

# 博士論文（要約）

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

加藤 幸司

本研究は以下の原著論文に基づいたものである。

1. Kato K, Kusuhara H, Kumagai Y, Ieiri I, Mori H, Ito S, Nakai Y, Maeda K, Sugiyama Y. Association of multidrug resistance-associated protein 2 single nucleotide polymorphism rs12762549 with the basal plasma levels of phase II metabolites of isoflavonoids in healthy Japanese individuals. *Pharmacogenet Genomics*. 2012; **22**(5): 344-354.

The final publication is available at [journals.lww.com](http://journals.lww.com).

2. Kato K, Mori H, Kito T, Yokochi M, Ito S, Inoue K, Yonezawa A, Katsura T, Kumagai Y, Yuasa H, Moriyama Y, Inui K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins. *Pharm Res*. 2014; **31**(1): 136-147.

The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com).

3. Kato K, Moriyama C, Ito N, Zhang X, Hachiuma K, Hagima N, Iwata K, Yamaguchi J, Maeda K, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y, Kusuhara H. Involvement of organic cation transporters in the clearance and milk secretion of thiamine in mice. *Pharm Res*. in press.

The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com).

## 目 次

略 語.....	1
パラメータ.....	4
序 論.....	5
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～ .....	13
第一章 要約.....	14
第一章 緒言.....	16
第一章 結果.....	17
第一章 考察.....	18
第一章 図表.....	19
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.....	20
第二章 要約.....	21
第二章 緒言.....	23
第二章 結果.....	25
第二章 考察.....	29
第二章 図表.....	34
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～ .....	42
第三章 要約.....	43
第三章 緒言.....	45

第三章 結果.....	48
第三章 考察.....	54
第三章 図表.....	62
結論および今後の展望.....	73
謝 辞.....	76
実験の部.....	78
第一章.....	78
第二章.....	79
第三章.....	85
参考文献.....	91

## 略 語

ABC	ATP-binding cassette ; ATP 結合カセット
ATP	adenosine triphosphate ; アデノシン三リン酸
ATP $\gamma$ S	adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) ; アデノシン 5'-O-(3-チオ三リン酸)
AUC	area under the plasma concentration–time curve ; 血漿中濃度–時間曲線下面積
BBM	brush border membrane ; 刷子縁膜
BBMV	brush border membrane vesicles ; 刷子縁膜ベシクル
BCRP	breast cancer resistance protein
CV	coefficient of variation ; 変動係数
dCyd	2'-deoxycytidine
DHG	dihydrogenistein
E <sub>2</sub> 17 $\beta$ G	estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide
EDTA	2,2',2'',2'''-(ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EHBR	Eisai hyperbilirubinemic rat
FDA	US Food and Drug Administration ; 米国食品医薬品局
GFR	glomerular filtration rate ; 糸球体ろ過速度
HEK	human embryonic kidney
HMDB	Human Metabolome Database
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry ; 液体クロマトグラフィー質量分析法

LC-MS/MS	liquid chromatograph-tandem mass spectrometer ; 液体クロマトグラフータ ンデム質量分析計
MATE	multidrug and toxin extrusion protein
MEC	mammary epithelial cells ; 乳腺上皮細胞
MOI	multiplicity of infection
M/P	milk-to-plasma concentration ratio ; 乳汁/血漿中濃度比
MPP <sup>+</sup>	1-methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger RNA (ribonucleic acids)
MRP	multidrug resistance associated protein
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio
NMN	<i>N</i> -methylnicotinamide
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OPLS-DA	orthogonal partial least square discriminant analysis ; 直交部分最小二乗法 判別分析
PYR	pyrimethamine
RFC	reduced folate carrier
SD	Sprague Dawley
S.E.M.	standard error of the mean ; 標準誤差
SLC	solute carrier
SNP	single nucleotide polymorphism ; 一塩基多型
TEA	tetraethylammonium
THTR	thiamine transporter
TMP	thiamine monophosphate

TPP                    thiamine pyrophosphate

UMIN                  University Hospital Medical Information Network

## パラメータ

$CL_{\text{plasma}}$	total body clearance with regard to the plasma concentration ; 血漿中濃度に基づく全身クリアランス (血漿クリアランス)
$CL_R$	renal clearance ; 腎クリアランス
$C_{\text{max}}$	maximum plasma concentration ; 最高血漿中濃度
$K_i$	inhibition constant ; 阻害定数
$K_m$	Michaelis constant ; ミカエリス定数
$P_{\text{dif}}$	nonsaturable uptake clearance ; 非飽和性取り込みクリアランス
$R_b$	blood-to-plasma concentration ratio ; 血液/血漿中濃度比
$V_{\text{max}}$	maximum uptake rate ; 最大取り込み速度
$X_{\text{urine}}$	urinary excretion amount ; 尿中排泄量

