinide	$1.36 \pm 0.69$	$7.04 \pm 3.27$	$0.412 \pm 0.183$	-
Nateglinide	$36.4 \pm 1.9$	$174 \pm 53$	NA	-
Glibenclamide	$1.24 \pm 0.76$	$38.1 \pm 11.6$	$0.507 \pm 1.013$	-
Bosentan <sup>a</sup>	4.27 (4.98, 3.55)	56.1 (57.9, 54.4)	NA	$44^{53}$
Valsartan <sup>a</sup>	7.48 (6.99, 7.96)	42.3 (44.5, 40.2)	0.0545 (0.0541, 0.0550)	$1.4^{12}$ , $18^{54}$
Torasemide	$20.9 \pm 4.4$	$154 \pm 38$	$0.908 \pm 0.329$	$6.2^{55}$
Fexofenadine	$61.6 \pm 20.4$	$41.0 \pm 5.6$	$0.0199 \pm 0.0190$	-

-, not reported; NA, not applicable.

<sup>a</sup>Kinetic parameters are presented as mean with individual values in parenthesis from 2 independent experiments.



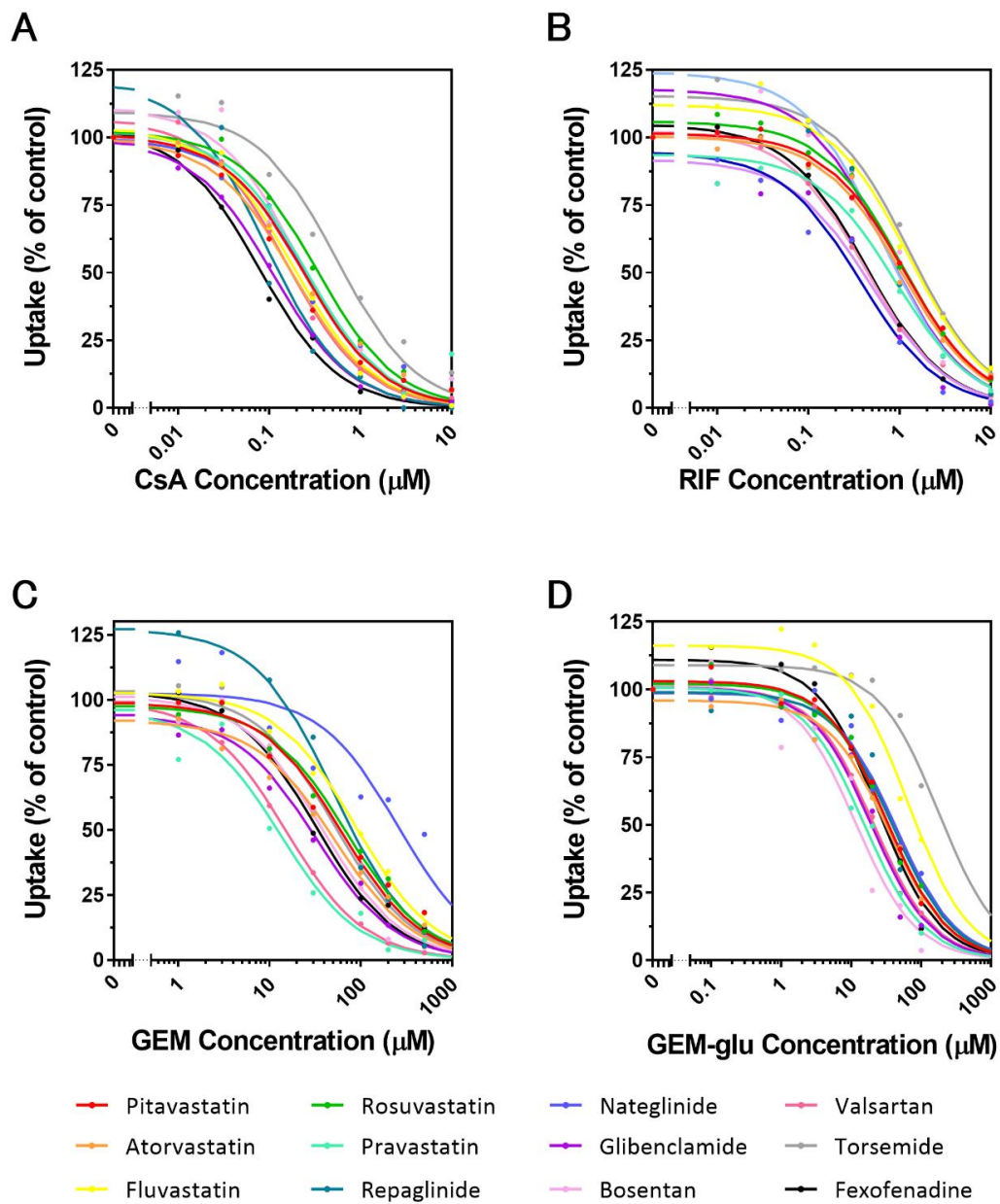
**Figure 7.** Concentration dependence of the OATP1B1-mediated uptake of (A) pitavastatin (0.01–100  $\mu$ M), (B) atorvastatin (0.01–10  $\mu$ M), (C) fluvastatin (0.03–30  $\mu$ M), (D) rosuvastatin (0.1–100  $\mu$ M), (E) pravastatin (1–100  $\mu$ M), (F) repaglinide (0.01–100  $\mu$ M), (G) nateglinide (0.1–100  $\mu$ M), (H) glibenclamide (0.01–10  $\mu$ M), (I) bosentan (0.03–10  $\mu$ M), (J) valsartan (0.3–1000  $\mu$ M), (K) torasemide (0.1–100  $\mu$ M), and (L) fexofenadine (0.1–1000  $\mu$ M). The uptake was determined for 0.5 (rosuvastatin, pravastatin, glibenclamide, bosentan, and torasemide), 1 (atorvastatin), 2 (pitavastatin and nateglinide), 5 (fluvastatin, repaglinide, and valsartan), or 10 min (fexofenadine) at 37°C. Representative data from two to four independent experiments are shown as Eadie-Hofstee plots, and each point represents the mean  $\pm$  SD. ( $n = 3$ ). Fitted lines that were obtained by a nonlinear least-squares regression analysis based on Eqs. 1 or 2 are presented as solid lines.



### 第三節 CsA, RIF, GEM, および GEM-glu の OATP1B1 に対する阻害活性

CsA, RIF, および GEM は臨床用量で OATP1B1 を阻害し, OATP1B1 基質薬の血中濃度上昇を伴う DDI を引き起こすことが知られている<sup>4, 13, 24</sup>. 本節では OATP1B1 の基質依存的阻害を網羅的に検証する目的で, これら 3 化合物の OATP1B1 に対する *in vitro* 阻害活性を, 先の 12 種の臨床基質薬を用いて検討した (Figure 8 および Table 3). また, GEM の OATP1B1 阻害による臨床 DDI では, 代謝物である GEM-glu も本 DDI に寄与すると考えられていることから<sup>56</sup>, 本代謝物についても OATP1B1 阻害活性を検討した. なお, 12 種の臨床基質薬の濃度については, 前節で得られた  $K_m$  値よりも低く, かつ液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計で十分に検出可能な 0.1  $\mu\text{M}$  (pitavastatin, atorvastatin, repatlinide, glibenclamide, bosentan), 1  $\mu\text{M}$  (fluvastatin, rosuvastatin, nateglinide, valsartan, torasemide, fexofenadine), もしくは 10  $\mu\text{M}$  (pravastatin) に設定した. 化合物によっては  $K_m$  値に対して十分に低い基質濃度を設定できなかったため, 阻害試験から得られた  $\text{IC}_{50}$  値は競合阻害を仮定して  $K_i$  値に変換した.

CsA, RIF, GEM, および GEM-glu はいずれの基質を用いた場合も OATP1B1 を濃度依存的に阻害し (Figure 8), その  $K_i$  値はそれぞれ 0.0771 – 0.486  $\mu\text{M}$ , 0.358 – 1.23  $\mu\text{M}$ , 9.65 – 252  $\mu\text{M}$ , および 11.1 – 170  $\mu\text{M}$  であった (Table 3). CsA, RIF, GEM, および GEM-glu の OATP1B1 に対する  $K_i$  値は, 基質によってそれぞれ 6.3, 3.4, 26, および 15 倍の差を生じた. 本結果より, GEM 以外の阻害薬も OATP1B1 に対して基質依存的な阻害を示すこと, さらに  $K_i$  値が基質によって数十倍程度も異なり得ることが確認された. したがって, CYP3A と同様に<sup>57-58</sup>, OATP1B1 についても *in vitro* 阻害評価を行う際にはプローブ基質の選択に留意する必要があると言える.



**Figure 8.** Inhibitory effects of CsA (A), RIF (B), GEM (C), and GEM-glu (D) on OATP1B1-mediated uptake of 12 clinically-used OATP1B1 substrate drugs.

**Table 3.**  $K_i$  values of CsA, RIF, GEM, and GEM-glu for OATP1B1-mediated uptake of 12 clinically-used OATP1B1 substrate drugs

OATP1B1-mediated uptake of 12 clinically-used OATP1B1 substrate drugs was examined in the presence and absence of CsA, RIF, GEM or GEM-glu as shown in Figure 8. The  $IC_{50}$  values were estimated by a nonlinear least-squares regression analysis. The  $K_i$  values (parameter estimate  $\pm$  parameter SD.) were estimated using substrate concentrations,  $K_m$ , and  $IC_{50}$  values by Eq. 5 ( $n = 6$  or  $9$ ).

Substrates	Inhibitors			
	CsA	RIF	GEM	GEM-glu
	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )			
Pitavastatin	0.228 $\pm$ 0.027	1.07 $\pm$ 0.08	58.8 $\pm$ 10.7	31.0 $\pm$ 3.3
Atorvastatin	0.160 $\pm$ 0.016	0.922 $\pm$ 0.122	46.0 $\pm$ 8.9	30.2 $\pm$ 3.3
Fluvastatin	0.157 $\pm$ 0.016	1.05 $\pm$ 0.19	72.7 $\pm$ 8.7	53.6 $\pm$ 11.5
Rosuvastatin	0.301 $\pm$ 0.031	0.952 $\pm$ 0.098	63.6 $\pm$ 8.4	29.5 $\pm$ 3.8
Pravastatin	0.184 $\pm$ 0.046	0.653 $\pm$ 0.117	9.65 $\pm$ 2.79	11.1 $\pm$ 1.2
Repaglinide	0.0857 $\pm$ 0.0330	0.598 $\pm$ 0.198	48.3 $\pm$ 18.6	36.7 $\pm$ 8.8
Nateglinide	0.244 $\pm$ 0.038	0.358 $\pm$ 0.079	252 $\pm$ 100	42.0 $\pm$ 6.9
Glibenclamide	0.102 $\pm$ 0.005	0.442 $\pm$ 0.102	29.6 $\pm$ 5.2	17.8 $\pm$ 3.6
Bosentan	0.206 $\pm$ 0.056	0.694 $\pm$ 0.211	36.6 $\pm$ 5.8	11.2 $\pm$ 3.3
Valsartan	0.138 $\pm$ 0.017	0.377 $\pm$ 0.022	13.4 $\pm$ 0.3	18.4 $\pm$ 1.7
Torasemide	0.486 $\pm$ 0.112	1.23 $\pm$ 0.30	49.5 $\pm$ 10.8	170 $\pm$ 44
Fexofenadine	0.0771 $\pm$ 0.0100	0.423 $\pm$ 0.032	31.4 $\pm$ 4.3	23.9 $\pm$ 4.1

## 第三章

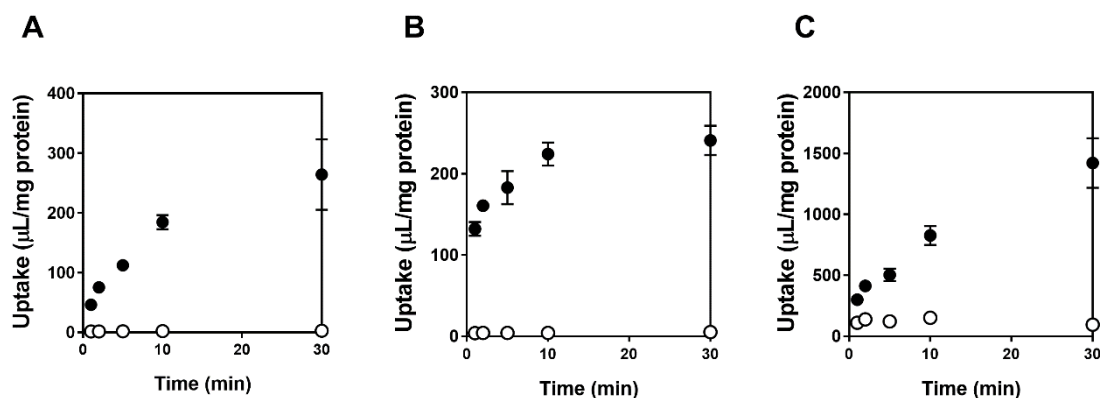
# OATP1B1 阻害評価に適した RI 標識 基質の選定

## 第三章 OATP1B1 阻害評価に適した RI 標識基質の探索

### 第一節 RI プローブ基質を用いた阻害試験

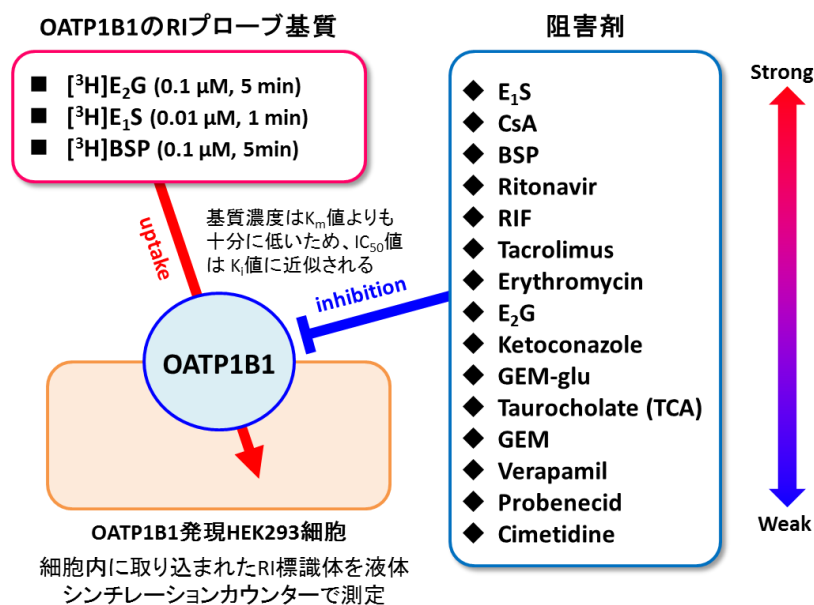
第二章での臨床基質薬を用いた OATP1B1 阻害試験では，細胞内に取り込まれた OATP1B1 基質薬の量を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計で定量した．本手法は，被験薬の OATP1B1 に対する阻害活性を実際の臨床基質薬を用いて評価できる点で魅力的であるが，化合物によっては検出感度が問題となる場合もある．また，確度の高いデータを取得するためには事前に分析系のバリデーションが必要である．一方，RI 標識基質を用いた OATP1B1 阻害試験 (RI 法) では，基質の高感度な検出が可能であり，かつ定量も容易であることから，創薬の探索段階から当局申請を企図した試験まで幅広く運用されている．そこで第三章では，RI 基質に焦点を当て OATP1B1 の基質依存的な阻害を検討するとともに，OATP1B1 に対する阻害活性を鋭敏に検出できる RI 基質の探索を試みた．

OATP1B1 の RI 基質として， $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ ， $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ ，および $[^3\text{H}]\text{sulfobromophthalein}$  (BSP) に着目した<sup>9,59-61</sup>．いずれも高い輸送活性を有する良好な OATP1B1 基質であり，*in vitro* 阻害試験において典型的プローブ基質として古くから使用されている．実験条件設定のため，これら 3 基質の OATP1B1 発現細胞および control 細胞に対する取り込み時間推移を 30 分に渡り検討した結果，いずれも control 細胞に比べ OATP1B1 発現細胞で顕著に高い取り込みを示した (Figure 9)． $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  および $[^3\text{H}]\text{BSP}$  は，取り込み開始後 10 分以上に渡り初速度が保たれていたことから，以降の試験では取り込み反応時間を 5 分に設定した．一方， $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  は取り込み開始直後に定常状態に達したため，実験的に実施可能な 1 分に設定した．



**Figure 9.** Time profiles of the uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (A), [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (B), and [<sup>3</sup>H]BSP (C) by OATP1B1-transfected cells and control cells. Uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (0.1 μM), [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (0.01 μM), and [<sup>3</sup>H]BSP (0.01 μM) by OATP1B1-transfected cells (closed circles) and the control cells (open circles) was determined over a period of 30 min at 37°C. Each point represents the mean ± SD. (n = 3).

続いて、基質依存的な OATP1B1 阻害作用を検討するため、これら 3 種の RI 基質を用いて、各種阻害剤の OATP1B1 に対する *in vitro* 阻害作用を検討した。阻害活性の強弱を幅広くカバーする 15 化合物 (E<sub>1</sub>S, CsA, BSP, ritonavir, RIF, tacrolimus, erythromycin, E<sub>2</sub>G, ketoconazole, GEM-glu, TCA, GEM, verapamil, probenecid, cimetidine) を阻害剤として使用した。なお、RI 基質濃度 (E<sub>2</sub>G, 0.1 μM ; E<sub>1</sub>S, 0.01 μM ; BSP, 0.01 μM) は、OATP1B1 に対する K<sub>m</sub> 値 (E<sub>2</sub>G, 7.04 μM ; E<sub>1</sub>S, 0.271 μM ; BSP, 0.327 μM) よりも十分に低い濃度に設定し、IC<sub>50</sub> 値が K<sub>i</sub> 値に近似される条件とした (Figure 10)。



**Figure 10.** Study design for substrate-dependent inhibition of OATP1B1 using [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S, and [<sup>3</sup>H]BSP as substrates.

