

論文の内容の要旨

論文題目 メタボローム解析を基盤とした薬物トランスポーター機能評価
 マーカーの同定

氏 名 加藤 幸司

薬物の主要な排泄臓器である肝および腎に発現する薬物トランスポーターは、薬物の全身クリアランスを決定する重要な働きをしている。それゆえ、その機能が低下した際には、血液中または組織中薬物濃度が上昇し、薬物の重篤な副作用発現につながるものが懸念される。近年、薬物トランスポーター遺伝子の一塩基多型（SNPs）が多数見出されているが、そのなかには薬物の重篤な副作用発現と関連するものが存在する。薬物トランスポーターの *in vivo* 活性に影響を与える SNPs を同定することは、薬物の重篤な副作用を未然に防ぐアプローチの確立につながるため、極めて重要である。また、トランスポーターを介した薬物相互作用の事例が集積され始めたことを受け、近年、日米欧の各規制当局から医薬品開発における薬物相互作用リスク評価に関する指針が公表された。現在、製薬企業では、薬物トランスポーターを介した薬物相互作用リスクを精度良く、かつ効率的に評価すべく、その評価系の構築が進められている。

本研究では、薬物トランスポーターの遺伝子多型、または、医薬品および医薬品候補化合物の曝露によって引き起こされる薬物トランスポーター機能変化の評価に資するバイオマーカーを、生体内低分子化合物の中からメタボローム解析により探索および同定することを目的とした。本論文の内容は、有害事象発現と関連した遺伝子多型で層別

化された臨床検体および薬物相互作用試験の臨床検体を用いてメタボローム解析を行い、ヒトにおいて薬物トランスポーター機能評価マーカーあるいはその候補を同定した研究成果からなる。

本研究は、3つの章に分かれており、以下に各章の概要について述べる。

第一章 日本人健康成人男性における MRP2 遺伝子の SNP (rs12762549) と血漿中 isoflavonoid 抱合代謝物濃度との関連性 ～MRP2 機能評価マーカーの同定

Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) は、肝細胞の胆細管膜側に発現している排出トランスポーターであり、アニオン性薬物ならびに glucuronide、glutathione 抱合体、硫酸抱合体といった抱合代謝物の細胞内から胆汁への排出に関わっている。MRP2 遺伝子の 3' 非翻訳領域の SNP である rs12762549 (G>C) は、docetaxel 誘発性好中球減少症の発現率と関連する。本章では、rs12762549 が MRP2 の *in vivo* 活性に与える影響について生体内低分子化合物の血漿中濃度の変動に基づいて検証し、その結果から MRP2 機能評価マーカーを同定することを目的とした。

rs12762549 の遺伝子型で層別化された健康成人から血漿を採取し、メタボローム解析に供した。LC-MS データセットの多変量解析により、rs12762549 の GG 遺伝子型群と CC 遺伝子型群を判別することが可能であった。この群間差の要因となった計 11 個の化合物のうち、genistein および dihydrogenistein の抱合代謝物 5 種については、CC 遺伝子型群の検出強度が GG 遺伝子型群に比べて有意に高く、かつ、GC 遺伝子型群の検出強度が GG 遺伝子型群と CC 遺伝子型群の中間の値を示した。Mrp2 欠損ラット (EHBR) においても genistein および dihydrogenistein を含む isoflavonoids の抱合代謝物 9 種が血漿に蓄積した。これらの代謝物の胆汁排泄は低下していた。また、isoflavonoid 抱合代謝物はヒト MRP2 発現膜ベシクルにおいて ATP 依存的に取り込まれた。

以上のように、rs12762549 の C アレル保有者では、Mrp2 欠損ラットと同様、MRP2 基質である isoflavonoid 抱合代謝物が血漿に蓄積したことから、MRP2 の *in vivo* 活性が低下していると考えられた。Isoflavonoids は食物由来成分であることから、本試験では実施しなかった食事のコントロールを行うことによって、より鮮明な差異が見られるものと考えられる。薬物相互作用リスク評価への適用については、MRP2 阻害剤を用いた検証試験等が必要である。