## 序 論

### 1. 本研究の目的

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本研究の目的とした。

### 2. 本研究の背景

#### (1) 薬物トランスポーター機能評価の重要性

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。血液から肝細胞内への薬物の取り込みに関与する、organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)、OATP1B3、organic cation transporter 1 (OCT1)、ならびに、肝細胞内から胆汁への排出に関与する、P-glycoprotein (P-gp ; multidrug resistance protein 1 ; MDR1)、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)、breast cancer resistance protein (BCRP)、multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) は、薬物の肝代謝および胆汁排泄に影響を与える主要な薬物トランスポーターである (図 1)。また、血液から尿細管上皮細胞内への取り込みに関与する、organic anion transporter 1 (OAT1)、OAT3、OCT2、ならびに、尿細管上皮細胞内から尿への排出に関与する、P-gp、MRP2、MATE1、MATE2-K は、薬物の尿細管分泌に関わる主な薬物トランスポーターである (図 1)。これらの薬物トランスポーター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 (図 2)。

近年、これらの薬物トランスポーターの遺伝子多型が多数見い出され、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。例えば、simvastatin を長期投与した患者を対象として、スタチン類の重篤な副作用であるミオパシーを発現した患者群と発現しなかった患者群に分けて、一塩基多型 (SNPs) の網羅的解析を行ったところ、OATP1B1 の T521C 変異が最もミオパシーとの関連が強い SNP として同定された (1)。ミオパシー発症のオッズ比は、野生型ホモと比較した場合、T521C 変異のヘテロ保有者で 4.5、T521C 変異のホモ保有者で 17 であった。この T521C 変異は、simvastatin の体内動態に影響を与えることから (2)、simvastatin の全身曝露の上昇が副作用発現の規定因子となっているものと考えられる。このように、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。しかしながら、薬物トランスポーター遺伝子の SNP で層別化した被験者にプローブ薬剤を投与して体内動態を検証する臨床試験を、SNP ごとに実施するには、大変な労力と時間を必要とする。それゆえ、多数の SNPs の中から薬物トランスポーターの *in vivo* 活性に影響を与えるものを効率的にスクリーニングする戦略が求められている。

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 (3)、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 (ガイドラインまたはガイダンス) が公表されている (4,5,6)。現在、製薬企業では、医薬品候補化合物が薬物トランスポーターの基質になる可能性、ならびに、阻害剤になる可能性を精度良く、かつ効率的に評価すべく、その評価系の構築および改善が進められている。例えば、阻害剤になる可能性を評価するためには、まずトランスポーター発現細胞系等を用いた *in vitro* 試験により薬物トランスポーターに対する医薬品候補化合物の阻害活性を評価し、そこで阻害活性を有し、かつ、臨床用量における血

漿中薬物濃度が相互作用を引き起こしうる濃度であった場合には、プローブ薬剤を用いた臨床薬物相互作用試験を実施して薬物相互作用リスクを最終的に判定するのが標準的なスキームである（図 3）。原則として、偽陰性を発生させないクライテリアを用いて臨床薬物相互作用試験の実施の可否を判定しているため、臨床薬物相互作用試験で陰性判定されるケースが多いとの指摘もある。これに掛かる被験者負担や時間・労力・コストを抑えるため、開発早期段階で薬物相互作用リスクを精度良く予測できるスキームの確立が望まれている。さらに、薬物由来の代謝物による薬物相互作用や、侵襲性が低い生体試料である血漿や尿を用いた薬物動態解析からの予測が困難である局所濃度が関連する薬物相互作用など、想定することが難しい機構で生じる薬物相互作用を如何に医薬品開発の過程で発見し、安全な薬物療法に貢献するかが課題である。このような課題の解決に向けて、本研究では、開発早期段階にルーチンで実施される臨床 Phase 1 試験の中で、医薬品候補化合物が薬物トランスポーター機能に与える影響を評価するアプローチを確立すべく、バイオマーカーの検討を行った。

## (2) 生体内低分子マーカーの有用性

近年、ノックアウト動物を用いた *in vivo* 実験やトランスポーター発現系を用いた *in vitro* 実験において、薬物トランスポーターの機能変化が、薬物だけではなく、内因性物質や食物由来成分の体内動態にも影響を与えることが知られるようになった (7,8)。このような生体内低分子化合物の体内動態の変動をバイオマーカー（生体内低分子マーカー）として活用することによって、プローブ薬剤を用いた臨床試験を行うことなく、薬物トランスポーター機能変化の *in vivo* 評価が可能になると考えられる（図 4）。

医薬品開発における臨床薬物相互作用試験は開発後期段階において実施されているが（図 3）、血漿または尿中の鋭敏な生体内低分子マーカーを利用することにより、医

薬品候補化合物を初めてヒトに投与する臨床 Phase 1 試験において、薬物相互作用リスクを判定できるようになり、医薬品開発の効率化に資するものと考えられる。

また、確立された生体内低分子マーカーがあれば、遺伝子情報とともに保管されたバイオバンクの血液サンプルを解析することによって、薬物トランスポーターの *in vivo* 活性に影響を与えうる SNPs を、大規模な臨床試験を行うことなく、スクリーニングすることも可能になると期待される。