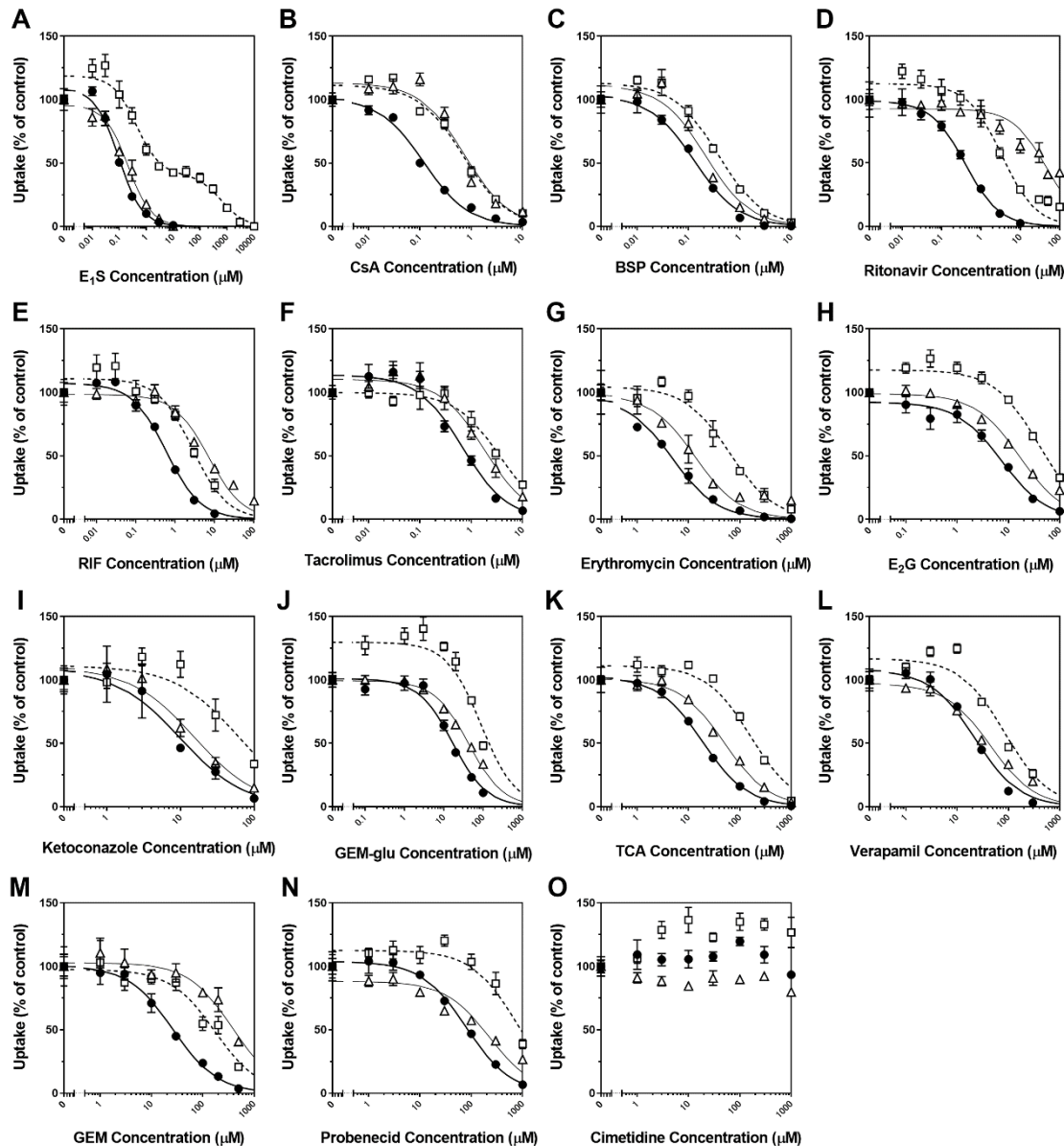
阻害評価結果を Figure 11 および Table 4 に示した。Cimetidine を除く 14 化合物は、各 RI プローブ基質の OATP1B1 を介する取り込みを濃度依存的に阻害した。<sup>3</sup>H]BSP の取り込みに対する E<sub>1</sub>S の阻害作用は二相性を示し、K<sub>i</sub> 値はそれぞれ 0.429 および 611 μM であった。また、E<sub>1</sub>S, CsA, ritonavir, RIF, E<sub>2</sub>G, ketoconazole, GEM-glu, TCA, GEM, verapamil および probenecid は、低濃度域において<sup>3</sup>H]BSP の取り込みを有意に活性化し、cimetidine は 3-1000 μM の濃度範囲において <sup>3</sup>H]BSP の取り込みを有意に活性化した。

OATP1B1 に対する各阻害剤の K<sub>i</sub> 値を基質間で比較した (Figure 12)。<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G と <sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S を用いて得られた K<sub>i</sub> 値を比較すると (Figure 12A), 検討した全ての阻害剤において<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G を基質とした場合の方が K<sub>i</sub> 値が低く、<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S よりも<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G の方が阻害活性を鋭敏に検出できることが明らかとなった。特に、ritonavir, GEM, および RIF の K<sub>i</sub> 値は、<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S を用いるとそれぞれ 117 倍, 14 倍, および 12 倍も高い値を示した。また、CsA についても、<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S を用いると 6 倍高い K<sub>i</sub> 値が得られた。その他の阻害剤で

は3倍以内の差であった。 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と $[^3\text{H}]\text{BSP}$ の比較においても (Figure 12B),  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ を基質として使用した時に全ての阻害剤に対して低い  $K_i$  値が得られ、阻害活性を鋭敏に検出できることが判った。Erythromycin の  $K_i$  値は両基質間で13倍の差が認められたが、このような差は $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ との比較では観察されなかった。また BSP, ritonavir, tacrolimus,  $\text{E}_2\text{G}$ , ketoconazole, TCA, GEM, および probenecid の  $K_i$  値も、 $[^3\text{H}]\text{BSP}$ を基質とした時に $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ よりも5倍以上高い値を示した。以上より、RIプローブ基質においても OATP1B1 の顕著な基質依存的な阻害作用が認められること、さらに3種類の RI プローブ基質のうち、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  は検討した全ての阻害剤に対してその阻害活性を最も鋭敏に検出できることが明らかとなった。

さらに、OATP1B1 に対する CsA, RIF, GEM, および GEM-glu の  $K_i$  値について、RI プローブ基質と第二章で検討した臨床基質薬の結果を比較した (Figure 13)。 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  から得られた CsA, RIF, GEM, および GEM-glu の  $K_i$  値は、OATP 臨床基質薬から得られた  $K_i$  値の下限值と同等 (3倍以内) であった。一方、 $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  および $[^3\text{H}]\text{BSP}$  から得られた CsA, RIF, および GEM の  $K_i$  値は、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  あるいは臨床基質薬から得られた  $K_i$  値よりも大きくなる傾向が認められた。 $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  は OATP1B1 による輸送活性の高さから *in vitro* 阻害試験で RI プローブ基質として使用されることが多いが、DDI リスクを過小評価する恐れがある。以上の結果から、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  は OATP1B1 阻害試験において臨床基質薬の代替基質として使用できるうえ、阻害活性を鋭敏に検出できることから、DDI リスクの過小評価の回避に役立つ RI プローブ基質となることが期待された。





**Figure 11.** Inhibitory effects of 15 compounds on OATP1B1-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]E $_2$ G, [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S, and [ $^3\text{H}$ ]BSP.

Uptake of [ $^3\text{H}$ ]E $_2$ G (0.1  $\mu\text{M}$ , closed circles), [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S (0.01  $\mu\text{M}$ , open triangles), and [ $^3\text{H}$ ]BSP (0.01  $\mu\text{M}$ , open squares) was investigated in the presence and absence of unlabeled E $_1$ S (A), CsA (B), BSP (C), ritonavir (D), RIF (E), tacrolimus (F), erythromycin (G), E $_2$ G (H), ketoconazole (I), GEM-glu (J), TCA (K), verapamil (L), GEM (M), probenecid (N), and cimetidine (O). The data are shown as percent of control as described in Experimental Section. Thick, thin, and dashed lines represent fitted lines for the uptake of [ $^3\text{H}$ ]E $_2$ G, [ $^3\text{H}$ ]E $_1$ S, and [ $^3\text{H}$ ]BSP, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SD. (n = 6).

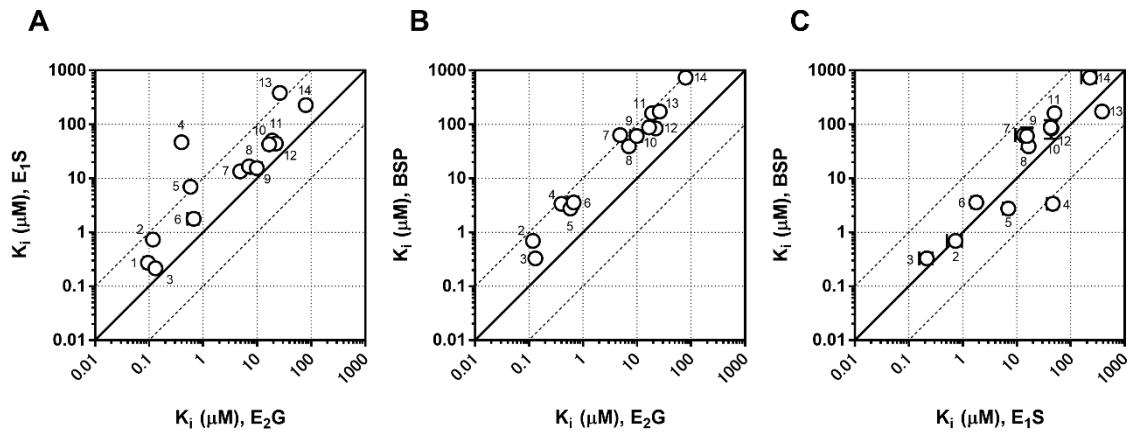
**Table 4.**  $K_i$  values for OATP1B1-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G, [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S, and [ $^3\text{H}$ ]BSP

OATP1B1-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G (0.1  $\mu\text{M}$ , 5 min), [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S (0.01  $\mu\text{M}$ , 1 min), and [ $^3\text{H}$ ]BSP (0.01  $\mu\text{M}$ , 5 min) was examined in the presence and absence of inhibitors as shown in Figure 12.  $K_i$  values were estimated by non-linear regression analysis based on Eqs. 3 or 4 under Experimental Section, and are presented as mean  $\pm$  computer-calculated SD.

Inhibitors	Substrates		
	[ $^3\text{H}$ ]E <sub>2</sub> G	[ $^3\text{H}$ ]E <sub>1</sub> S	[ $^3\text{H}$ ]BSP
	$K_i$ (or $K_m$ ) $\mu\text{M}$		
E <sub>1</sub> S	0.0954 $\pm$ 0.0149	0.271 $\pm$ 0.013 <sup>b</sup>	0.429 $\pm$ 0.175 <sup>a</sup> 611 $\pm$ 387 <sup>a</sup>
CsA	0.118 $\pm$ 0.015	0.732 $\pm$ 0.224	0.694 $\pm$ 0.149
BSP	0.131 $\pm$ 0.010	0.215 $\pm$ 0.058	0.327 $\pm$ 0.033 <sup>b</sup>
Ritonavir	0.397 $\pm$ 0.023	46.4 $\pm$ 9.8	3.38 $\pm$ 0.66
RIF	0.585 $\pm$ 0.074	6.96 $\pm$ 1.31	2.75 $\pm$ 0.62
Tacrolimus	0.668 $\pm$ 0.156	1.78 $\pm$ 0.34	3.57 $\pm$ 0.43
Erythromycin	4.88 $\pm$ 0.65	13.4 $\pm$ 4.0	63.3 $\pm$ 11.5
E <sub>2</sub> G	7.04 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	16.6 $\pm$ 2.4	39.3 $\pm$ 9.0
Ketoconazole	9.90 $\pm$ 2.40	15.4 $\pm$ 3.7	60.9 $\pm$ 26.1
GEM-glu	16.7 $\pm$ 2.6	42.6 $\pm$ 3.1	87.6 $\pm$ 33.0
TCA	19.0 $\pm$ 1.0	50.0 $\pm$ 4.8	161 $\pm$ 35
Verapamil	22.3 $\pm$ 4.2	44.0 $\pm$ 7.3	84.3 $\pm$ 30.1
GEM	26.4 $\pm$ 2.1	381 $\pm$ 60	173 $\pm$ 34
Probenecid	79.4 $\pm$ 5.8	227 $\pm$ 69	740 $\pm$ 181

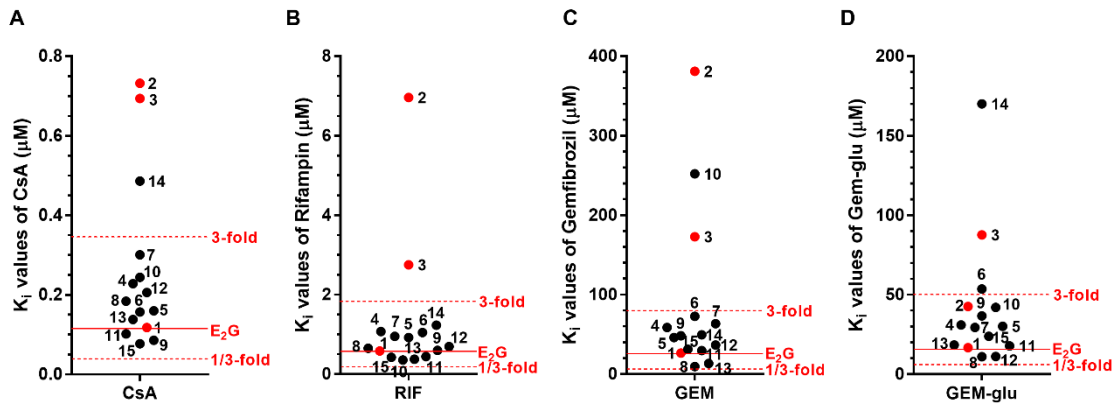
<sup>a</sup>E<sub>1</sub>S showed biphasic inhibition of [ $^3\text{H}$ ]BSP uptake, and the  $K_i$  values for high and low affinity components are presented.

<sup>b</sup> $K_m$  values.



**Figure 12.** Comparison of  $K_i$  values between  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  (A),  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  (B), and  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  and  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  (C).

$K_i$  values are taken from Table 4, and each point represents the mean  $\pm$  SD. The solid line and the dashed lines represent the line of unity and the lines of 1:10 and 10:1 correlations, respectively. 1,  $\text{E}_1\text{S}$ ; 2, CsA; 3, BSP; 4, ritonavir; 5, RIF; 6, tacrolimus; 7, erythromycin; 8,  $\text{E}_2\text{G}$ ; 9, ketoconazole; 10, GEM-glu; 11, TCA; 12, verapamil; 13, GEM; and 14, probenecid.  $K_i$  values of  $\text{E}_1\text{S}$  for  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  uptake were eliminated from panels (B) and (C) because  $\text{E}_1\text{S}$  showed biphasic inhibition for  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  uptake.



**Figure 13.** Comparison of  $K_i$  values of CsA (A), RIF (B), GEM (C), and GEM-glu (D) obtained with  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  (1),  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  (2),  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  (3), pitavastatin (4), atorvastatin (5), fluvastatin (6), rosuvastatin (7), pravastatin (8), repaglinide (9), nateglinide (10), glibenclamide (11), bosentan (12), valsartan (13), torasemide (14), and fexofenadine (15) as substrates.