第二章 MATEs を介した薬物相互作用のリスク評価に適した生体内低分子マーカーの同定

Multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) は、腎尿細管上皮細胞の刷子縁膜に発現し、様々なカチオン性薬物の細胞内から尿管腔への排出に関与している。MATEs 阻害が生じた場合、被相互作用薬の腎内濃度の上昇をもたらすことから、被相互作用薬が腎毒性ポテンシャルを有する際には、その毒性を増強することにつながる。そのため、MATEs を介した薬物相互作用のリスク評価は極めて重要である。プローブ薬剤として広く用いられている metformin では、MATE 阻害がその腎クリアランスに与える影響が小さく（無処置時の 66% に低下）、より感受性の高いマーカーが求められている。これまでに、腎クリアランスが無処置時の 30% にまで低下する生体内低分子マーカーとして、N-methylnicotinamide (NMN) が見い出されているが、血漿中濃度および尿中排泄量の日内変動が大きいため、腎クリアランスによる評価が必要とされている。本章では metformin よりも感受性が高く、かつ NMN よりも日内変動が小さい生体内低分子マーカーを探索することを目的とした。

MATE 阻害剤 pyrimethamine を投与した健康成人から血漿および尿を採取し、メタボローム解析に供した結果、NMN を含む 11 化合物の尿中排泄量が無処置時と比べて有意に低下していることを見い出した。これらのうち thiamine は、pyrimethamine 投与時の腎クリアランスが無処置時の 16%～30% に低下していた ($p<0.01$)。MATE 発現細胞を用いた *in vitro* 実験により、thiamine が MATEs の基質であることを確認した。また、thiamine は、NMN と比べて血漿中濃度および尿中排泄量の日内変動が小さかった。

以上の結果から、thiamine は尿細管上皮細胞内から MATEs を介して尿中へと排出されていることが示唆された。Thiamine の尿中排泄は、腎における MATEs を介した薬物相互作用のリスクを評価する上で有用なバイオマーカーとなるものと考えられた。

第三章 Thiamine のクリアランスにおける有機カチオントランスポーターの関与 ～OCTs 機能評価マーカーとしての可能性～

ヒト organic cation transporter (OCT) 1 および OCT2 は、それぞれ肝細胞および腎尿細管上皮細胞の血管側に発現し、様々なカチオン性薬物の血液から細胞内への取り込みに関与している。本章では、thiamine の体内動態における OCTs の役割についてマウスを用いて明確にし、その結果から thiamine が OCTs の機能評価マーカーとなる可能性を検討した。マウスでは、Oct1 が肝および腎の両方に発現している点がヒトとは異なる。

発現細胞を用いて Oct1 および Oct2 による thiamine 輸送の K_m 値を求めたところ、それぞれ 36.3 μM および 22.6 μM であり、thiamine 特異的トランスポーターである THTR-1 (2.5 μM) および THTR-2 (27 nM) よりも大きかった。このことから Oct1 および Oct2 は低親和性の thiamine トランスポーターとして機能しているものと考えられた。Oct1/2 ノックアウト (Oct1/2(-/-)) マウスから単離した肝細胞における [^3H]thiamine の取り込み活性は野生型 (Oct1/2(+/+)) マウス由来肝細胞に比べて有意に低く、かつ Oct1/2(-/-) マウスにおける内因性 thiamine の血漿中濃度は Oct1/2(+/)マウスの 5.8 倍であった。Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- d_3 の体内動態試験では、Oct1/2(+/)マウスと比較して血漿クリアランスが有意に低下していることが明らかとなった。生理的条件下、血漿クリアランスに占める腎クリアランスの割合はごくわずかであることから、腎特異的な Oct2 ではなく、Oct1 の活性が thiamine の血漿クリアランスを決定付けていると考えられた。また、腎クリアランスが血漿クリアランスの大部分を占める過剰摂取時において、thiamine は Oct1/2 および Mate1 を介した尿細管分泌により排泄されることが示唆された。よって、今後ヒトにおいて検証する必要があるが、thiamine は医薬品候補化合物の OCT1 に対する阻害活性を評価するための血漿中バイオマーカーとしての活用、ならびに、OCT2 および MATE1/2-K による腎尿細管分泌に対する阻害活性を評価するためのプローブ基質としての活用が期待される。

総括

以上のように、ヒトにおけるメタボローム解析を起点として、薬物トランスポーターの機能変化を反映する生体内低分子マーカーあるいはその候補を同定することができた。今後、薬物相互作用に関連するそのほかの薬物トランスポーターに対しても、本研究と同様の手法で生体内低分子マーカーの同定が可能と考えられる。これまで医薬品開発の後期段階においてプローブ薬剤との臨床薬物相互作用試験を実施していたが、生体内低分子マーカーを用いることにより、医薬品候補化合物を初めてヒトに投与する Phase 1 試験において薬物相互作用のリスク評価が可能となるため、医薬品開発の効率化に貢献できるものと期待される。