### (3) 薬物動態研究における生体内低分子マーカー利用の現状

近年、薬物代謝酵素 cytochrome P450 の主要分子種のひとつである CYP3A に対する生体内低分子マーカーとして、血漿中 4 $\beta$ -hydroxycholesterol/cholesterol 濃度比や尿中 6 $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol 濃度比が提唱され、CYP3A 遺伝子多型、ならびに、医薬品の CYP3A 誘導活性および阻害活性の評価に有用であるというエビデンスが蓄積されている (9,10,11,12)。これに対し、薬物トランスポーターの生体内低分子マーカーに関する報告は、これまでにほとんど例がない。但し、薬物トランスポーターは、糖やアミノ酸のような生命維持に必須の化合物を選択的に輸送するトランスポーターとは異なり、幅広い基質特異性を示すという特性を持っている。このため、薬物以外に食物由来成分や体内の老廃物を含めた、何かしらの生体内低分子化合物の輸送に関与している可能性は極めて高いと推察される。実際、生体内低分子化合物の bilirubin glucuronide は、MRP2 の典型的な基質であり、MRP2 遺伝子疾患である Dubin-Johnson 症候群では、血液中に bilirubin glucuronide が蓄積する。最近、我々の研究グループは、これまで糸球体ろ過機能および尿細管分泌機能のマーカーとしてそれぞれ利用されてきた creatinine および *N*-methynicotinamide (NMN) の腎クリアランスがいずれも MATE 阻害によって有意に低下すること (13,14)、ならびに CYP3A マーカーである尿中 6 $\beta$ -hydroxycortisol の

腎クリアランスが OAT3 阻害によって有意に低下することを見出した (15)。

本研究では、薬物トランスポーター機能評価マーカーとしてより適したものを、生体内低分子化合物の中から網羅的に探索することを試みた。

#### (4) メタボローム解析による生体内低分子マーカーの探索

数多くの生体内低分子化合物の中から薬物トランスポーターの内因性基質を効率的に探索する手法としてメタボローム解析が有用であることが、最近、*in vitro* 試料や動物試料を用いた検討によって示された (7,8)。メタボローム解析では、異なる 2 つの群から採取した生体試料に含まれる多種多様な化合物を網羅的に測定し、検出された多数の化合物の検出強度 (相対的濃度) を用いて多変量解析することにより、群間の差異を視覚化し、さらに、その差異の要因となる化合物を抽出することが可能である。メタボローム解析の測定手法としては主に、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-MS)、核磁気共鳴分光法 (NMR) が用いられ、測定対象化合物の物性や研究目的によって使い分けがなされている。本研究では、化合物の適用範囲の広さ、感度および前処理操作の簡便性の面から、LC-MS を測定手法として選定した。今回は、マーカーの探索範囲を可能な限り広げるため、予め、測定対象物質を限定して測定する「標的メタボローム解析手法」ではなく、精密質量の測定が可能な LC-MS 装置によって検出された数百化合物の中からマーカー候補化合物を選定した後に、精密質量やプロダクトイオンスペクトルからその化学構造を同定する「非標的メタボローム解析手法」を採用した。

### 3. 本論文の構成

2008～2011年に、経済産業省管轄の独立行政法人「新エネルギー・産業技術総合開発機構」(NEDO)の研究委託として、東京大学・杉山雄一教授(当時)をリーダーとする「マイクロドーズ臨床試験を活用した革新的創薬技術の開発」に関する産学官連携プロジェクトが行われた。本論文の内容は、このプロジェクトで、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た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。

本論文の第一章では、臨床研究「胆管側排出輸送トランスポーターの個体間変動が組織中濃度・血漿中濃度に与える影響の評価(BSP-SGの胆汁排泄とMRP2、OATP1B1、OATP1B3等の遺伝子多型の関連)(UMIN000003960)」において、MRP2遺伝子SNPのrs12762549で層別化された被験者の血漿試料を用いてメタボローム解析を行い、MRP2機能評価マーカーについて検討した。

第二章では、臨床研究「メトホルミンとピリメタミンとの薬物間相互作用を評価するための健康成人を対象としたマイクロドーズおよび臨床用量での薬物動態試験(UMIN000002739)」において、選択的MATE阻害剤、pyrimethamine投与の影響を検討するクロスオーバー試験で採取された血漿および尿試料を用いてメタボローム解析を行い、MATEs機能評価マーカーについて検討した。

第三章では、前章でMATEs機能評価マーカーとして同定されたthiamineについて、その体内動態におけるOCTsの関与に関してマウスを用いて検証し、OCTs機能評価マーカーとなりうる可能性を検討した。