## 第二節 基質依存的な阻害が DDI リスク評価に与える影響

In vitro で観察された基質依存的な OATP1B1 阻害作用に起因する  $K_i$  値の相違が DDI リスク評価に与える影響を検証するため、CsA, RIF, GEM, および GEM-glu によって引き起こされる DDI リスクを規制当局の (ドラフト) ガイダンス・ガイドラインに従って評価した。第一章第三節に記載した static model に従い、各阻害剤の R 値を  $K_i$  値 (Table 3 および Table 4) と  $[I]_{u,inlet,max}$  (Table 5) から算出し、臨床 DDI 試験の要否判断に使用するカットオフ値 (1.25, 厚生労働省及び FDA ; 1.04, EMA) と比較した。さらに FDA では  $[I]_{u,inlet,max}$  での最終判断の前に、阻害薬の最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) を用いて R 値を算出することが推奨されているため、 $C_{max}$  に基づく R 値も算出し、カットオフ値 (1.1) と比較した。得られた R 値を Table 6 に示した。

CsA は臨床用量で OATP1B1 を阻害し、OATP 基質薬と DDI を引き起こすことが知られており<sup>24</sup>、本研究で用いた OATP1B1 基質薬の AUC は CsA 併用により 2.0 (bosentan) から 23 倍 (pravastatin) 上昇する (Table 6)。また、RIF も臨床用量で OATP1B1 を阻害し<sup>22</sup>、OATP 基質薬の AUC 上昇率は 2.2 (glibenclamide) から 12 倍 (atorvastatin) と報告されている (Table 6)。このことから、CsA および RIF は OATP1B1 の強力な in vivo 阻害薬として認識されている。 $C_{max}$  に基づく CsA および RIF の R 値は、それぞれ 2.95 (torsemide) – 13.3 (fexofenadine), 19.7 (torasemide) – 65.2 (nateglinide) であり、いずれの基質においてもカットオフ値 1.1 以上であった。また、 $[I]_{u,inlet,max}$  に基づく CsA および RIF の R 値も、それぞれ 3.47 (torasemide) – 16.6 (fexofenadine) および 9.13 (torasemide) – 28.9 (nateglinide) であり、カットオフ値 1.25 (厚生労働省および FDA) もしくは 1.04 (EMA) 以上であった。したがって、基質依存的阻害に起因する  $K_i$  値の相違によって R 値も基質間で異なるものの、いずれのケースでもカットオフ値を上回っており、CsA および RIF の DDI リスクを検出することができた。

一方、GEM (および GEM-glu) も臨床用量で OATP1B1 を阻害することが知られているが、GEM 併用による OATP 基質薬の AUC の上昇率は repaglinide を除き 1.1 (fluvastatin) から 2.0 倍 (pravastatin) であり (Table 6) , CsA や RIF に比べて OATP1B1 に対する阻害作用は弱い。Repaglinide の AUC 上昇率が 7.0 から 8.1 倍と他の OATP 基質薬に比べて顕著に高い理由は、repaglinide の代謝を担う CYP2C8 が GEM-glu によって mechanism-based inhibition を受けるためである<sup>56</sup>。C<sub>max</sub> に基づく GEM (および GEM-glu) の R 値はそれぞれ 3.07 (nateglinide) – 17.7 (pravastatin) であり、いずれの基質を用いた場合もカットオフ値 1.1 以上であった。しかし、[I]<sub>u,inlet,max</sub> に基づく GEM (および GEM-glu) の R 値は 1.10 (torasemide) – 1.99 (pravastatin) であり、EMA の定めるカットオフ値 (1.04) 以上であったが、基質によっては R 値が 1.25 (厚生労働省および FDA) に達しないケースが散見された。GEM のように臨床において弱～中程度の OATP1B1 阻害作用を示す阻害剤の場合には、in vitro 評価で用いるプローブ基質の選択ならびに R 値のカットオフ値の設定が臨床 DDI 試験の要否判断に大きく影響し、場合によっては DDI リスクの見逃しにつながり得ることが分かった。

RI プローブ基質のうち、<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G は 3 種類全ての阻害剤の DDI リスクを検出することができた。一方、<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S および<sup>3</sup>H]BSP は GEM (および GEM-glu) による DDI リスクを検出することができなかった。以上の結果から、<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G は基質依存的阻害に起因する DDI リスクの過小評価を回避できる、阻害試験に適した RI プローブ基質であると結論づけた。

**Table 5.** Clinical pharmacokinetic parameters of inhibitors used for the calculation of R-values.

$[I]_{u,inlet,max}$  (estimated maximum unbound inhibitor concentrations at the inlet to the liver) of CsA, RIF, and GEM were calculated by Eq. 9 as described under Experimental Section, in which  $k_a$  of 0.1

$\text{min}^{-1}$ ,  $F_a \times F_g$  of 1, and  $Q_h$  of 97 L/h were used. The blood to plasma concentration ratios of the inhibitors were assumed to be unity in the  $[I]_{u,inlet,max}$  calculations.

Inhibitors	Dose	$f_u$	$C_{max}$	$[I]_{u,inlet,max}$
	(mg)	(%)	( $\mu\text{M}$ )	( $\mu\text{M}$ )
CsA	200 <sup>62</sup>	11 <sup>63</sup>	0.95 <sup>62</sup>	1.2
RIF	600 <sup>24</sup>	15 <sup>64</sup>	23 <sup>22</sup>	10
GEM	600 <sup>24</sup>	0.65 <sup>65,a</sup>	100 <sup>66</sup>	1.6
GEM-glu	-	11.5 <sup>65</sup>	20 <sup>65</sup>	-

<sup>a</sup>As the  $f_u$  was less than 1%, the  $[I]_{u,inlet,max}$  was calculated assuming  $f_u$  of 1% based on the regulatory DDI guidelines or draft guidance materials in FDA, EMA, and MHLW.

**Table 6.** Prediction of OATP1B1-mediated DDIs with a static model

R-values of CsA, RIF, GEM, and GEM-glu were determined using  $K_i$  values obtained from each probe substrate and  $[I]$  ( $C_{\max}$  or  $[I]_{u,inlet,max}$ ) based on Eqs. 7 and 8. The  $K_i$  values were taken from Table 3 and Table 4.

Substrates	Inhibitors							
	CsA				RIF			
	$K_i$	R-value ( $= 1 + [I]/K_i$ ) <sup>a</sup>		Observed AUCR <sup>a</sup>	$K_i$	R-value ( $= 1 + [I]/K_i$ ) <sup>b</sup>		Observed AUCR <sup>b</sup>
( $\mu\text{M}$ )	$[I] = C_{\max}$	$[I] = [I]_{u,inlet,max}$	( $\mu\text{M}$ )		$[I] = C_{\max}$	$[I] = [I]_{u,inlet,max}$		
<i>In vitro prototypical probe substrates</i>								
E <sub>2</sub> G	0.118	9.05 (4.05–13.7)	11.2 (4.81–17.1)	NA	0.585	40.3	18.1	NA
E <sub>1</sub> S	0.732	2.30 (1.49–3.05)	2.64 (1.61–3.60)	NA	6.96	4.30	2.44	NA
BSP	0.694	2.37 (1.52–3.16)	2.73 (1.65–3.74)	NA	2.75	9.36	4.64	NA
<i>Clinically-used substrate drugs</i>								
Pitavastatin	0.228	5.17 (2.58–7.58)	6.26 (2.97–9.33)	4.6 <sup>24</sup>	1.07	22.5	10.3	5.7 <sup>67</sup>
Atorvastatin	0.160	6.94 (3.25–10.4)	8.50 (3.81–12.9)	9.0 <sup>24</sup> , 15 <sup>24</sup>	0.922	25.9	11.8	7.3 <sup>24,d</sup> , 8.5 <sup>24</sup> , 12 <sup>24</sup>
Fluvastatin	0.157	7.05 (3.29–10.6)	8.64 (3.87–13.1)	3.5 <sup>24</sup>	1.05	22.9	10.5	-
Rosuvastatin	0.301	4.16 (2.20–5.98)	4.99 (2.50–7.31)	7.1 <sup>68</sup>	0.952	25.2	11.5	4.4 <sup>67</sup>
Pravastatin	0.184	6.16 (2.96–9.15)	7.52 (3.45–11.3)	12 <sup>24</sup> , 23 <sup>24</sup>	0.653	36.2	16.3	2.6 <sup>24</sup> , 4.6 <sup>24</sup>
Repaglinide	0.0857	12.1 (5.20–18.5)	15.0 (6.25–23.2)	2.4 <sup>24</sup>	0.598	39.5	17.7	-
Nateglinide	0.244	4.89 (2.48–7.15)	5.92 (2.84–8.79)	-	0.358	65.2	28.9	-
Glivenclamide	0.102	10.3 (4.53–15.7)	12.8 (5.41–19.6)	-	0.442	53.0	23.6	2.2 <sup>24,d</sup>
Bosentan	0.206	5.61 (2.75–8.28)	6.83 (3.18–10.2)	2.0 <sup>69</sup>	0.694	34.1	15.4	5 <sup>70,e</sup>
Valsartan	0.138	7.88 (3.61–11.9)	9.70 (4.26–14.8)	-	0.377	62.0	27.5	-
Torasemide	0.486	2.95 (1.74–4.09)	3.47 (1.93–4.91)	-	1.23	19.7	9.13	-
Fexofenadine	0.0771	13.3 (5.67–20.5)	16.6 (6.84–25.6)	-	0.423	55.4	24.6	3.9–4.6 <sup>71</sup>

Continued to the following page.

Substrates	Inhibitors				Observed AUCR <sup>c</sup>
	GEM and GEM-glu				
	K <sub>i</sub>		R-value (=1+[I]/K <sub>i</sub> ) <sup>c</sup>		
	GEM	GEM-glu	[I] = C <sub>max</sub>	[I] = [I] <sub>u, inlet, max</sub>	
	(μM)	(μM)			
<i>In vitro prototypical probe substrates</i>					
E <sub>2</sub> G	26.4	16.7	8.99	1.58	NA
E <sub>1</sub> S	381	42.6	2.91	1.20	NA
BSP	173	87.6	2.38	1.11	NA
<i>Clinically-used substrate drugs</i>					
Pitavastatin	58.5	31.0	4.96	1.30	1.5 <sup>24</sup>
Atorvastatin	46.0	30.2	5.50	1.32	1.3 <sup>24</sup>
Fluvastatin	72.7	53.6	3.68	1.18	1.1 <sup>24</sup>
Rosuvastatin	63.6	29.5	4.95	1.31	1.9 <sup>24</sup>
Pravastatin	9.65	11.1	17.7	1.99	2.0 <sup>24</sup>
Repaglinide	48.3	36.7	4.98	1.27	7.0 <sup>24</sup> , 7.6 <sup>24</sup> , 8.1 <sup>24</sup> , 8.2 <sup>24</sup>
Nateglinide	252	42.0	3.07	1.20	1.5 <sup>24</sup>
Glibenclamide	29.6	17.8	8.32	1.54	-
Bosentan	36.6	11.2	9.99	1.79	-
Valsartan	13.4	18.4	12.3	1.62	-
Torasemide	49.5	170	3.43	1.10	-
Fexofenadine	31.4	23.9	7.12	1.42	-

NA, Not applicable; -, Not reported.

<sup>a</sup>Dose of CsA ranged from 75 to 322 mg in clinical DDI studies. R-value is presented as the representative value that was calculated based on 200-mg dose of CsA with range in parenthesis. R-value range that corresponds to the clinical dose range (75 to 322 mg) was calculated based on the parameters of CsA given in Table 5 assuming the linear pharmacokinetics.

<sup>b</sup>Dose of RIF was 600 mg in clinical DDI studies.

<sup>c</sup>Dose of GEM was 600 mg in clinical DDI studies.

<sup>d</sup>The inhibitor was given as a single intravenous dose.

<sup>e</sup>Fold increase in the trough concentration on Day 2.



### 第三節 基質依存的な阻害のメカニズムの検証

OATP1B1 と同様に基質依存的な阻害を示す薬物代謝酵素 CYP3A では、分子内に複数の基質結合部位を有することにより<sup>72</sup>、基質依存的な阻害を引き起こすと考えられている<sup>73</sup>。OATP1B1 も同様のメカニズムで基質依存的な阻害を引き起こすと考え、OATP1B1 の基質依存的阻害のメカニズムの解明を目的として、<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G、<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S、および<sup>3</sup>H]BSP の 3 種類の RI 基質に対して相互の阻害様式を検討した (Figure 14 および Table 7)。

阻害剤非存在下において、E<sub>2</sub>G および BSP は過去の報告と同様に OATP1B1 に対して一相性の取り込みを示し<sup>9, 59-60</sup>、E<sub>2</sub>G の K<sub>m</sub> および V<sub>max</sub> はそれぞれ 8.17 μM、250 pmol/min/mg protein、BSP ではそれぞれ 0.280 μM、20.8 pmol/min/mg protein であった。OATP1B1 を介した E<sub>1</sub>S の取り込みは本検討では一相性を示し、K<sub>m</sub> および V<sub>max</sub> はそれぞれ 0.286 μM、36.4 pmol/min/mg protein であった。E<sub>1</sub>S の OATP1B1 を介した取り込みについては、一相性との報告がある一方で<sup>9</sup>、二相性を示すという報告もある<sup>31, 34, 74</sup>。この違いの理由は不明であるが、検討に用いた細胞や実験条件の違いに起因するものと考えられる。

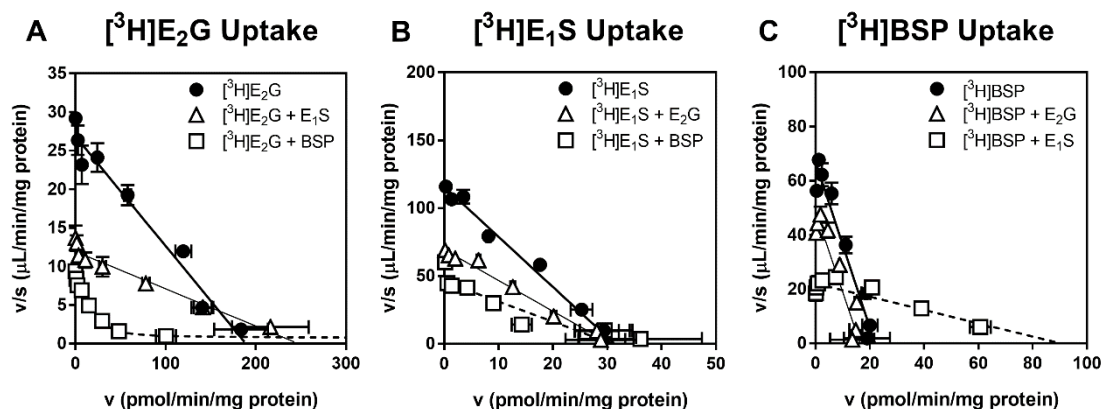
E<sub>2</sub>G の OATP1B1 を介する取り込みは、0.1 μM の E<sub>1</sub>S 存在下において K<sub>m</sub> 値が 8.17 から 18.7 μM へと有意に上昇したが、V<sub>max</sub> に影響を与えなかったことから、E<sub>1</sub>S が E<sub>2</sub>G の輸送を競合的に阻害することが明らかとなった。また、E<sub>1</sub>S の OATP1B1 を介する取り込みは、10 μM の E<sub>2</sub>G 存在下において K<sub>m</sub> 値が 0.286 から 0.488 μM へと有意に上昇したが、V<sub>max</sub> に影響を与えず、E<sub>2</sub>G が E<sub>1</sub>S を競合阻害することが示された。したがって、E<sub>2</sub>G と E<sub>1</sub>S は OATP1B1 上で互いに競合阻害し、両基質が OATP1B1 の同一の結合部位を介して輸送されることを示唆するものである。しかし、Table 3 および Table 4 に

示した様に、複数の阻害剤において OATP1B1 に対する  $K_i$  値が両基質間で顕著な相違を示したことから、両基質が単一の結合部位を介して取り込まれるとは考えにくい。

0.3  $\mu\text{M}$  の BSP 存在下での  $\text{E}_2\text{G}$  の輸送は、 $V_{\text{max}}$  のみ 250 から 55.8 pmol/min/mg protein へと有意に低下したが、 $K_m$  値は影響されなかったことから、BSP は  $\text{E}_2\text{G}$  を非競合的に阻害することが判明した。一方で、10  $\mu\text{M}$  の  $\text{E}_2\text{G}$  存在下での BSP の輸送は、 $K_m$ 、 $V_{\text{max}}$  ともに有意な変化はなく、阻害様式は明らかとならなかった。この結果は、少なくとも BSP は  $\text{E}_2\text{G}$  の結合部位とは異なる部位に作用することで  $\text{E}_2\text{G}$  の輸送を阻害しており、両基質が OATP1B1 上の異なる結合部位を介して輸送されることを示唆するものである。また、第三章第一節で実施した阻害試験において、複数の阻害剤が特に低濃度領域において BSP の取り込みを有意に活性化したが (Figure 11)、本現象も OATP1B1 上に複数の結合部位が存在することを示唆するものである。

0.3  $\mu\text{M}$  の BSP 存在下での  $\text{E}_1\text{S}$  の輸送は、 $K_m$  のみ 0.286 から 0.677  $\mu\text{M}$  へと有意に上昇し、 $V_{\text{max}}$  に影響がなかったことから、BSP は  $\text{E}_1\text{S}$  を競合的に阻害することが判明した。10  $\mu\text{M}$  の  $\text{E}_1\text{S}$  存在下での BSP の輸送は、 $K_m$  が 0.280 から 4.78  $\mu\text{M}$  へと有意に上昇し、 $V_{\text{max}}$  も 20.8 から 111 pmol/min/mg protein へと有意に上昇したことから、 $\text{E}_1\text{S}$  は BSP の阻害を非定型的に阻害した。

これらの現象は、3 基質の OATP1B1 による取り込みが単一の結合部位を介してなされるという単純なモデルでは説明し難く、OATP1B1 上に複数の基質結合部位が存在し、これが OATP1B1 の基質依存的な阻害作用の要因であると推察された。



**Figure 14.** Mutual inhibition of OATP1B1-mediated uptake of  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ ,  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ , and  $[^3\text{H}]\text{BSP}$ .

(A) Concentration-dependent uptake of  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  (0.003–100  $\mu\text{M}$ ) for 5 min in the absence (closed circles) and presence of unlabeled  $\text{E}_1\text{S}$  (0.1  $\mu\text{M}$ , open triangles) or  $\text{BSP}$  (0.3  $\mu\text{M}$ , open squares). (B) Concentration-dependent uptake of  $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$  (0.003–10  $\mu\text{M}$ ) for 1 min in the absence (closed circles) and presence of unlabeled  $\text{E}_2\text{G}$  (10  $\mu\text{M}$ , open triangles) or  $\text{BSP}$  (0.3  $\mu\text{M}$ , open squares). (C) Concentration-dependent uptake of  $[^3\text{H}]\text{BSP}$  (0.007–10  $\mu\text{M}$ ) for 5 min in the absence (closed circles) and presence of unlabeled  $\text{E}_2\text{G}$  (10  $\mu\text{M}$ , open triangles) or  $\text{E}_1\text{S}$  (10  $\mu\text{M}$ , open squares). Data are shown as Eadie-Hofstee plots. Each point represents the mean  $\pm$  SD. ( $n = 3$ ). Fitted lines, which were obtained from nonlinear regression analysis based on Eqs. 1 or 2 under Experimental Section are also presented. Representative data from three independent experiments are shown in this figure.

**Table 7.** Saturation kinetics of OATP1B1-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S, and [<sup>3</sup>H]BSP in the presence and absence of unlabeled E<sub>2</sub>G, E<sub>1</sub>S, and BSP

Inhibitor	Substrates						
	[ <sup>3</sup> H]E <sub>2</sub> G <sup>a</sup>			[ <sup>3</sup> H]E <sub>1</sub> S <sup>b</sup>		[ <sup>3</sup> H]BSP <sup>c</sup>	
	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	P <sub>dif</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>
	μM	pmol/min/mg	μL/min/mg	μM	pmol/min/mg	μM	pmol/min/mg
No inhibitor	8.17 ± 2.28	250 ± 89	NA	0.286 ± 0.054	36.4 ± 10.3	0.280 ± 0.041	20.8 ± 1.0
E <sub>2</sub> G	NA	NA	NA	0.488 ± 0.072*	35.7 ± 8.3	0.361 ± 0.069	18.5 ± 1.9
E <sub>1</sub> S	18.7 ± 2.2**	251 ± 22	NA	NA	NA	4.78 ± 0.65**	111 ± 18**
BSP	5.80 ± 2.53	55.8 ± 24.7**	0.667 ± 0.642	0.677 ± 0.112*	34.3 ± 11.7	NA	NA

Kinetic parameters were estimated by non-linear regression analysis based on the Eqs. 1 or 2 under Experimental Section, and are shown as mean ± SD (n=3).

\*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 compared to parameters determined without any inhibitors.

a: Concentration-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (0.003 – 100 μM) for 5 min was examined in the absence and presence of unlabeled E<sub>1</sub>S (0.1 μM) or BSP (0.3 μM).

b: Concentration-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (0.003 – 10 μM) for 1 min was examined in the absence and presence of unlabeled E<sub>2</sub>G (10 μM) or BSP (0.3 μM).

c: Concentration-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]BSP (0.007 – 10 μM) for 5 min was examined in the absence and presence of unlabeled E<sub>2</sub>G (10 μM) or E<sub>1</sub>S (10 μM).

NA: Not applicable.

## 第四章

新規 OATP1B1 蛍光基質の探索と  
蛍光法に基づく阻害評価系の構築

## 第四章 新規 OATP1B1 蛍光基質の探索と蛍光法に基づく阻害評

### 価系の構築

#### 第一節 蛍光法阻害評価系構築の意義と既存の蛍光基質の問題点

従来、OATP1B1 に対する阻害作用評価は、第二章で示した非標識体を基質として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計によって検出する方法、または第三章で示した RI 標識体を基質として放射活性を検出する方法が用いられてきたが、両手法ともサンプルの後処理および測定に多大な労力と時間を要するため、創薬初期に求められる多検体評価のニーズを十分に満たしていなかった。OATP1B1 を介した DDI リスクの低い医薬品を創出するためには、創薬初期の段階から多検体に対して OATP1B1 阻害評価を実施し、構造活性相関を合成展開に活かすことが大切である。より多検体評価に適した OATP1B1 阻害評価系を構築するため、蛍光基質を使用する蛍光法に着目した。蛍光法は、被験物質の自家蛍光や溶媒極性、pH などが蛍光強度に影響を与えるという欠点はあるが、これらは評価に用いる蛍光基質の特性を予め理解することでコントロール可能であり、蛍光法の有する高感度かつ高いスループット性は探索初期段階の多検体評価において有用なツールとなると期待される。

これまでに報告されている OATP ファミリートランスポーターの蛍光基質を Table 8 にまとめた。胆汁酸である cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA), および ursodeoxycholic acid (UDCA) などに蛍光団として fluorescein (FL) または 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を付加した蛍光胆汁酸は、OATP ファミリートランスポーターの基質となることが知られているが、これらは一般試薬として購入できず、必要に応じて合成しなければならない<sup>75-78</sup>。一方、

fluorescein methotrexate (FMTX)<sup>79</sup>, Oregon Green® 488 Taxol (Flutax-2)<sup>79</sup>, 8-fluorescein-cAMP (8-FcA)<sup>80</sup>, FL<sup>79, 81</sup>, fluo-3<sup>39, 82</sup>, および 5-(and 6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF)<sup>83</sup>は一般試薬として購入可能である。このうち、OATP1B1の基質となるFMTX, FL, および8-FcAについて比較すると、FLのOATP1B1を介する取り込み活性はFMTXのそれと同等かやや劣るとの報告があり、さらにFMTXについては十分な輸送活性がないためOATP1B1阻害試験への適用に際しては改善を要すると報告されていた<sup>79</sup>。FMTXは抗癌剤であるmethotrexateを分子内に含むことから、試薬の取り扱いに際し安全上の懸念もある。cAMPに蛍光団であるFLを付加した8-FcAはOATP1B1とOATP1B3の基質となるが、その価格はFLに比べて非常に高く、評価系運用にかかる費用が高いという欠点がある。このように、一見OATP1B1の蛍光基質の選択肢は豊富なように見えるが、一般試薬として購入できるものは限られており、購入可能なものについてもOATP1B1を介する輸送活性や取り扱い時の安全性、ランニングコストの面で課題があり、必ずしも創薬ニーズを満たしていなかった。また、これら蛍光基質に対してOATP1B1の基質依存的な阻害の検討はなされておらず、既存の蛍光基質のプローブ基質としての妥当性の検証は不十分であった。

そこで本研究では蛍光法に基づくOATP1B1阻害評価系を樹立することを目的とし、その際使用するOATP1B1の蛍光基質の満たすべき条件として、①OATP1B1の良好な基質であり、OATP1B1を介して細胞内に多く取り込まれること、②<sup>[3H]E<sub>2</sub>G</sup>と同等のK<sub>i</sub>値を与えること、および③安価でランニングコストがかからないことの3点を設定した。

**Table 8.** Reported fluorescent substrates of hepatic OATP/Oatp family

Fluorescent substrates	Substances labeled with fluorophores	Fluorophores	Transporters	References
CDCA-NBD	Bile acid (Chenodeoxycholic acid)	NBD	OATP1B1, OATP1B3, Oatp(s)	75-76
CA-NBD	Bile acid (Cholic acid)	NBD	OATP1B1, OATP1B3, Oatp(s)	75-76
DCA-NBD	Bile acid (Deoxycholic acid)	NBD	OATP1B1, OATP1B3	76
LCA-NBD	Bile acid (Lithocholic acid)	NBD	OATP1B1, OATP1B3	76
UDCA-NBD	Bile acid (Urosodeoxycholic acid)	NBD	OATP1B1, OATP1B3	76
CGamF	Bile acid (Cholic acid)	FL	OATP1B1, OATP1B3, Oatp(s)	75, 77
CLF	Bile acid (Cholic acid)	FL	OATP1B1, OATP1B3	78
FMTX	Methotrexate	FL	OATP1B1, OATP1B3	79
Flutax-2	Paclitaxel	OG	OATP1B3	79
FL	-	FL	OATP1B1, OATP1B3, Oatp(s)	79, 81
8-FcA	cAMP	FL	OATP1B1, OATP1B3	80
Fluo-3	-	Fluo-3	OATP1B1, OATP1B3	39, 82
CDCF	-	CDCF	Oatp(s)	83

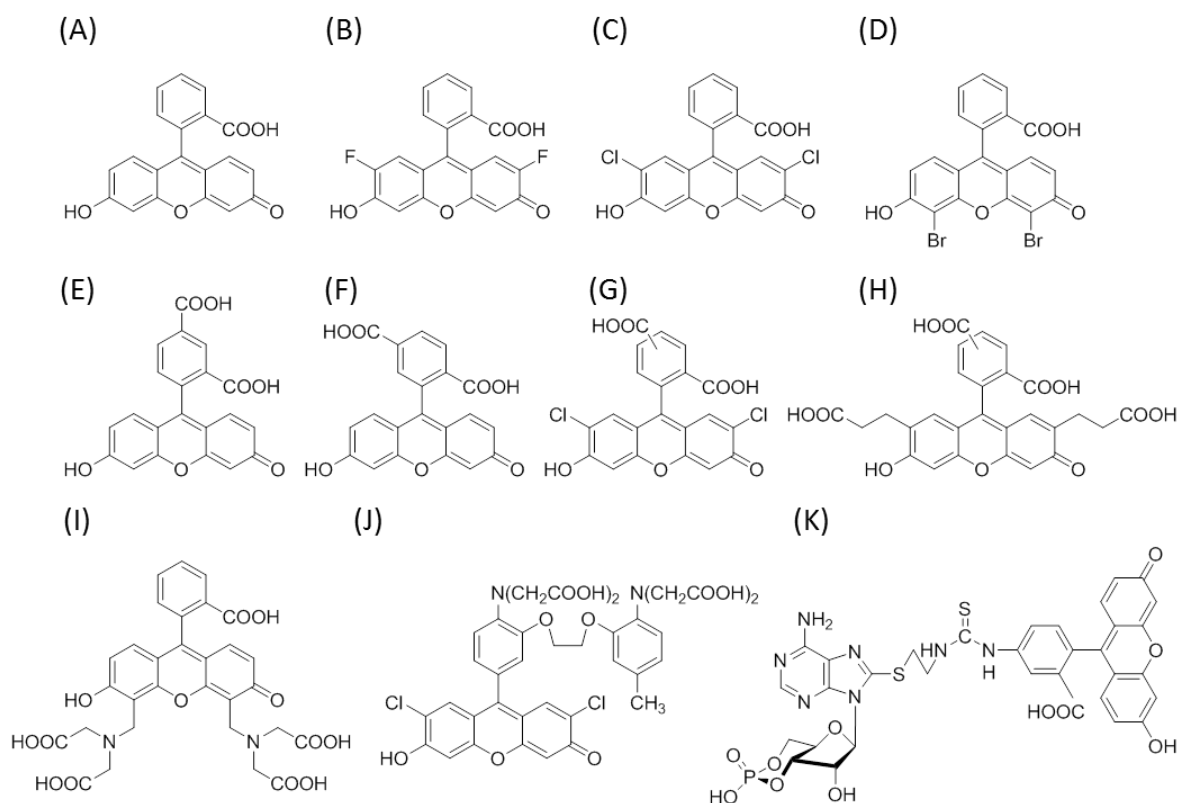
-, Not applicable.



## 第二節 新規 OATP ファミリートランスポーターの蛍光基質の探索

FL 誘導体は一般的に、分子内にフェノール性水酸基およびカルボキシル基を有することから生理的条件下 (pH 7.4 付近) にて負電荷を帯び、かつアルカリ条件下にて強い蛍光を発する<sup>84</sup>。アニオン性化合物であるために OATP1B1 の基質になる可能性があることに加え、FL のアルカリ条件下における蛍光量子収率は 0.85 と非常に高いことから<sup>85-86</sup>、仮に被験物質が FL 誘導体と同じ蛍光波長領域に自家蛍光を示した場合においても評価結果に与える影響は少ないと期待できる。

そこで本研究では一般試薬として購入可能な FL ならびに FL 誘導体である Oregon green (OG), 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), 4', 5'-dibromofluorescein (DBF), 5-carboxyfluorescein (5-CF), 6-carboxyfluorescein (6-CF), 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein (CDCF), 2', 7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(or 6)-carboxyfluorescein (BCECF), calcein, fluo-3, および 8-FcA (Figure 15) が OATP1B1, OATP1B3 および OATP2B1 の基質となるか、発現細胞を用いて検討した。用いた FL 誘導体の蛍光特性を Table 9 にまとめた。



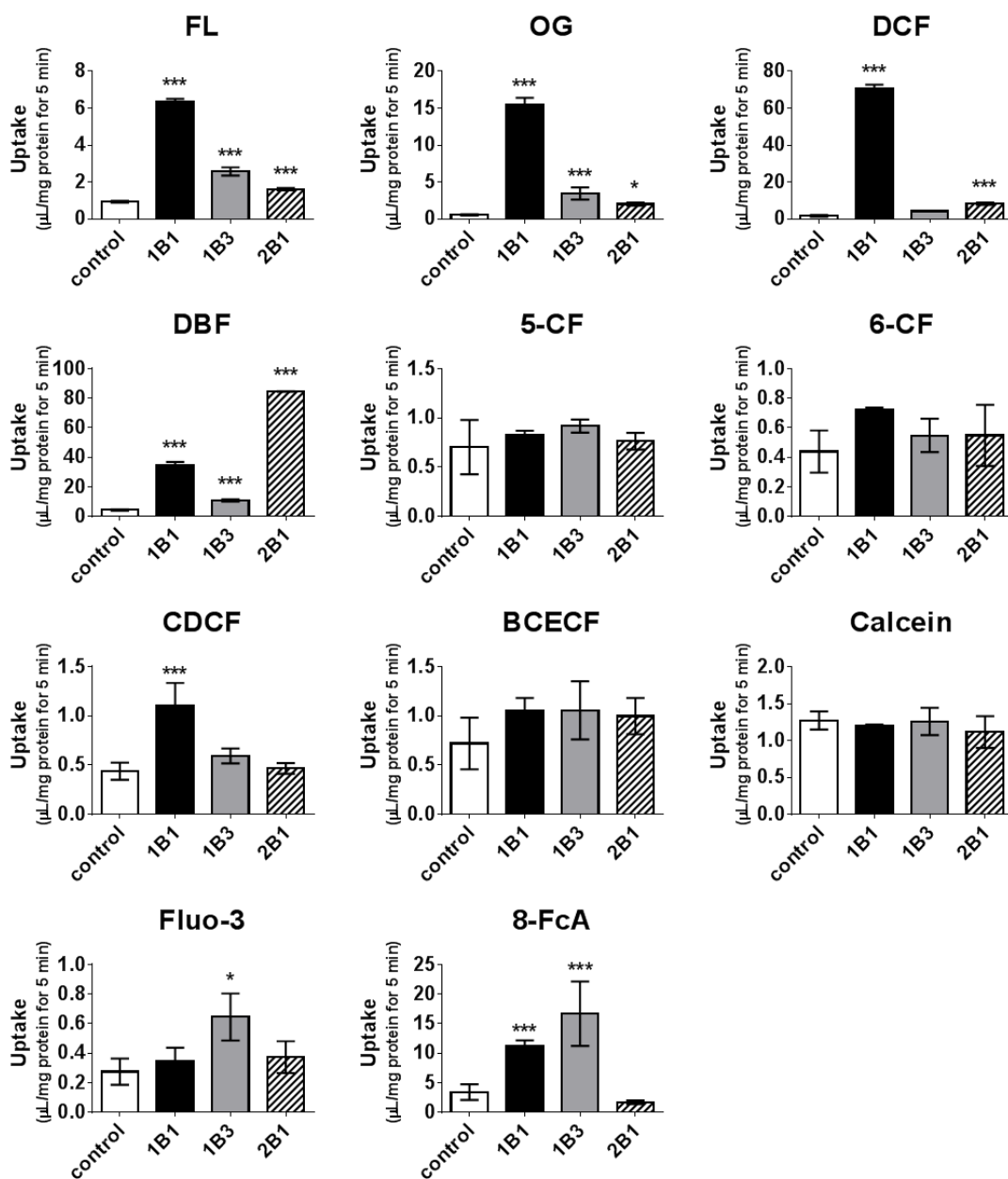
**Figure 15.** Chemical structures of FL and its derivatives used in this study. (A) FL, (B) OG, (C) DCF, (D) DBF, (E) 5-CF, (F) 6-CF, (G) CDCF, (H) BCECF, (I) calcein, (J) fluo-3, and (K) 8-FcA.

**Table 9.** Fluorescence properties of FL and its derivatives

FL 誘導體	蛍光量子収率	最大吸収波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	References
FL	0.85	490	515	86
OG	0.97	490	514	87
DCF	0.86	503	522	88
DBF	0.69	511	534	85
5-CF	0.92	500	524	85
6-CF	0.91	500	521	85
CDCF	-	504	529	84
BCECF	-	503	528	84
Calcein	0.79	494	516	89
Fluo-3	0.183 (with Ca <sup>2+</sup> )	506	526	90
8-FcA	-	494	517	91

各蛍光色素 1  $\mu$ M (FL, OG, DCF, DBF, 8-FcA) または 10  $\mu$ M (CDCF, BCECF, 5-CF, 6-CF, calcein, fluo-3) を含むアッセイ溶液を各 OATP 発現細胞および control 細胞と 5 分間インキュベーションし、細胞内に取り込まれた蛍光色素の量を比較した結果、DCF, OG, および DBF を新規 OATP1B1 蛍光基質として見出した (Figure 16) . これらの OATP1B1 を介する取り込み活性は既知の蛍光基質 (FL, 8-FcA) を上回っており、特に DCF は最も高い輸送活性を示すとともに、本実験条件下において OATP1B1 に対して選択性の高い基質であることが判った。また、FL は OATP1B1, OATP1B3 だけでなく OATP2B1 の基質ともなること、さらに CDCF はラット *Oatp* だけでなくヒト OATP1B1 の基質になることも見出した。

本評価に用いた蛍光色素の数は 11 種類と限られており、明確な構造活性相関を得ることはできないが、① FL 骨格のベンゼン環にカルボキシル基が入ると OATP ファミリートランスポーターの基質になりにくくなる (e.g. 5-CF, 6-CF, および CDCF), ② キサンテンの 2', 7' 位にハロゲンが入ると OATP1B1 の基質になりやすくなる一方、OATP1B3, OATP2B1 に対する影響は少ない (e.g. OG, および DCF), ③ キサンテンの 4', 5' 位にハロゲンが入ると OATP1B1 および OATP2B1 の基質になりやすくなる (e.g. DBF) という傾向が観察された。

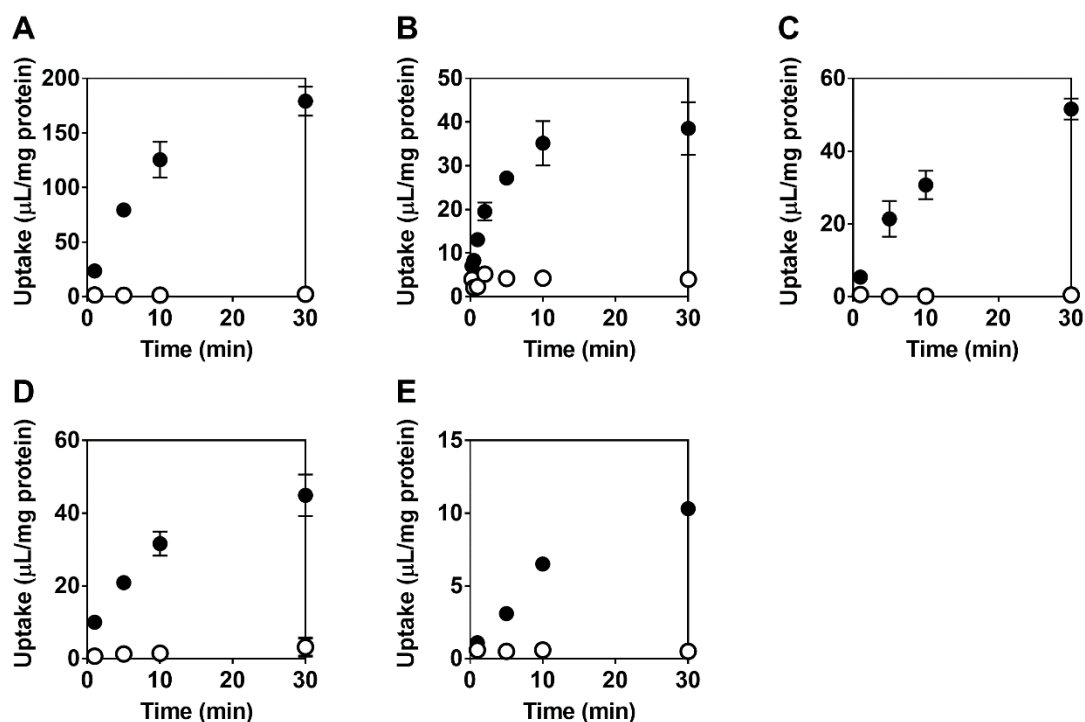


**Figure 16.** Uptake of FL and its derivatives in OATP1B1-, OATP1B3-, and OATP2B1-expressing cells and the control cells.