本論文は、ヒトにおけるメタボローム解析を起点とした、薬物トランスポーター機能評価マーカーの同定プロセスを明示するものである。

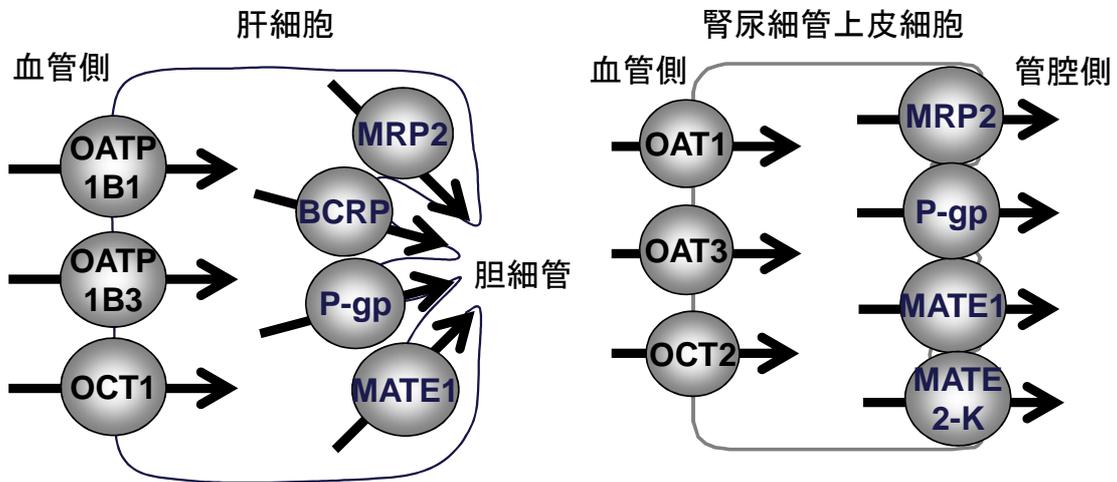


図1 薬物の胆汁排泄および尿中排泄に関与する主なトランスポーター

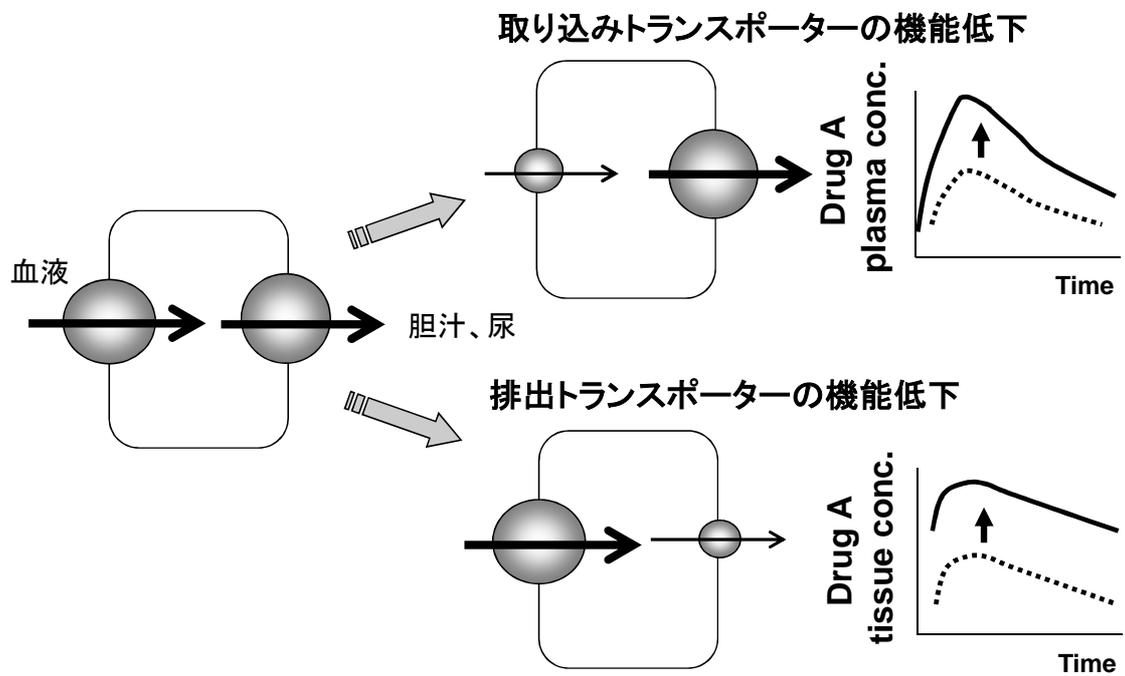


図2 トランスポーター機能低下による薬物動態への影響

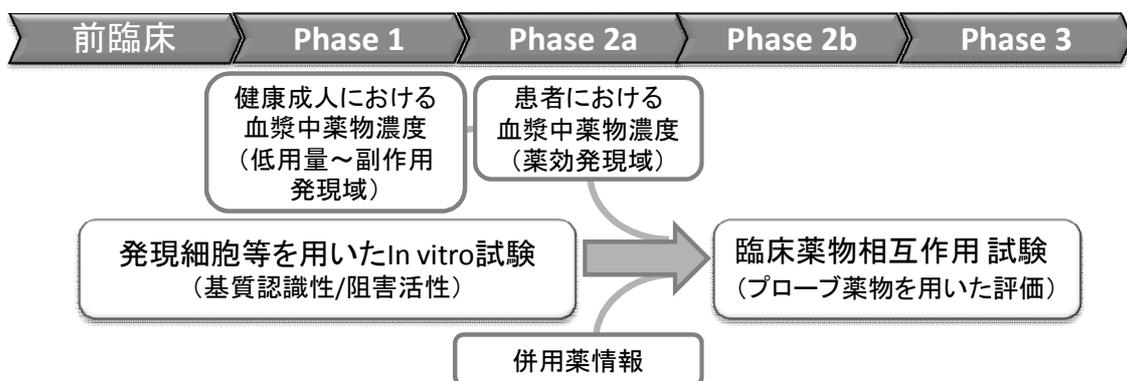


図3 医薬品開発における薬物相互作用リスク評価の標準的スキーム

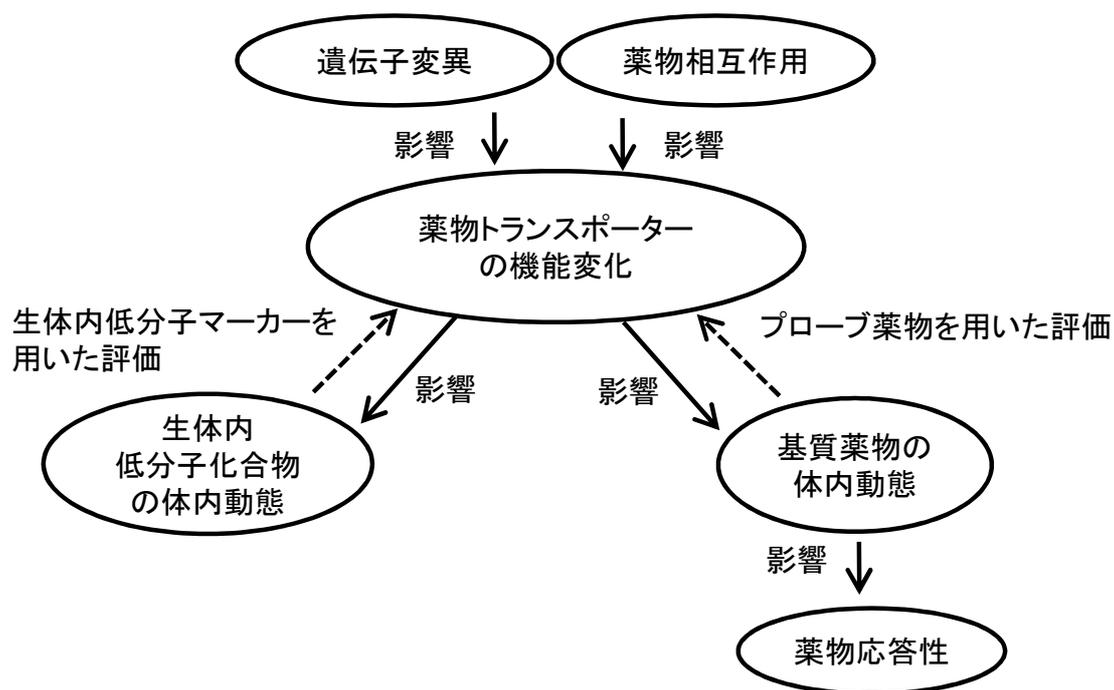


図4 生体内低分子マーカーを用いた薬物トランスポーターの機能評価

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～

## 第一章 要約

**目的：** Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2; *ABCC2*) は、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の排出に関与している。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ことが報告されている。本章では、この SNP 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。

**方法：** rs12762549 の遺伝子型に基づいて層別化された 18 名の日本人健康成人男性から血漿を採取し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いた非標的メタボローム解析に供した。遺伝子型間で血漿中濃度に違いが認められた化合物の体内動態における MRP2 の役割について、Mrp2 欠損ラット (Eisai hyperbilirubinemic rats; EHBR) を用いて検証した。また、それらがヒト MRP2 の基質であるか否かについてはヒト MRP2 発現膜ベシクルを用いて検証した。