Transporter-expressing cells and the control cells were incubated with KH buffer containing FL (A), OG (B), DCF (C), DBF (D), 5-CF (E), 6-CF (F), CDCF (G), BCECF (H), calcein (I), fluo-3 (J), or 8-FcA (K) for 5 min at 37°C. Final substrate concentration in the KH buffer was 1 µM (for FL, OG, DCF, DBF, and 8-FcA) or 10 µM (for CDCF, BCECF, 5-CF, 6-CF, calcein, and fluo-3, due to the limit of detection). Each point represents the mean ± SD (n = 3). \**P* < 0.05 and \*\*\**P* < 0.001 between transporter-expressing cells and the control cells.

### 第三節 OATP1B1 蛍光基質の精査

OATP1B1 の新規蛍光基質として見出された OG, DCF, および DBF, ならびに既知蛍光基質である FL および 8-FcA について, OATP1B1 を介した輸送をさらに精査した. 各蛍光基質の OATP1B1 発現細胞および control 細胞への経時的な取り込みを検討し, いずれの化合物も OATP1B1 発現細胞において control 細胞に比べて高い取り込みを示し, DCF で最も高い取り込みが認められた (Figure 17). 本結果に基づき, 以降の検討では初速度が保たれている 5 分 (DCF, OG, 8-FcA, および FL) または 1 分 (DBF) をインキュベーション時間として設定した. 続いて各蛍光基質の OATP1B1 を介した濃度依存的な取り込みから, 速度論的パラメータを算出した (Table 10). いずれの蛍光基質も一相性の取り込みを示し, OATP1B1 に対する  $K_m$  値は 4.16 (DBF) から 54.1  $\mu\text{M}$  (OG) であった. OATP1B1 を介した取り込みクリアランス ( $V_{\max} / K_m$ ) は 1.37 (FL) から 16.5  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  (DCF) と得られ, DCF がもっとも効率的に OATP1B1 によって輸送されることが判明した. DBF についても DCF とほぼ同程度の輸送活性を示したが, DCF の方が DBF よりも高い蛍光量子収率を示し<sup>85</sup>, control 細胞に対する発現細胞への取り込み量比も高く, さらに安価であることから, OATP1B1 阻害試験系における蛍光プローブ基質として DCF の方が DBF よりも優れていると考えられた.



**Figure 17.** Time profiles of the uptake of DCF, DBF, OG, 8-FcA, and FL in OATP1B1-expressing cells and the control cells.

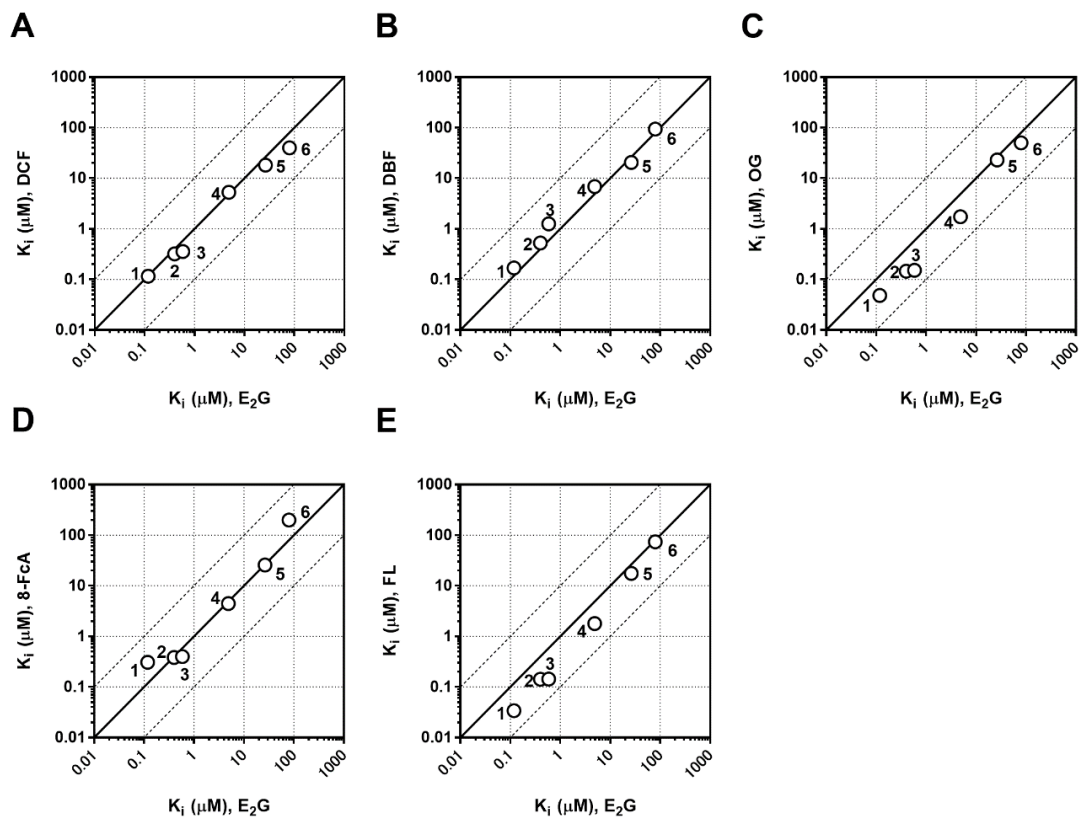
OATP1B1-expressing cells (closed circles) and the control cells (open circles) were incubated with DCF (A), DBF (B), OG (C), 8-FcA (D), or FL (E) at 1 μM over a period of 30 min at 37°C. Each point represents the mean ± SD (n = 3).

**Table 10.** Kinetic parameters of OATP1B1-mediated uptake of FL, OG, DCF, DBF, and 8-FcA. Kinetic parameters were estimated by nonlinear least-squares regression analysis based on Eq. 1 as described under Experimental Section and are shown as mean ± SD. of 3 (OG), 4 (8-FcA), 5 (FL and DBF), or 6 (DCF) independent experiments.

Substrates	$K_m$ μM	$V_{max}$ pmol/min/mg protein	$V_{max}/K_m$ μL/min/mg protein
DCF	5.29 ± 1.51	87.9 ± 35.9	16.5 ± 3.7
DBF	4.16 ± 2.53	48.1 ± 8.0	13.9 ± 5.8
OG	54.1 ± 9.6	187 ± 11	3.53 ± 0.63
8-FcA	9.05 ± 3.44	26.0 ± 8.1	2.97 ± 0.69
FL	19.1 ± 6.5	26.5 ± 10.9	1.37 ± 0.33

#### 第四節 OATP1B1 阻害試験に適した蛍光基質の選出

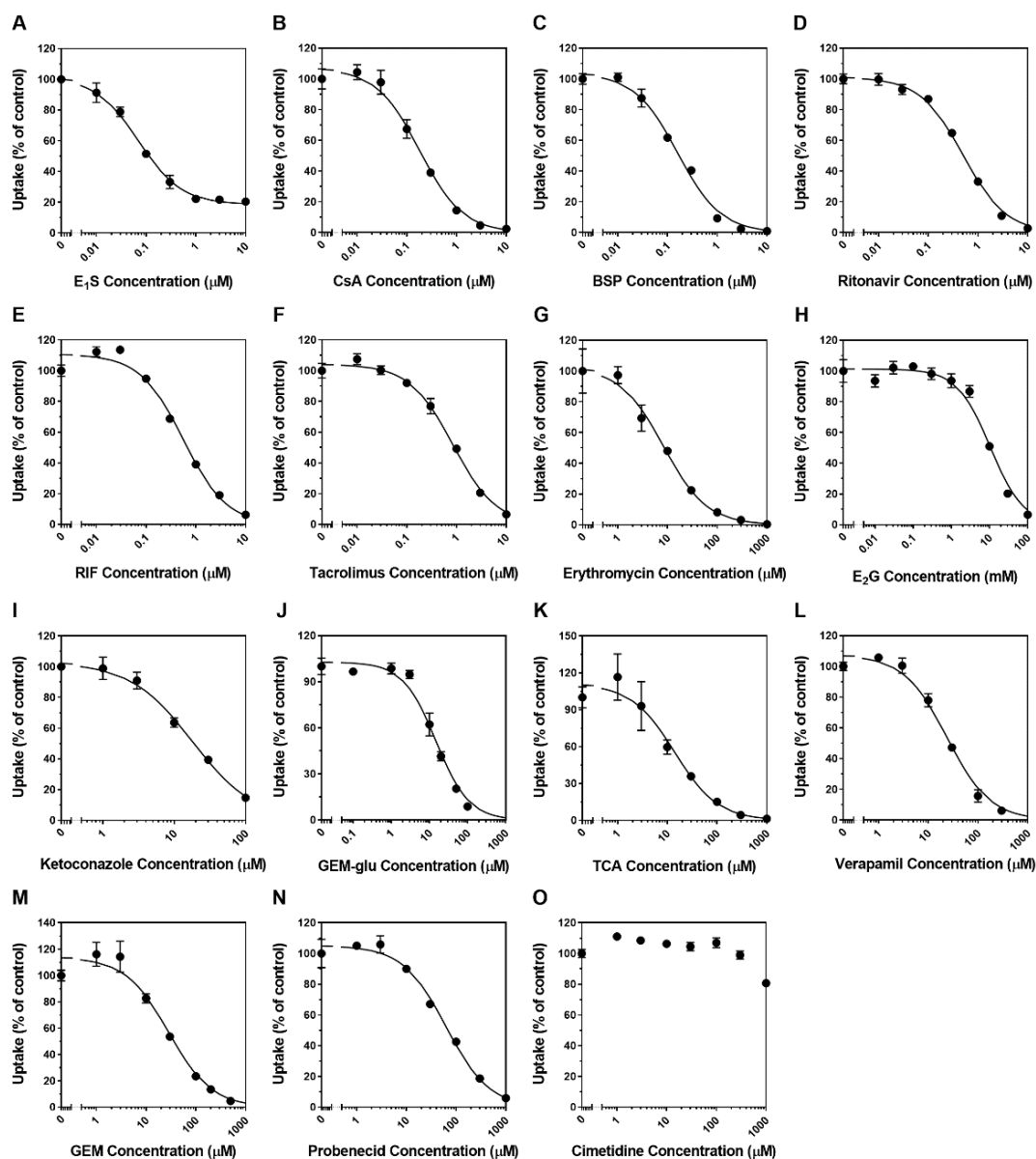
前述のとおり，OATP1B1 は顕著な基質依存的阻害を示すことから，OATP1B1 阻害試験で用いる蛍光基質に対しても， $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  と同様に阻害活性を鋭敏に検出することが求められる．そこで，DCF，DBF，OG，8-FcA，および FL を蛍光プローブ基質として使用し，第三章で顕著な基質依存的な阻害作用を示した CsA，ritonavir，RIF，erythromycin，GEM，および probenecid の OATP1B1 に対する  $K_i$  値を求め， $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  の結果と比較した (Figure 18)．その結果，いずれの蛍光基質も  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  と同等の  $K_i$  値を与え， $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  と同様に阻害作用を鋭敏に検出できることがわかった．そのため，OATP1B1 を介する輸送活性が最も高く，control 細胞と OATP1B1 発現細胞での蛍光強度の比が最も高い DCF を OATP1B1 阻害試験に用いる蛍光基質として選出し，さらに多くの阻害剤について阻害能を検討した (Figure 19 および Table 11)．DCF と  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  を基質として得られた  $K_i$  値を比較したところ，両者の間に良好な 1:1 の相関が認められた (Figure 20)．さらに，CsA，RIF，および GEM (および GEM-glu) の  $K_i$  値を用いて臨床での DDI リスクを評価した結果，DCF と  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  は同等の R 値を与え，これら阻害剤の DDI リスクを検出することができた (Table 12)．以上より， $\text{E}_2\text{G}$  と DCF は DDI リスク評価の観点からも等価なプローブ基質であると結論づけた．



**Figure 18.** Comparison of  $K_i$  values between  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and DCF (A),  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and DBF (B),  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and OG (C),  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and 8-FcA (D), and  $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  and FL (E).

The solid line and the dashed lines represent the line of unity and the lines of 1:10 and 10:1 correlations, respectively. 1, CsA; 2, ritonavir; 3, RIF; 4, erythromycin; 5, GEM; 6, probenecid.





**Figure 19.** Inhibitory effects of 15 compounds on OATP1B1-mediated uptake of DCF.

Uptake of DCF (3  $\mu\text{M}$ ) mediated by OATP1B1 was examined for 5 min at 37°C in the presence and absence of (A) E<sub>1</sub>S (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (B) CsA (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (C) BSP (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (D) ritonavir (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (E) RIF (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (F) tacrolimus (0.01–10  $\mu\text{M}$ ), (G) erythromycin (1–1000  $\mu\text{M}$ ), (H) E<sub>2</sub>G (0.01–100  $\mu\text{M}$ ), (I) ketoconazole (1–100  $\mu\text{M}$ ), (J) GEM-glu (0.1–100  $\mu\text{M}$ ), (K) TCA (1–1000  $\mu\text{M}$ ), (L) verapamil (1–300  $\mu\text{M}$ ), (M) GEM (1–500  $\mu\text{M}$ ), (N) probenecid (1–1000  $\mu\text{M}$ ), and (O) cimetidine (1–1000  $\mu\text{M}$ ). The data are taken from two independent experiments with six samples per concentration and are shown as % of control as described in the Experimental Section. Solid lines represent fitted lines for the inhibition of DCF uptake by the inhibitors that were obtained by a nonlinear least-squares regression analysis based on Eqs. 3 or 5. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 6).

**Table 11.**  $K_i$  values of test compounds for OATP1B1-mediated uptake of DCF

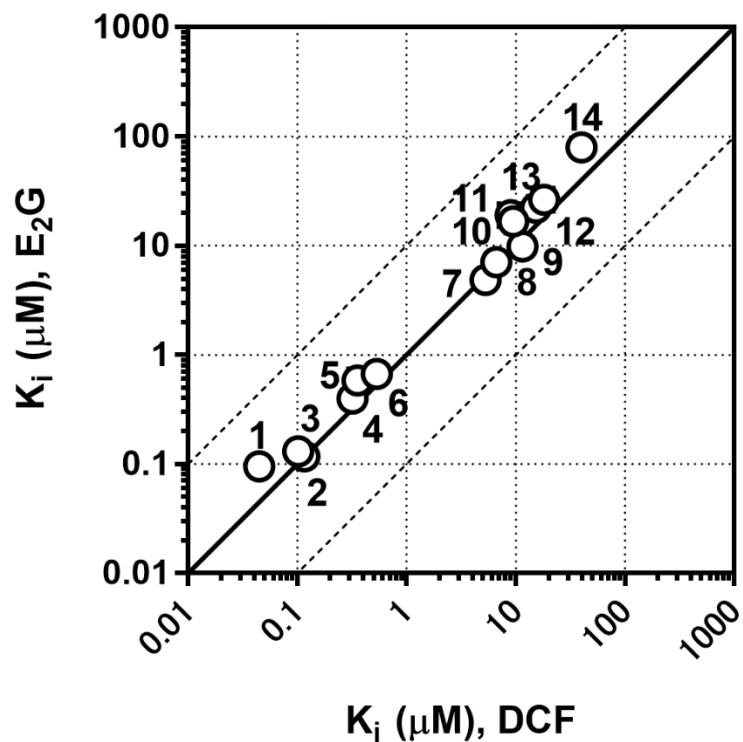
OATP1B1-mediated uptake of DCF (3  $\mu\text{M}$ ) was determined for 5 min in the presence and absence of inhibitors (Figure 19), and the  $\text{IC}_{50}$  values were obtained by a nonlinear least-squares regression analysis based on Eqs. 3 or 5. Using the  $\text{IC}_{50}$  values, the  $K_m$  value of DCF for OATP1B1 (5.29  $\mu\text{M}$ ), and substrate (DCF) concentration (3  $\mu\text{M}$ ), the  $K_i$  values were calculated according to Eq. 6. Each value represents parameter estimate  $\pm$  computer-calculated SD.

Inhibitors	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
E <sub>1</sub> S	0.0449 $\pm$ 0.0039
CsA	0.116 $\pm$ 0.015
BSP	0.102 $\pm$ 0.012
Ritonavir	0.320 $\pm$ 0.024
RIF	0.355 $\pm$ 0.061
Tacrolimus	0.533 $\pm$ 0.046
Erythromycin	5.27 $\pm$ 0.63
E <sub>2</sub> G	6.63 $\pm$ 0.91
Ketoconazole	11.5 $\pm$ 0.9
GEM-glu	9.45 $\pm$ 1.34
TCA	8.97 $\pm$ 1.97
Verapamil	15.3 $\pm$ 2.3
GEM	18.1 $\pm$ 3.9
Probenecid	39.8 $\pm$ 4.4

**Table 12.** Prediction of OATP1B1-mediated DDIs using [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G and DCF as substrates following a static model

R-values of CsA, RIF, GEM, and GEM-glu were determined using  $K_i$  values obtained from each probe substrate and [I] ( $C_{\text{max}}$  or  $[I]_{\text{u,inlet,max}}$ ) based on Eqs. 7 and 8. The  $K_i$  values were taken from Table 4 and Table 11.

Inhibitors	R-value ( $=1+[I]/K_i$ )			
	E <sub>2</sub> G		DCF	
	[I] = $C_{\text{max}}$	[I] = $I_{\text{u,inlet,max}}$	[I] = $C_{\text{max}}$	[I] = $I_{\text{u,inlet,max}}$
CsA	9.05	11.2	9.19	11.3
RIF	40.3	18.1	65.8	29.2
GEM + GEM-glu	8.99	1.58	13.94	1.99



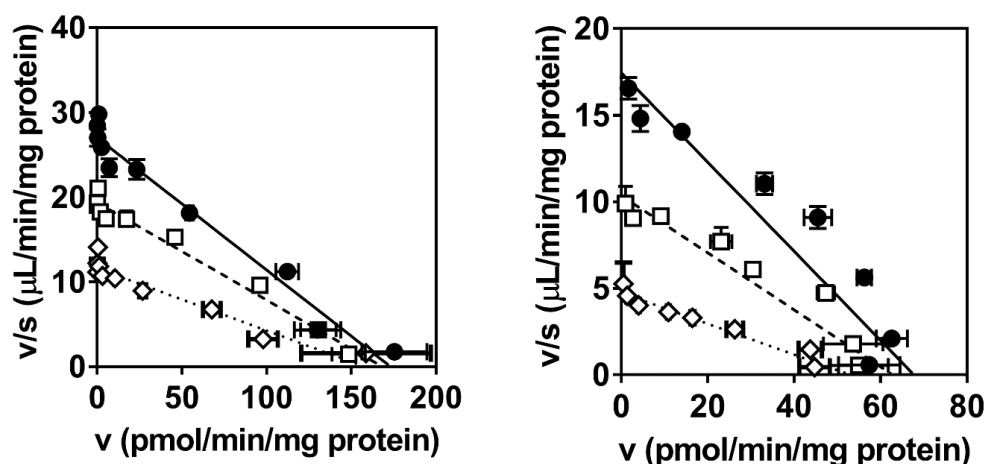
**Figure 20.** Comparison of  $K_i$  values for OATP1B1 between DCF and [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G.

$K_i$  values determined with DCF and [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G as substrates were obtained from Table 11 and Table 4, respectively. Each point represents parameter estimate  $\pm$  computer-calculated SD. The solid line and dashed lines represent the line of unity and the lines of 1:10 and 10:1 correlations, respectively. 1, E<sub>1</sub>S; 2, CsA; 3, BSP; 4, ritonavir; 5, RIF; 6, tacrolimus; 7, erythromycin; 8, E<sub>2</sub>G; 9, ketoconazole; 10, GEM-glu; 11, TCA; 12, verapamil; 13, GEM; 14, probenecid.

## 第五節 DCF と E<sub>2</sub>G の相互阻害様式の検討

E<sub>2</sub>G と DCF は、各種阻害剤の OATP1B1 に対する阻害活性を同等に見積もることができることから、両基質は OATP1B1 の同一の結合部位を介して輸送されると推測し、基質間の相互阻害作用を検討した (Figure 21 および Table 13) .

E<sub>2</sub>G の OATP1B1 に対する K<sub>m</sub> 値は、10 μM の DCF 存在下で 7.96 から 16.6 μM へと有意に上昇したが、V<sub>max</sub> に影響を与えなかった。同様に、DCF の OATP1B1 に対する K<sub>m</sub> 値は、10 μM の E<sub>2</sub>G 存在下で 4.82 から 12.6 μM へと有意に上昇したが、V<sub>max</sub> に影響を与えなかった。即ち、両基質は互いに競合的に阻害し、両基質が OATP1B1 上の同一の結合部位を介して輸送されることが示唆された。



**Figure 21.** Mutual inhibition of OATP1B1-mediated uptake of DCF and [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G.

(A) Concentration-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (0.002 to 100 μM) for 5 min in the absence (closed circles) or presence of DCF at 3 (open squares) or 10 μM (open diamonds). (B) Concentration-dependent uptake of DCF (0.1 to 100 μM) for 5 min in the absence (closed circles) or presence of unlabeled E<sub>2</sub>G at 3 (open squares) or 10 μM (open diamonds). Representative data from three independent experiments are shown as Eadie-Hofstee plots. Each point represent the mean ± SD (n = 3). Fitted lines were obtained by a nonlinear least-squares regression analysis based on the Eq. 1 in the Experimental Section.

**Table 13.** Kinetic Parameters of OATP1B1-Mediated Uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G and DCF in the Presence and Absence of DCF and Unlabeled E<sub>2</sub>G

Kinetic parameters were estimated by nonlinear least-squares regression analysis based on Eq. 1 in Experimental Section and are presented as mean ± SD of three independent experiments. Concentration-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (0.002–100 μM) for 5 min was examined in the absence and presence of DCF at 3 or 10 μM. Concentration-dependent uptake of DCF (0.1–100 μM) for 5 min was examined in the absence and presence of unlabeled E<sub>2</sub>G at 3 or 10 μM. \*\*\**P* < 0.001 compared with parameters determined without any inhibitors.

Inhibitors	Substrates			
	[ <sup>3</sup> H]E <sub>2</sub> G		DCF	
	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>
	μM	pmol/min/mg protein	μM	pmol/min/mg protein
No inhibitor	7.96 ± 1.60	259 ± 76	4.82 ± 1.23	68.3 ± 13.1
DCF (3 μM)	10.7 ± 1.7	254 ± 66	NA	NA
DCF (10 μM)	16.6 ± 2.5***	213 ± 44	NA	NA
E <sub>2</sub> G (3 μM)	NA	NA	6.38 ± 1.30	59.3 ± 10.2
E <sub>2</sub> G (10 μM)	NA	NA	12.6 ± 1.2***	63.3 ± 12.3

NA, not applicable.

## 第五章

### 総括と今後の展望

## 第五章 総括と今後の展望

OATP1B1は様々な医薬品の肝取り込みに関わる薬物動態上極めて重要なトランスポーターであり、OATP1B1阻害に起因するDDIが数多く報告されている。医薬品候補化合物のDDIリスクを適正に評価する上で、信頼性の高いOATP1B1に対する阻害能をin vitro試験から求めることが重要であるが、OATP1B1は基質依存的な阻害を示すことが示唆されているにも関わらず、阻害試験に適したプローブ基質は検討されてこなかった。そこで本研究では、まず①臨床基質薬を用い、OATP1B1の基質依存的な阻害について網羅的に検討した。12の臨床基質薬を用い、CsA、RIF、GEM、およびGEM-gluのOATP1B1に対する阻害活性を検証した結果、 $K_i$ 値がそれぞれ6.3、3.4、26、および15倍乖離し、OATP1B1が顕著な基質依存的な阻害を示すことを明らかにした。

続いて、創薬の探索段階から当局申請を企図した試験まで幅広く使用可能なプローブ基質を見出すために、②OATP1B1阻害活性を鋭敏に検出し、DDIリスクを過小評価しない理想的なRIプローブ基質の選出を試みた。代表的なOATP1B1のRI基質である $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ 、 $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ 、および $[^3\text{H}]\text{BSP}$ に着目し、15化合物のOATP1B1に対する阻害能を評価した結果、場合によっては基質間で $K_i$ 値が100倍以上乖離することを示した。また、OATP1B1の典型基質として古くから用いられてきた $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ はOATP1B1阻害を鋭敏に検出可能であり、かつ、臨床基質薬と同等の $K_i$ 値を与えるが、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と同様にOATP1B1の典型的基質として使用されてきた $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ および $[^3\text{H}]\text{BSP}$ は、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ に比べて被験物質の阻害活性を弱く見積もることを明らかにした。

さらに、基質依存的な阻害に起因する $K_i$ 値の相違がDDIリスク評価結果に与える影響についても検討した。規制当局のDDI(ドラフト)ガイダンス・ガイドラインに則り、臨床でOATP1B1を阻害するCsA、RIF、およびGEM(およびGEM-glu)に対してR値を算出したところ、臨床において強力なOATP1B1阻害剤であるCsAおよびRIF

については、阻害試験に用いるプローブ基質あるいは当局の定める R 値のカットオフ値によらず、DDI リスクを検出することができた。一方、GEM (および GEM-glu) の DDI リスク評価では、阻害試験で使用するプローブ基質、ならびにカットオフ値に依存して DDI リスクの判定結果に差異を生じた。GEM のような弱～中程度の阻害剤の場合、実際に臨床で観察される OATP1B1 基質薬の AUC 上昇率はわずかかもしれないが、基質薬の安全域が狭い場合には重篤な副作用につながり得るため、DDI リスクを適切に検出する必要がある。 [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G をプローブ基質とした場合には、規制当局のカットオフ値によらず、いずれの阻害剤の DDI リスクも検出できていたことから、 [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G は DDI リスクの過小評価を回避する上で有用な OATP1B1 プローブ基質であることが明らかとなった。Table 1 に代表される数多くの医薬品が OATP1B1 の基質として報告されており、したがって医薬品候補化合物が臨床現場で不特定多数の OATP1B1 基質薬と併用される蓋然性が高い。このような場合には、 [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G を基質薬の代替プローブ基質として選択し、OATP1B1 阻害評価を実施することが望ましいと考える。

OATP1B1 で認められた顕著な基質依存的な阻害作用は、OATP1B1 分子内に複数の基質結合部位が存在することに起因すると考えられた。そこで、OATP1B1 の典型的 RI 基質 ([ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G, [ $^3\text{H}$ ]E<sub>1</sub>S, および [ $^3\text{H}$ ]BSP) を用いて、3 基質間の相互阻害様式を検討した。BSP が [ $^3\text{H}$ ]E<sub>2</sub>G の輸送を非競合的に阻害するなど、OATP1B1 に複数の基質結合部位が存在することが示唆され、このことが基質依存的阻害の要因の一つと考えられた。しかながら、3 基質間で認められた阻害様式を説明し得るモデルの構築には至らなかった。今後、X 線結晶構造解析法などの構造解析法により OATP1B1 の構造情報が得られれば、基質依存的な阻害の原因究明も可能になるものと期待される。

OATP1B1 阻害に起因する DDI リスクの少ない医薬品を創出する上で、創薬初期段階から合成化合物の OATP1B1 に対する阻害活性を評価し、得られた構造活性相関

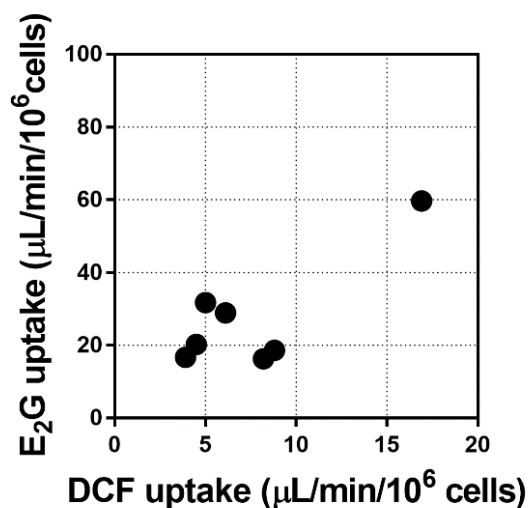


を速やかに合成展開へ活用することが大切である。そのためには、多検体に対して OATP1B1 阻害スクリーニング評価を実施することが不可欠であるが、従来の RI 法はスループット性に課題があった。そこで本研究では③ RI 基質と等価な蛍光基質を見出し、スループット性に優れた蛍光阻害評価系を構築することで課題の解決を試みた。FL 誘導体が強蛍光性を有し、生理的条件下においてアニオン性化合物であることに着目し、各種 OATP 発現細胞を用いて取り込み活性を検討した。その結果、DCF、OG、および DBF を新規 OATP1B1 蛍光基質として見出し、その中でも特に DCF は既存の蛍光基質を上回る良好な OATP1B1 基質であることを明らかにした。さらに、DCF を基質とした時に得られた各種阻害剤の OATP1B1 に対する  $K_i$  値は、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  を用いた際と同等であったことから、基質依存的阻害に起因する DDI の過小評価を回避する上でも DCF は有用なプローブ基質であることが判明した。DCF を用いた新規蛍光阻害評価系の構築により、従来法に比べスループット性が著しく改善し、現在創薬現場において有用なツールとして活用されている。また、当局申請を企図した OATP1B1 阻害試験では依然として RI 法での評価が主流であるが、DCF は $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$  と同等の  $K_i$  値ならびに DDI リスク評価結果が得られることから、DCF を用いた蛍光法に置き換えることも可能である。本研究により、非臨床における OATP1B1 を介した DDI リスクの適正評価が推進され、DDI リスクの低い、より安全な医薬品の創出に貢献するものと確信している。

さらに、本研究で見出した蛍光基質 DCF は、OATP1B1 強制発現細胞以外の実験系への応用も期待される。例えば、ヒト肝細胞は医薬品候補化合物のヒト肝クリアランスを予測する上で重要なツールとなっているが、OATP1B1 活性に大きなロット間差があることが知られている。肝クリアランスの過小評価を避ける上で、高い OATP1B1 活性を保持するヒト肝細胞ロットを選定しクリアランス予測に使用すること

が求められる。本研究結果より DCF は OATP1B1 への選択性の高い基質であることが示唆されており、DCF のような蛍光プローブ基質を使用することでロット選定を迅速に進めることができるものと期待される (Figure 22)。また、本研究では DCF の肝取り込み過程に関わる OATP ファミリートランスポーターのみに着目したが、肝細胞胆管側膜に発現する排泄トランスポーターの関与が明らかとなれば、サンドイッチ培養ヒト肝細胞 (sandwich-cultured human hepatocytes) や、Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞などの極性細胞に OATP1B1 と排泄トランスポーターを共発現させた double-transfected 細胞系による方向性輸送実験などへの適用も期待され<sup>92-93</sup>、取り込み・排泄の両過程を含めた阻害評価が可能になるかもしれない。

本研究の成果がこれからのトランスポーター研究の礎となることを願う。



**Figure 22.** Comparison of hepatic uptake clearance of DCF and E<sub>2</sub>G obtained with 7 batches of human cryopreserved hepatocytes.

# 第六章

## 実験の部

## 第六章 実験の部

### 第一節 **Materials and Methods**

[<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G (48.9 – 50.3 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S (45.6 – 54.3 Ci/mmol), and [<sup>3</sup>H]cholecystokinin octapeptide (CCK-8) (80.0 Ci/mmol) were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). [<sup>3</sup>H]BSP (5.5 Ci/mmol) was synthesized by Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Germany). Unlabeled BSP, DBF, E<sub>2</sub>G sodium salt, E<sub>1</sub>S sodium salt, gemfibrozil (GEM), ketoconazole, probenecid, rifampin (RIF), repaglinide, sodium taurocholate (TCA), and verapamil hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cimetidine, cyclosporin A (CsA), erythromycin, pitavastatin calcium, pravastatin sodium, and glibenclamide (glyburide) were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). BCECF, calcein, and fluo-3 were from Dojindo (Kumamoto, Japan). Atorvastatin calcium trihydrate, rosuvastatin calcium, tacrolimus, and valsartan were purchased from LKT Laboratories (St. Paul, MN), and fluvastatin sodium, fexofenadine hydrochloride, gemfibrozil 1-O-β-glucuronide (GEM-glu), and bosentan were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). DCF, FL, and torasemide were obtained from Tokyo Chemical Industries (Tokyo, Japan). CDCF mixed isomer and OG were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Nateglinide, 5-CF, 6-CF, 8-FcA, and ritonavir obtained from Tocris Bioscience (Minneapolis, NM), Calbiochem (Darmstadt, Germany), AnaSpec (Fremont, CA), Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany), and Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), respectively. All other chemicals were of analytic grade and commercially available.

### 第二節 **Transporter-expressing cells**

The open reading frame of OATP1B1/SLCO1B1, OATP1B3/SLCO1B3 or OATP2B1/SLCO2B1 was subcloned into the KpnI/XhoI sites of expression vector pcDNA3.1/Hygro (+) (Invitrogen,

Carlsbad, CA), and the inserted sequence was confirmed by DNA sequencing. The expression vector with or without cDNA of OATP1B1, OATP1B3, or OATP2B1 was transfected into human embryonic kidney 293 (HEK293) cells using Lipofectamin 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. HEK293 cells stably expressing OATP1B1, OATP1B3, or OATP2B1 were obtained by hygromycin B selection. The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum, penicillin (final concentration, 100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL), and hygromycin B (80 µg/mL) in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **第三節 Uptake and Inhibition Studies Using Transporter-expressing Cell.**

For cell seeding, the cells were trypsinized and uniformly suspended in the designated volume of the culture medium to provide  $4 \times 10^5$  cells/mL. One mL of the cell suspension was added to each well of a poly-D-lysine-coated 24-well plate (BD Biosciences, San Jose, CA), and the cells were further cultured in the incubator for 48 hours. The transport study was carried out as described previously<sup>9</sup>. In brief, cell culture medium was replaced with prewarmed Krebs Henseleit (KH) buffer (118 mM NaCl, 23.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.83 mM KCl, 0.96 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.20 mM MgSO<sub>4</sub>, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM glucose, and 1.53 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), and the cells were preincubated for 5 min at 37°C. The preincubation buffer was aspirated, and the uptake reaction was initiated by addition of 250 µL of a prewarmed KH buffer containing a substrate with or without an inhibitor. For inhibition studies with CsA, BSP, ritonavir, RIF, tacrolimus, E<sub>2</sub>G, and GEM, each of the dimethylsulfoxide (DMSO) original solutions was prepared, serially diluted with DMSO, and 1,000-fold diluted with KH buffer containing a substrate (final DMSO concentration 0.1%). KH buffer containing a substrate and 0.1% DMSO without any inhibitors was used as the solvent control. For E<sub>1</sub>S, erythromycin, TCA, probenecid, and cimetidine, each

of the compounds was directly dissolved in KH buffer containing a substrate and serially diluted with KH buffer containing the substrate. For ketoconazole and verapamil, each of the compounds was completely dissolved in KH buffer containing a substrate at acidic pH to prepare the original solution, which was serially diluted with KH buffer containing the substrate to prepare the working solutions. The pH of the working solutions was adjusted at 7.4 before the inhibition assays. KH buffer containing a substrate without any inhibitors was used as the control for inhibition studies with E<sub>1</sub>S, erythromycin, TCA, ketoconazole, verapamil, probenecid, and cimetidine. At the designated time, the buffer was aspirated, and the cells were washed twice with 1 mL of ice-cold KH buffer.