**結果：** LC-MS データセットの多変量解析において、rs12762549 の GG 遺伝子型被験者群と CC 遺伝子型被験者群との群間差の要因として計 11 個の化合物を抽出した。これらのうち、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。EHBR の血漿中においても、genistein および dihydrogenistein を含む isoflavonoids の抱合代謝物 9 種が蓄積していた。EHBR におけるこれらの胆汁排泄能は、正常 SD ラットと比較して低下していた。Genistein または daidzein を正常 SD ラットと EHBR に経口投与したところ、血漿中の抱

合代謝物を含む total genistein および total daidzein 濃度は EHBR において有意に高値を示した。また、ヒト MRP2 発現膜ベシクルにおいて genistein、dihydrogenistein および equol の各 sulfoglucuronide および各 glucuronide の ATP 依存的取り込みが認められた。

**結論：**本研究により、MRP2 は isoflavonoids の抱合代謝物が体内に蓄積するのを防ぐ役割を果たしていることが明らかとなった。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。本章の結果から、検証試験が今後必要ではあるが、この isoflavonoid 抱合代謝物の血漿への蓄積は MRP2 機能評価マーカーとして有望であると考えられた。

## 第一章 緒言

インターネット公表不可

## 第一章 結果

インターネット公表不可

## 第一章 考察

インターネット公表不可

## 第一章 図表

インターネット公表不可

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

## 第二章 要約

**目的：** Multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) は、腎における様々なカチオン性薬物の尿中排泄に関与する主要なトランスポーターである。本章では、MATEs を介する薬物相互作用のリスク評価に適したバイオマーカーを生体内低分子化合物の中から見出すことを目的とした。