When the RI-labeled substrates (<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>G, [<sup>3</sup>H]E<sub>1</sub>S, and [<sup>3</sup>H]BSP) were used, cells were lysed with 0.5 mL of 0.1 N NaOH overnight at room temperature. The resulting cell lysate was neutralized with 50 µL of 1N HCl. A 400-µL sample of the aliquot was mixed with 4 mL of scintillation fluid (Hionic-Fluor; PerkinElmer Life Sciences), and the radioactivities associated with the cells and incubation buffer were measured with a liquid scintillation counter (Tri-Carb 3100TR; PerkinElmer Life Sciences). Remaining neutralized cell lysate samples were used to quantify protein concentrations (BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

For the cellular uptake studies with unlabeled substrates (pitavastatin, atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin, pravastatin, repaglinide, nateglinide, glibenclamide, bosentan, valsartan, torasemide, and fexofenadine), the cells were vigorously mixed and deproteinized with 250 µL of methanol containing an appropriate internal standard, which was followed by centrifugation. The obtained supernatant was filtrated, and the resulting filtrates were subjected to high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis. Chromatography was performed using an Atlantis T3 column (3.0 µm, 2.1 mm i.d., 50 mm; Waters, Milford, MA) at a flow rate of 0.3 mL/min. Distilled water containing 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile containing 0.1% formic acid (solvent B) were used as the mobile phases. The initial condition was 100% solvent A; the percentage of solvent B was linearly increased to 80% over 3 min, then to 100%

over the next 0.01 min, and was maintained at this level for 1 min. The column was equilibrated with the initial mobile phase before each injection (injection volume, 10  $\mu$ L). A Quattro Premier mass spectrometer (Waters) was used for the detection. The analytes were ionized by electrospray ionization in positive or negative (only for pravastatin) ion mode, and the selected ion monitoring transitions were: 422.2 > 274.0 for pitavastatin, 559.3 > 249.9 for atorvastatin, 412.2 > 265.9 for fluvastatin, 482.4 > 258.0 for rosuvastatin, 423.3 > 320.9 for pravastatin, 453.3 > 230.0 for repaglinide, 318.3 > 68.7 for nateglinide, 494.3 > 368.9 for glibenclamide, 552.3 > 201.8 for bosentan, 436.4 > 180.0 for valsartan, 349.3 > 263.9 for torasemide, and 502.7 > 466.3 for fexofenadine. In the studies with unlabeled substrates, extra cells were prepared to quantify the protein amount per well.

For the fluorescent compounds (FL, OG, DCF, DBF, 5-CF, 6-CF, CDCF, BCECF, calcein, fluo-3, and 8-FcA), the cells were lysed overnight with 0.1 N NaOH (500  $\mu$ L/well) at room temperature, and 200  $\mu$ L each of the cell lysate samples was directly used for measuring the fluorescence intensity with a microplate spectrofluorometer (SpectraMax M2; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Calibration curves were prepared by spiking each fluorescent compound solution to 0.1 N NaOH (0.1 to 1000 nmol/L). For calcein or fluo-3, 4  $\mu$ L of 50 mM  $\text{CaCl}_2$  was added to 200  $\mu$ L of the cell lysate and samples for calibration curves before measuring the fluorescence intensity because they require  $\text{Ca}^{2+}$  to emit fluorescence under the alkaline condition. The fluorescence intensity of all dyes was measured at 515 nm with excitation at 490 nm. Remaining cell lysate samples (300  $\mu$ L/well) were neutralized with 30  $\mu$ L of 1N HCl, and used to quantify protein concentration.

#### **第四節 Determination of Kinetic Parameters**

Uptake of a substrate was expressed as the uptake volume ( $\mu$ L/mg protein), which was given as the amount of the substrate taken up into the cells (dpm or pmol/well) divided by the product of

the substrate concentration in the incubation buffer (dpm or pmol/ $\mu$ L) and the protein amount (mg protein/well). Transporter-mediated uptake was obtained by subtracting the uptake into control cells from the uptake into transporter-transfected cells.

Concentration dependence of the uptake of a substrate mediated by OATP1B1 was analyzed using the following Michaelis-Menten equation:

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (1)$$

where  $v$ ,  $S$ ,  $K_m$ , and  $V_{\max}$  represent uptake velocity of the substrate (pmol/min/mg protein), the substrate concentration in the incubation buffer ( $\mu$ M), Michaelis constant ( $\mu$ M), and the maximum uptake rate (pmol/min/mg protein), respectively. When nonsaturable component was observed, the following equation was used for the analysis:

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} + P_{\text{dif}} \times S \quad (2)$$

where  $P_{\text{dif}}$  represents nonsaturable uptake clearance ( $\mu$ L/min/mg protein). Fitting was performed by a nonlinear least-squares regression method using MULTI program<sup>94</sup>.

$IC_{50}$  of an inhibitor was estimated by examining the inhibitory effect on the uptake of a substrate (% of control) using the following equation:

$$\text{uptake (\% of control)} = \frac{CL_i}{CL} \times 100 = \frac{P}{1 + \frac{I}{IC_{50}}} \quad (3)$$

where  $CL$  and  $CL_i$  represent the uptake clearance in the absence and presence of an inhibitor, respectively, and  $I$  ( $\mu$ M) is the concentration of the inhibitor.  $P$  was set as a free parameter to achieve the best fit in the nonlinear iterative least squares regression analysis. To the inhibitor which showed biphasic inhibition for OATP1B1, the following equation was applied:

$$\text{uptake (\% of control)} = \frac{CL_i}{CL} \times 100 = \frac{P_1}{1 + \frac{I}{IC_{50,1}}} + \frac{P_2}{1 + \frac{I}{IC_{50,2}}} \quad (4)$$



where  $IC_{50,1}$  and  $IC_{50,2}$  represent  $IC_{50}$  values for high- and low-affinity components, respectively.  $P_1$  and  $P_2$  are parameters for high- and low-affinity components, and  $P_1/(P_1 + P_2)$  and  $P_2/(P_1 + P_2)$  represent the contribution of high- and low-affinity components, respectively.

For the inhibition of OATP1B1-mediated uptake of DCF by E<sub>1</sub>S, the data were fitted to the following equation to estimate the  $IC_{50}$  value:

$$uptake(\% \text{ of control}) = \frac{CL_i}{CL} \times 100 = \frac{P}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} + P_0 \quad (5)$$

where  $P_0$  represents the non-inhibitable component that was observed even at the maximum tested concentration of E<sub>1</sub>S.  $P$  and  $P_0$  (initial value of  $P + P_0 = 100$ ) were set as free parameters.

When the substrate concentrations were sufficiently lower than their  $K_m$  values in the inhibition studies,  $IC_{50}$  values of inhibitors theoretically approximates the  $K_i$  regardless of inhibition mechanisms, except in the case of uncompetitive inhibition<sup>95</sup>. When the substrate concentrations were not sufficiently lower than their  $K_m$  values, the inhibition constant ( $K_i$ ) was estimated by the following equation with the assumption of competitive inhibition<sup>47</sup>:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S'}{K_m}} \quad (6)$$

where  $S'$  and  $K_m$  represent the substrate concentration in the incubation buffer used for inhibition studies and Michaelis constant of the substrate for OATP1B1, respectively. The parameters were estimated by a nonlinear least-squares regression method using the MULTI program<sup>94</sup> and expressed as the mean  $\pm$  computer-calculated SD.

## 第五節 Statistical Analysis

The data are presented as mean  $\pm$  SD. One-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test was used to identify significant differences between groups where appropriate.  $P < 0.05$  was considered significant.

## 第六節 Prediction of OATP1B1-mediated Drug-drug Interactions with a Static Model

The degree of inhibition of OATP1B1-mediated hepatic uptake (R-value) was calculated for 4 inhibitors (CsA, RIF, GEM, and GEM-glu) based on the DDI guidelines and draft guidance materials released by regulatory agencies in U.S.,<sup>27</sup> E.U.,<sup>28</sup> and Japan.<sup>29</sup> The decision tree of U.S. FDA for the inhibition of hepatic uptake transporters including OATP1B1 consists of 2 steps and recommends to evaluate the inhibition potential of an investigational drug on OATP1B1 using the following R-value as the first step:

$$R = 1 + \sum \frac{C_{max}}{K_i} \quad (7)$$

where  $C_{max}$  represents the maximum systemic total (bound + unbound) plasma concentration of the inhibitor. U.S. FDA (the second step), EMA, and MHLW recommend to evaluate the inhibitory potential of an investigational drug on OATP1B1 using the following R-value:

$$R = 1 + \sum \frac{[I]_{u,inlet,max}}{K_i} \quad (8)$$

where  $[I]_{u,inlet,max}$  represents the estimated maximum unbound inhibitor concentration at the inlet to the liver and is defined as follows:<sup>95</sup>

$$[I]_{u,inlet,max} = f_u \times \left( I_{max} + \frac{k_a \times F_a \times F_g \times Dose}{Q_h} \right) \quad (9)$$

where  $f_u$  is the unbound fraction of an inhibitor in blood, which was calculated from the unbound fraction in plasma assuming the blood to plasma concentration ratio to be unity in this study,  $I_{max}$  is the maximum circulating blood concentration of an inhibitor,  $k_a$  is the absorption rate constant of the inhibitor,  $F_a$  is the fraction of the inhibitor dose absorbed,  $F_g$  is the fraction of the absorbed inhibitor dose escaping gut wall extraction,  $Dose$  is the inhibitor dose, and  $Q_h$  is the hepatic blood flow rate (97 L/h).<sup>28-29</sup> To minimize the risk of false-negative DDI prediction,  $k_a = 0.1 \text{ min}^{-1}$  and  $F_a \times F_g = 1$  were applied to the  $[I]_{u,inlet,max}$  calculations in this study.  $Dose$ ,  $f_u$ ,  $C_{max}$ , and  $[I]_{u,inlet,max}$  of CsA, RIF, GEM, and GEM-glu are given in Table 5.

## 第七章

### 特許出願・学会発表

## 第七章 特許出願・学会発表

### 【特許出願】

「OATP1B1 の輸送活性を促進又は阻害する化合物をスクリーニングするための方法、及び OATP1B1 発現量を測定するための方法」

出願番号 JP2012055719

発明者：和泉沙希，野崎芳胤，小森高文（2012年3月6日）

### 【学会発表】

和泉沙希，野崎芳胤，小森高文，前田和哉，竹中理，草野一富，吉村勉，楠原洋之，杉山雄一“Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1: Comparative analysis with prototypical probe substrates, estradiol-17 $\beta$ -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein”28<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, Nov, 2013, Tokyo, Japan

和泉沙希，野崎芳胤，小森高文，前田和哉，竹中理，草野一富，吉村勉，楠原洋之，杉山雄一“Comprehensive Analysis of Substrate-Dependent Inhibition of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: Time-Dependent Inhibition by Cyclosporine A”19<sup>th</sup> North American ISSX and 29<sup>th</sup> JSSX meeting, Oct, 2014, San Francisco, US

和泉沙希，野崎芳胤，前田和哉，小森高文，竹中理，楠原洋之，杉山雄一“Substrate Selection for In Vitro Evaluation of the Inhibitory Effect on Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 to Avoid False-negative Prediction of Drug-drug Interaction”19<sup>th</sup> North American ISSX and 29<sup>th</sup> JSSX meeting, Oct, 2014, San Francisco, US

和泉沙希，野崎芳胤“Impact of Substrate Selection on In Vitro OATP1B1 Inhibition Profiles for the Prediction of DDIs”Open Symposium in Sugiyama’s Laboratory, Jun, 2015, Tokyo, Japan

和泉沙希, 野崎芳胤, 小森高文, 竹中理, 前田和哉, 楠原洋之, 杉山雄一  
“Investigation of fluorescein derivatives as substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 to develop sensitive fluorescence-based OATP1B1 inhibition assays”20<sup>th</sup> North American ISSX meeting, Oct, 2015, Orlando, Florida, US

和泉沙希, 野崎芳胤, 小森高文“Prediction of in vivo human hepatic clearance of organic anion transporting polypeptide substrate drugs from the hepatic uptake in cryopreserved human hepatocytes”2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, Oct, 2015, Orlando, Florida, US

和泉沙希, 野崎芳胤, 小森高文“Comparative evaluation of prediction methods for human hepatic clearance of organic anion transporting polypeptide (OATP) substrate drugs”30<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, Nov, 2015, Tokyo, Japan

和泉沙希“SLC トランスポーター阻害評価について”第 367 回 CBI 学会講演会, Tokyo, Japan

和泉沙希, 野崎芳胤, 小森高文, 前田和哉, 楠原洋之, 杉山雄一“Quantitative prediction of hepatic uptake clearance mediated by organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 using relative activity factor-based scaling approach”31<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, Oct, 2016, Matsumoto, Japan

# 第八章

## 参考文献

## 第八章 引用文献

1. Giacomini, K.; Huang, S.; Tweedie, D.; Benet, L.; Brouwer, K.; Chu, X.; Dahlin, A.; Evers, R.; Fischer, V.; Hillgren, K., Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (3), 215-236.
2. Mizuno, N.; Niwa, T.; Yotsumoto, Y.; Sugiyama, Y., Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological Reviews* **2003**, *55* (3), 425-461.
3. Tsuji, A., Transporter-mediated drug interactions. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2002**, *17* (4), 253-274.
4. Niemi, M.; Pasanen, M. K.; Neuvonen, P. J., Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacological Reviews* **2011**, *63* (1), 157-181.
5. Maeda, K., Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2015**, *38* (2), 155-168.
6. König, J.; Cui, Y.; Nies, A. T.; Keppler, D., Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (30), 23161-23168.
7. Badée, J.; Achour, B.; Rostami-Hodjegan, A.; Galetin, A., Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. *Drug Metabolism and Disposition* **2015**, *43* (4), 424-432.
8. Kunze, A.; Huwylar, J.; Camenisch, G.; Poller, B., Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metabolism and Disposition* **2014**, *42* (9), 1514-1521.
9. Hirano, M.; Maeda, K.; Shitara, Y.; Sugiyama, Y., Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *311* (1), 139-146.

10. Williamson, B.; Soars, A. C.; Owen, A.; White, P.; Riley, R. J.; Soars, M. G., Dissecting the relative contribution of OATP1B1-mediated uptake of xenobiotics into human hepatocytes using siRNA. *Xenobiotica* **2013**, *43* (10), 920-931.
11. Kitamura, S.; Maeda, K.; Wang, Y.; Sugiyama, Y., Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, *36* (10), 2014-2023.
12. Yamashiro, W.; Maeda, K.; Hirouchi, M.; Adachi, Y.; Hu, Z.; Sugiyama, Y., Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34* (7), 1247-1254.
13. Shitara, Y.; Sugiyama, Y., Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *112* (1), 71-105.
14. Ho, R. H.; Choi, L.; Lee, W.; Mayo, G.; Schwarz, U. I.; Tirona, R. G.; Bailey, D. G.; Stein, C. M.; Kim, R. B., Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. *Pharmacogenetics and genomics* **2007**, *17* (8), 647-656.
15. Lee, E.; Ryan, S.; Birmingham, B.; Zalikowski, J.; March, R.; Ambrose, H.; Moore, R.; Lee, C.; Chen, Y.; Schneck, D., Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2005**, *78* (4), 330-341.
16. Tomita, Y.; Maeda, K.; Sugiyama, Y., Ethnic variability in the plasma exposures of OATP1B1 substrates such as HMG-CoA reductase inhibitors: a kinetic consideration of its mechanism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2013**, *94* (1), 37-51.



17. Birmingham, B. K.; Bujac, S. R.; Elsby, R.; Azumaya, C. T.; Zalikowski, J.; Chen, Y.; Kim, K.; Ambrose, H. J., Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in Caucasian and Asian subjects residing in the United States. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2015**, *71* (3), 329-340.
18. Lee, H. H.; Ho, R. H., Interindividual and interethnic variability in drug disposition: polymorphisms in organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1; SLCO1B1). *British Journal of Clinical Pharmacology* **2017**, *83* (6), 1176-1184.
19. The SEARCH Collaborative Group, SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy — a genomewide study. *New England Journal of Medicine* **2008**, *359* (8), 789-799.
20. van de Steeg, E.; Stránecký, V.; Hartmannová, H.; Nosková, L.; Hřebíček, M.; Wagenaar, E.; van Esch, A.; de Waart, D. R.; Oude Elferink, R. P. J.; Kenworthy, K. E.; Sticová, E.; al-Edreesi, M.; Knisely, A. S.; Kmoch, S.; Jirsa, M.; Schinkel, A. H., Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. *The Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122* (2), 519-528.
21. Yoshida, K.; Maeda, K.; Sugiyama, Y., Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2013**, *53* (1), 581-612.
22. Maeda, K.; Ikeda, Y.; Fujita, T.; Yoshida, K.; Azuma, Y.; Haruyama, Y.; Yamane, N.; Kumagai, Y.; Sugiyama, Y., Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *90* (4), 575-581.
23. Shitara, Y.; Itoh, T.; Sato, H.; Li, A. P.; Sugiyama, Y., Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *304* (2), 610-616.