**方法：** 健康成人およびマウスの生体内低分子化合物の血漿中濃度および尿中排泄に対する MATE 阻害剤 pyrimethamine 処置の影響を、非標的メタボローム解析によって検討した。メタボローム解析によって見い出されたマーカー候補の血漿および尿中濃度は LC-MS/MS を用いて定量した。MATEs および OCT2 によるマーカー候補の輸送活性は、各トランスポーターを発現させた HEK293 細胞を用いて評価した。また、マーカー候補のマウス体内動態は、それらの重水素標識体を投与することにより検討した。

**結果：** ヒトおよびマウスにおいて *N*-methylnicotinamide (NMN)、thiamine および carnitine を含む計 11 化合物の尿中排泄量は、pyrimethamine 処置によって有意に低下した。一方、pyrimethamine 処置により血漿中濃度が有意に変動する生体内低分子化合物は認められなかった。ヒトにおける thiamine および carnitine の腎クリアランスは、pyrimethamine 処置によってそれぞれ無処置時の 16%~30% および 6%~10% にまで低下した ( $p < 0.05$ )。これらの血漿中濃度および尿中排泄量の日内変動は比較的小さかった。MATE1、MATE2-K および OCT2 の各発現細胞における thiamine の取り込みは、それぞれ  $3.5 \pm 1.0$ 、 $3.9 \pm 0.8$  および  $59.9 \pm 6.7 \mu\text{M}$  の  $K_m$  値を示した。マウスにおける carnitine- $d_3$  の腎クリアランスは、pyrimethamine 処置によって無処置時の 38% にまで低下した。

**結論：** 本章において、thiamine が腎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を明らかにした。Thiamine の尿中排泄は、代表的プローブ薬剤の

metformin よりも感受性が高く、かつ、既知の生体内低分子マーカーの NMN よりも日内変動が小さいことから、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。

## 第二章 緒言

Multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs) は、腎近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜 (BBM) に発現し、 $H^+$  との交換輸送により、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 (45,46)。ヒト MATEs のアイソフォームとして、MATE1 (*SLC47A1*) および MATE2-K (*SLC47A2*) の2つが存在する。両者は、tetraethylammonium (TEA) や metformin といったカチオン性有機化合物に対して重複した基質特異性を示す (47,48)。MATEs は、側底膜に発現する取り込みトランスポーター OCT2 (*SLC22A2*) と連携して、様々なカチオン性薬物の循環血から尿への分泌に関与すると考えられている。この概念は、Mate1 ノックアウトマウス (Mate1<sup>-/-</sup>マウス) を用いたいくつかの実験によって検証されている。Mate1<sup>-/-</sup>マウスでは、体内からの metformin の消失が Mate1 野生型マウス (Mate1<sup>+/+</sup>マウス) と比較して著明に遅延するとともに、腎内に metformin の蓄積がみられた (49)。Mate1<sup>-/-</sup>マウスにおける varenicline の腎分泌クリアランスは、Mate1<sup>+/+</sup>マウスの 55% にまで低下した (50)。さらに、Mate1 の遺伝子欠損は、白金抗腫瘍剤 cisplatin や除草剤 paraquat を腎に著しく蓄積させ、これらによる腎障害性を高めることが知られている (51,52)。

これまでに、市販薬剤である cimetidine および pyrimethamine (PYR) が MATE1 および MATE2-K に対して強力な阻害作用を示すことが報告されている (53,54,55)。PYR は、膜内外に  $H^+$  勾配を付与したヒト腎 BBM ベシクル (BBMV) における、MATE 基質である metformin および *N*-methylnicotinamide (NMN) の取り込み輸送を完全に阻害した。その際の  $K_i$  値は、MATE1 および MATE2-K を発現させた各細胞系で求められた値と同等であった。ここで、注目すべき知見は、MATEs および OCT2 に対する cimetidine および PYR の  $K_i$  値を、これらの薬剤の一般的な臨床用量で達する非結合型薬物の最高

血漿中濃度と比較した結果、両阻害剤は共に OCT2 には影響を与えずに、MATE1 および MATE2-K を阻害していることが示唆された点である。実際、マウスにおいて cimetidine および PYR は、Mate 基質の腎内濃度を上昇させた (55,56)。

MATEs の代表的なプローブ薬剤である metformin および MATE 阻害剤 PYR との臨床薬物相互作用試験において、MATE 阻害による metformin の腎クリアランス ( $CL_R$ ) の低下率は約 34% と比較的小さかった (13)。この知見から、metformin よりも感受性の高いマーカーの探索を開始した。これまでに我々は、PYR 処置によって生体内低分子化合物の creatinine および NMN の腎クリアランスがそれぞれ約 20% および約 70% 低下することを見出ししている (13,14)。この結果から、NMN をマーカーとして MATEs 介在の薬物相互作用のリスクを評価する手法を提案した (14)。この手法を用いれば、プローブ薬剤投与の必要がなくなるため、医薬品候補化合物のみを投与する臨床早期段階の Phase 1 試験でも評価が可能となり、医薬品開発における薬物相互作用リスク評価にかかる時間と労力を削減できることは明らかである。但し、NMN は血漿中濃度および尿中排泄量が朝から夜に掛けて 1/3 程度にまで低下する日内変動が見られるため、尿中排泄量では評価が難しく、腎クリアランスによる評価が必要である。そこで、本研究では、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。

第一章で示したように、メタボローム解析は、数多く存在する生体内低分子化合物の中から新規のトランスポーター基質を探索するのに有用な分析アプローチである (7,8)。本章では、PYR 処置による影響を比較検討するクロスオーバー試験から得られた 8 名の健康成人男性の血漿および尿を用いて、LC-MS によるメタボローム解析を行い、PYR によって尿中排泄量および腎クリアランスが有意に低下する生体内 MATE 基質を同定した。

## 第二章 結果

### PYR 処置の有無に基づくメタボローム解析

健康成人被験者およびマウスの PYR 処置群と対照群の尿試料をメタボローム解析に供した。ヒトおよびマウス試料を LC-MS 測定した結果、それぞれ約 2000 および約 3000 のピークが検出された。その中から、次の 3 つの基準に基づいてマーカー候補を選定した。1) ヒトおよびマウスともに、PYR 処置群の相対的尿中排泄量（ピーク面積と尿容量の積）の平均が対照群の 50% 未満であること、2) 8 名の被験者のうち、少なくとも 7 名で PYR 処置により相対的尿中排泄量の低下が見られること、3) 検出されたピークがプロダクトイオンスペクトルの取得に十分な強度を有していることを基準とした。選定された 11 個のマーカー候補の LC 保持時間および MS データを、変化倍率とともに表 4 に示す。オンラインデータベース HMDB (57) および KEGG (58) を用いて、mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) が合致する化学構造を検索した。11 化合物のうち 6 化合物は、NMN、thiamine、2'-deoxycytidine (dCyd)、carnitine、acetylcarnitine および propionylcarnitine の標準品の LC-MS データと一致した。U146 の化学構造は、carnitine のスペクトルと比較した結果、4-*N*-trimethylaminobutyrate であると推定された。U160 は、それに CH<sub>2</sub> 基が一つ延伸した構造であると推察された。他の 3 化合物については構造を推定することができなかった。

血漿および腎についても同様にメタボローム解析を行った。PYR 処置によって相対的血漿中濃度が 2 倍以上増加した化合物として、PYR ( $m/z$  249.09043) およびその 2 つの代謝物、酸化体 ( $m/z$  265.08527) およびグルクロン酸抱合体 ( $m/z$  425.12233) が検出されたが、生体内低分子化合物で有意に増加したものは認められなかった。尿のメタボローム解析で選定した 11 個のマーカー候補のうち、8 個が血漿に検出された。それらの

相対的血漿中濃度の変化倍率は 0.7~1.2 倍であり、PYR 処置群と対照群の間に有意な差はなかった（表 4）。マウスの血漿においても同様の变化であった（表 4）。マウス腎では 1.7 倍が最大の変化倍率であった。

#### マーカー候補の血漿中濃度および尿中排泄量に対する PYR 処置の影響

マーカー候補の thiamine、carnitine、acetylcarnitine および dCyd の血漿中および尿中濃度を、それぞれの安定同位体を内標準物質とする内標準法により定量した。

Thiamine、carnitine および acetylcarnitine の血漿中濃度推移を図 11A に示す。これらの AUC を表 5 に示す。血漿中 dCyd 濃度は、定量下限（0.3 ng/mL）未満であった。これは、ヒト血漿中における dCyd の安定性をブランク血漿に dCyd（48 ng/mL）を添加して *in vitro* で検討した結果、2 時間後の残存率が、室温で 2.2%、氷上で 28%であったことから、血漿中における dCyd の不安定性に起因するものと考えられる。血漿中 thiamine 濃度は、PYR 処置群（Period 2 および Period 4）と対照群（Period 1 および Period 3）のいずれにおいても投与 9 時間後までは一定であったが、対照群の 13 時間後において、わずかな上昇が認められた（図 11A）。血漿中 carnitine 濃度には、有意な日内変動は認められず、carnitine 濃度の被験者間のばらつき（CV, 20%）の方が、日内変動（CV, 6%）よりも大きかった（図 11A）。血漿中 acetylcarnitine 濃度は午前中に高値を示す傾向があった。PYR 処置群における carnitine および acetylcarnitine の AUC は、無処置群と比較して 15%程度低かった（表 5）。

dCyd を含む 4 化合物の  $X_{\text{urine}}$  を、図 11B に示す。これらの  $CL_R$  を表 5 に示す。PYR 処置群（Period 2 および Period 4）の 4 化合物の尿中排泄量（ $X_{\text{urine}}$ ）は、無処置群（Period 1 および Period 3）の値と比較して著明に低かった。これらの結果はメタボローム解析の結果と符合する。PYR 処置群の thiamine、carnitine および acetylcarnitine の  $CL_R$  は、そ