24. Yoshida, K.; Maeda, K.; Sugiyama, Y., Transporter-mediated drug–drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2012**, *91* (6), 1053-1064.
25. Chiou, W. J.; de Morais, S. M.; Kikuchi, R.; Voorman, R. L.; Li, X.; Bow, D. A. J., In vitro OATP1B1 and OATP1B3 inhibition is associated with observations of benign clinical unconjugated hyperbilirubinemia. *Xenobiotica* **2014**, *44* (3), 276-282.
26. Campbell, S. D.; de Morais, S. M.; Xu, J. J., Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP 1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia. *Chemico-Biological Interactions* **2004**, *150* (2), 179-187.
27. Center for Drug Evaluation and Research, Drug interaction studies – study design analysis, implications for dosing, and labeling recommendations: Draft guidance. *Food and Drug Administration, Silver Spring, MD*. **2012**.
28. Committee for Human Medicinal Products, Guideline on the investigation of drug interactions. *European Medicines Agency, London*. **2012**.
29. Ministry of Health, Labour and Welfare, Drug interaction guideline for drug development and provision of appropriate information (draft). in Japanese. <http://www.nihs.go.jp/mhlw/20131488.pdf>. **2014**.
30. Hirano, M.; Maeda, K.; Shitara, Y.; Sugiyama, Y., Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34* (7), 1229-1236.
31. Sharma, P.; Butters, C. J.; Smith, V.; Elsbey, R.; Surry, D., Prediction of the in vivo OATP1B1-mediated drug–drug interaction potential of an investigational drug against a range of statins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47* (1), 244-255.
32. Kudo, T.; Hisaka, A.; Sugiyama, Y.; Ito, K., Analysis of the repaglinide concentration increase produced by gemfibrozil and itraconazole based on the inhibition of the hepatic

- uptake transporter and metabolic enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, *41* (2), 362-371.
33. Imamura, Y.; Murayama, N.; Okudaira, N.; Kurihara, A.; Okazaki, O.; Izumi, T.; Inoue, K.; Yuasa, H.; Kusuhara, H.; Sugiyama, Y., Prediction of fluoroquinolone-induced elevation in serum creatinine levels: a case of drug–endogenous substance interaction involving the inhibition of renal secretion. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *89* (1), 81-88.
34. Noé, J.; Portmann, R.; Brun, M.-E.; Funk, C., Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35* (8), 1308-1314.
35. Racha, J. K.; Zhao, Z. S.; Olejnik, N.; Warner, N.; Chan, R.; Moore, D.; Satoh, H., Substrate dependent inhibition profiles of fourteen drugs on CYP3A4 activity measured by a high throughput LCMS/MS method with four probe drugs, midazolam, testosterone, nifedipine and terfenadine. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2003**, *18* (2), 128-138.
36. Yuan, R.; Madani, S.; Wei, X.-X.; Reynolds, K.; Huang, S.-M., Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, *30* (12), 1311-1319.
37. Kumar, V.; Wahlstrom, J. L.; Rock, D. A.; Warren, C. J.; Gorman, L. A.; Tracy, T. S., CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitro inhibition profiles. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34* (12), 1966-1975.
38. Roth, M.; Timmermann, B. N.; Hagenbuch, B., Interactions of green tea catechins with organic anion-transporting polypeptides. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39* (5), 920-926.
39. Gui, C.; Miao, Y.; Thompson, L.; Wahlgren, B.; Mock, M.; Stieger, B.; Hagenbuch, B., Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. *European Journal of Pharmacology* **2008**, *584* (1), 57-65.

40. Vildhede, A.; Karlgren, M.; Svedberg, E. K.; Wisniewski, J. R.; Lai, Y.; Norén, A.; Artursson, P., Hepatic uptake of atorvastatin: influence of variability in transporter expression on uptake clearance and drug-drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* **2014**, *42* (7), 1210-1218.
41. Shirasaka, Y.; Mori, T.; Shichiri, M.; Nakanishi, T.; Tamai, I., Functional pleiotropy of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 due to multiple binding sites. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2012**, *27* (3), 360-364.
42. Zolk, O.; Solbach, T. F.; König, J.; Fromm, M. F., Structural determinants of inhibitor interaction with the human organic cation transporter OCT2 (SLC22A2). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2009**, *379* (4), 337-348.
43. Belzer, M.; Morales, M.; Jagadish, B.; Mash, E. A.; Wright, S. H., Substrate-dependent ligand inhibition of the human organic cation transporter OCT2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2013**, *346* (2), 300-310.
44. Shen, H.; Yang, Z.; Zhao, W.; Zhang, Y.; Rodrigues, A. D., Assessment of vandetanib as an inhibitor of various human renal transporters: inhibition of multidrug and toxin extrusion as a possible mechanism leading to decreased cisplatin and creatinine clearance. *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, *41* (12), 2095-2103.
45. Soars, M. G.; Barton, P.; Ismail, M.; Jupp, R.; Riley, R. J., The development, characterization, and application of an OATP1B1 inhibition assay in drug discovery. *Drug Metabolism and Disposition* **2012**, *40* (8), 1641-1648.
46. Karlgren, M.; Ahlin, G.; Bergström, C. A. S.; Svensson, R.; Palm, J.; Artursson, P., In vitro and in silico strategies to identify OATP1B1 inhibitors and predict clinical drug-drug interactions. *Pharmaceutical Research* **2012**, *29* (2), 411-426.
47. Amundsen, R.; Christensen, H.; Zabihiyan, B.; Åsberg, A., Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metabolism and Disposition* **2010**, *38* (9), 1499-1504.

48. Kameyama, Y.; Yamashita, K.; Kobayashi, K.; Hosokawa, M.; Chiba, K., Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenetics and Genomics* **2005**, *15* (7), 513-522.
49. Lau, Y. Y.; Huang, Y.; Frassetto, L.; Benet, L. Z., Effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *81* (2), 194-204.
50. Ho, R. H.; Tirona, R. G.; Leake, B. F.; Glaeser, H.; Lee, W.; Lemke, C. J.; Wang, Y.; Kim, R. B., Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology* **2006**, *130* (6), 1793-1806.
51. van de Steeg, E.; Greupink, R.; Schreurs, M.; Nooijen, I. H. G.; Verhoeckx, K. C. M.; Hanemaaijer, R.; Ripken, D.; Monshouwer, M.; Vlaming, M. L. H.; DeGroot, J.; Verwei, M.; Russel, F. G. M.; Huisman, M. T.; Wortelboer, H. M., Drug-drug interactions between rosuvastatin and oral antidiabetic drugs occurring at the level of OATP1B1. *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, *41* (3), 592-601.
52. Hsiang, B.; Zhu, Y.; Wang, Z.; Wu, Y.; Sasseville, V.; Yang, W.-P.; Kirchgessner, T. G., A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (52), 37161-37168.
53. Treiber, A.; Schneider, R.; Häusler, S.; Stieger, B., Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35* (8), 1400-1407.

54. Poirier, A.; Cascais, A.-C.; Funk, C.; Lavé, T., Prediction of pharmacokinetic profile of valsartan in humans based on in vitro uptake-transport data. *Chemistry & Biodiversity* **2009**, *6* (11), 1975-1987.
55. Werner, U.; Werner, D.; Heinbüchner, S.; Graf, B.; Ince, H.; Kische, S.; Thürmann, P.; König, J.; Fromm, M. F.; Zolk, O., Gender Is an important determinant of the disposition of the loop diuretic torasemide. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2010**, *50* (2), 160-168.
56. Tornio, A.; Niemi, M.; Neuvonen, M.; Laitila, J.; Kalliokoski, A.; Neuvonen, P. J.; Backman, J. T., The effect of gemfibrozil on repaglinide pharmacokinetics persists for at least 12 h after the dose: evidence for mechanism-based inhibition of CYP2C8 in vivo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *84* (3), 403-411.
57. Kenworthy, K. E.; Bloomer, J. C.; Clarke, S. E.; Houston, J. B., CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1999**, *48* (5), 716-727.
58. Obach, R. S.; Walsky, R. L.; Venkatakrishnan, K.; Gaman, E. A.; Houston, J. B.; Tremaine, L. M., The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, *316* (1), 336-348.
59. Sharma, P.; Holmes, V. E.; Elsbey, R.; Lambert, C.; Surry, D., Validation of cell-based OATP1B1 assays to assess drug transport and the potential for drug-drug interaction to support regulatory submissions. *Xenobiotica* **2010**, *40* (1), 24-37.
60. Cui, Y.; König, J.; Leier, I.; Buchholz, U.; Keppler, D., Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (13), 9626-9630.
61. Kindla, J.; Müller, F.; Mieth, M.; Fromm, M. F.; König, J., Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39* (6), 1047-1053.

62. Mück, W.; Mai, I.; Fritsche, L.; Ochmann, K.; Rohde, G.; Unger, S.; Johne, A.; Bauer, S.; Budde, K.; Roots, I.; Neumayer, H.-H.; Kuhlmann, J., Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *65* (3), 251-261.
63. Lemaire, M.; Tillement, J. P., Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1982**, *34* (11), 715-718.
64. Burman, W. J.; Gallicano, K.; Peloquin, C., Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, *40* (5), 327-341.
65. Shitara, Y.; Hirano, M.; Sato, H.; Sugiyama, Y., Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1:SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: Analysis of the Mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *311* (1), 228-236.
66. Okerholm, R.; Keeley, F.; Peterson, F.; Glazko, A., The metabolism of gemfibrozil. *Proceeding of the Royal Society Medicine* **1976**, *69* (Suppl 2), 11-14.
67. Prueksaritanont, T.; Chu, X.; Evers, R.; Klopfer, S. O.; Caro, L.; Kothare, P. A.; Dempsey, C.; Rasmussen, S.; Houle, R.; Chan, G.; Cai, X.; Valesky, R.; Fraser, I. P.; Stoch, S. A., Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2014**, *78* (3), 587-598.
68. Simonson, S. G.; Raza, A.; Martin, P. D.; Mitchell, P. D.; Jarcho, J. A.; Brown, C. D. A.; Windass, A. S.; Schneck, D. W., Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2004**, *76* (2), 167-177.

69. Binet, I.; Wallnöfer, A.; Weber, C.; Jones, R.; Thiel, G., Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A. *Kidney international* **2000**, *57*, 224-231.
70. van Giersbergen, P. L. M.; Treiber, A.; Schneiter, R.; Dietrich, H.; Dingemans, J., Inhibitory and inductive effects of Rifampin on the pharmacokinetics of bosentan in healthy subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *81* (3), 414-419.
71. Kusuhashi, H.; Miura, M.; Yasui-Furukori, N.; Yoshida, K.; Akamine, Y.; Yokochi, M.; Fukizawa, S.; Ikejiri, K.; Kanamitsu, K.; Uno, T.; Sugiyama, Y., Effect of coadministration of single and multiple doses of rifampicin on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in healthy subjects. *Drug Metabolism and Disposition* **2013**, *41* (1), 206-213.
72. Korzekwa, K. R.; Krishnamachary, N.; Shou, M.; Ogai, A.; Parise, R. A.; Rettie, A. E.; Gonzalez, F. J.; Tracy, T. S., Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* **1998**, *37* (12), 4137-4147.
73. Dong, P.-p.; Fang, Z.-z.; Zhang, Y.-y.; Ge, G.-b.; Mao, Y.-x.; Zhu, L.-l.; Qu, Y.-q.; Li, W.; Wang, L.-m.; Liu, C.-x.; Yang, L., Substrate-dependent modulation of the catalytic activity of CYP3A by erlotinib. *Acta Pharmacologica Sinica* **2011**, *32* (3), 399-407.
74. Tamai, I.; Nozawa, T.; Koshida, M.; Nezu, J.-i.; Sai, Y.; Tsuji, A., Functional Characterization of Human Organic Anion Transporting Polypeptide B (OATP-B) in Comparison with Liver-Specific OATP-C. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18* (9), 1262-1269.
75. Maglova, L. M.; Jackson, A. M.; Meng, X.-J.; Carruth, M. W.; Scheingart, C. D.; Ton-Nu, H.-T.; Hofmann, A. F.; Weinman, S. A., Transport characteristics of three fluorescent conjugated bile acid analogs in isolated rat hepatocytes and couplets. *Hepatology* **1995**, *22* (2), 637-647.



76. Yamaguchi, H.; Okada, M.; Akitaya, S.; Ohara, H.; Mikkaichi, T.; Ishikawa, H.; Sato, M.; Matsuura, M.; Saga, T.; Unno, M.; Abe, T.; Mano, N.; Hishinuma, T.; Goto, J., Transport of fluorescent chenodeoxycholic acid via the human organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Journal of Lipid Research* **2006**, *47* (6), 1196-1202.
77. Annaert, P.; Ye, Z. W.; Stieger, B.; Augustijns, P., Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica* **2010**, *40* (3), 163-176.
78. de Waart, D. R.; Häusler, S.; Vlaming, M. L. H.; Kunne, C.; Hänggi, E.; Gruss, H.-J.; Oude Elferink, R. P. J.; Stieger, B., Hepatic transport mechanisms of cholyl-L-lysyl-fluorescein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2010**, *334* (1), 78-86.
79. Gui, C.; Obaidat, A.; Chaguturu, R.; Bruno, H., Development of a cell-based high-throughput assay to screen for inhibitors of organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3. *Current chemical genomics* **2010**, *4*, 1-8.
80. Bednarczyk, D., Fluorescence-based assays for the assessment of drug interaction with the human transporters OATP1B1 and OATP1B3. *Analytical Biochemistry* **2010**, *405* (1), 50-58.
81. De Bruyn, T.; Fattah, S.; Stieger, B.; Augustijns, P.; Annaert, P., Sodium fluorescein is a probe substrate for hepatic drug transport mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100* (11), 5018-5030.
82. Baldes, C.; Koenig, P.; Neumann, D.; Lenhof, H. P.; Kohlbacher, O.; Lehr, C. M., Development of a fluorescence-based assay for screening of modulators of human Organic Anion Transporter 1B3 (OATP1B3). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2006**, *62* (1), 39-43.
83. Zamek-Gliszczyński, M. J.; Xiong, H.; Patel, N. J.; Turncliff, R. Z.; Pollack, G. M.; Brouwer, K. L. R., Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and Its diacetate moiety in the liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *304* (2), 801-809.

84. Haugland, R. P., The handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11th ed. <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/references/molecular-probes-the-handbook.html> **2010**.
85. Zhang, X.-F.; Zhang, J.; Liu, L., Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra. *Journal of Fluorescence* **2014**, *24* (3), 819-826.
86. Parker, C. A.; Rees, W. T., Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **1960**, *85* (1013), 587-600.
87. Mottram, L.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B. R., The Pennsylvania Green Fluorophore: a hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-Insensitive molecular probes. *Organic letters* **2006**, *8* (4), 581-584.
88. Ge, F.-Y.; Chen, L.-G., pH fluorescent probes: chlorinated fluoresceins. *Journal of Fluorescence* **2008**, *18* (3), 741-747.
89. Izumi, S.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T., A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (29), 10189-10200.
90. Minta, A.; Kao, J. P.; Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (14), 8171-8178.
91. Technical Information about 8-[Fluo]-cAMP. <http://www.biolog.de/media/TechInfo/F%20002.pdf>.
92. Sasaki, M.; Suzuki, H.; Ito, K.; Abe, T.; Sugiyama, Y., Transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II cell monolayer expressing both human organic anion-transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (8), 6497-6503.

93. Matsushima, S.; Maeda, K.; Kondo, C.; Hirano, M.; Sasaki, M.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y., Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *314* (3), 1059-1067.
94. Yamaoka, K.; Tanigawara, Y.; Nakagawa, T.; Uno, T., A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *Journal of Pharmacobio-dynamics* **1981**, *4* (11), 879-885.
95. Ito, K.; Iwatsubo, T.; Kanamitsu, S.; Ueda, K.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y., Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic Interaction in the liver. *Pharmacological Reviews* **1998**, *50* (3), 387-412.

## 謝辞

本博士論文を作成するにあたり，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室 教授 浦野 泰照先生に甚大なる謝意を表します。また，名誉教授 長野 哲雄先生（現 東京大学創薬機構 客員教授）ならびに準教授 花岡 健二郎先生に深く感謝申し上げます。私が今研究に携わることができておりますのは，東京大学薬学部および東京大学大学院薬学系研究科に在学中より，先生方が忍耐強く，研究の道に導いてくださったお蔭です。

本研究の遂行にあたり，多大なる御助言と御指導を賜りました理化学研究所イノベーションセンター杉山特別研究室 杉山 雄一先生，東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 教授 楠原 洋之先生，ならびに講師 前田 和哉先生に謹んで感謝の意を表します。企業に所属しながらも学会発表や論文発表が行えたのは，先生方が親身に御指導下さったからにほかなりません。

本博士論文を作成するにあたり，貴重なご意見を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬化学教室 教授 大和田 智彦先生，ならびに東京大学医学部附属病院薬剤部 講師 / 第一副部長 高田 龍平先生に心より感謝いたします。

本研究の推進に多大なるご支援を賜りましたエーザイ株式会社 菅沼 彰純博士，草野 一富博士，竹中 理博士，小森 高文博士，野崎 芳胤博士，ならびに薬物動態研究室の皆様へ深謝致します。とりわけ野崎 芳胤博士にはひとかたならぬお世話になりました。私の成長を私以上に考え，時に優しく時に厳しく支えて下さいましたこと，感謝の申し上げようもございません。これから少しずつ御恩をお返ししたく存じます。

最後に，これまで私を温かく見守り，寄り添ってくれた家族に心より感謝いたします。本当に有難う。

平成 29 年 7 月 28 日 和泉 沙希