それぞれ無処置群の 16%~30%、6%~10%および 9%~13%にまで低下した。

### **MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞における thiamine の取り込み**

MATE1 または MATE2-K を発現させた HEK293 細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine (10 nM) および [<sup>14</sup>C]TEA (MATE 典型基質; 36 μM) の取り込みは、mock 細胞よりも有意に高かった (図 12A)。その取り込みは、大過剰の非標識 TEA を添加することによって、mock 細胞と同程度にまで低下した。MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞における thiamine の取り込みはいずれも飽和性の取り込みと非飽和性の取り込みから構成された (図 12B、図 12C)。最小二乗法によって得られた MATE1 および MATE2-K の速度論的パラメータを表 6 に示す。

MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞における [<sup>3</sup>H]carnitine の取り込みは、mock 細胞と同程度であった (データ示さず)。dCyd は mock 細胞でも高い取り込みが認められ、各 MATE 発現細胞と mock 細胞との間で取り込みに有意な差は認められなかった (データ示さず)。

### **OCT2 発現細胞における thiamine の取り込み**

OCT2 発現 HEK293 細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine (10 nM) の取り込みは、mock 細胞より有意に高かった (図 13A)。その取り込みは、大過剰の非標識 TEA (5 mM) を添加することにより、mock 細胞と同程度にまで低下した。取り込みには飽和性が認められた (図 13B)。K<sub>m</sub> 値および V<sub>max</sub> 値は、それぞれ 59.9±6.7 μM および 1.09±0.01 nmol/2min/mg protein であった。

## Carnitine のマウス体内動態における pyrimethamine 処置の影響

Pyrimethamine (PYR) 処置群マウスには、重水素標識 carnitine (carnitine- $d_3$ ) を投与する 30 分前に、PYR (0.5 mg/kg) を投与した。腎内の非結合型 PYR 濃度は、PYR のマウス Mate1 に対する  $K_i$  値 (145 nmol/L) (55) と同等であった。Carnitine- $d_3$  投与 120 分後を除き、血漿中 carnitine- $d_3$  濃度に、PYR 投与群と対照群の間に有意な差はなかった (図 14A)。対照群と PYR 処置群の  $CL_{\text{plasma}}$  は、それぞれ 17.0 および 15.5 mL/min/kg であった。Carnitine- $d_3$  の  $X_{\text{urine}}$  は、PYR 処置によって有意に低下した (図 14B)。PYR 処置群の  $CL_R$  (0.28 mL/min/kg) は、対照群 (0.74 mL/min/kg) の 38% にまで低下した。Carnitine- $d_3$  から生成するアシル体は、carnitine- $d_3$  投与 120 分後の試料を用いたメタボローム解析における LC-MS 分析により検出された。PYR 処置群における carnitine- $d_3$ 、acetylcarnitine- $d_3$ 、propionylcarnitine- $d_3$  および butyrylcarnitine- $d_3$  の相対的尿中排泄量はいずれも対照群の 50% 未満に低下した (図 14C)。一方、血漿中および腎内の acylcarnitines- $d_3$  濃度は、PYR 処置群で対照群より高値か、もしくは対照群と同等であった (図 14D、図 14E)。

## 第二章 考察

日米欧の各規制当局は、近年公表した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において、前臨床試験で薬物動態学的薬物相互作用のリスクが示唆された場合、医薬品候補化合物が受ける、または、与える相互作用の程度を評価する目的で、*in vivo* 阻害剤やプローブ薬剤を用いた臨床試験を実施するよう求めている (4,5,6)。これに対応するため、現在、製薬企業では薬物トランスポーターの阻害剤やプローブ薬剤の選定に関心を寄せている。MATEs は、ヒト腎臓の尿細管上皮細胞の BBM に局在しており、カチオン性薬物の尿中排泄に重要な働きをしている薬物トランスポーターである。MATEs による細胞内からの排出輸送過程が阻害された場合、血漿中濃度の増加から推定される以上に、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といえる。本章では、MATEs 機能評価マーカーとして適した生体内低分子化合物をメタボローム解析により探索した。

Metformin と PYR との臨床薬物相互作用試験で得られた健康成人の尿試料を用いてメタボローム解析を行ったところ、PYR 処置により  $X_{urine}$  が 50%未満に低下する生体内低分子化合物を 11 個ピックアップすることができた(表4)。そのうちの 6 化合物は NMN、thiamine、carnitine、acetylcarnitine、propionylcarnitine および dCyd と同定することができた。Thiamine は、糖質代謝や神経機能に必須な vitamin (vitamin B1) である (59)。Carnitine はミトコンドリアへの長鎖脂肪酸の輸送に関与し、 $\beta$ -oxidation による細胞内エネルギー産生に欠かせない化合物であり (60)、フリー体もしくはアシル体として体内に存在する。アシル体は、carnitine acyltransferase によって carnitine および acyl-CoA か

ら生成される。dCyd は、pyrimidine deoxyribonucleoside の一つであり、サルベージ経路で nucleotide 合成に再利用されるか、もしくは deoxyuridine へと異化されることが知られている (61)。

ヒト血漿中および尿中の thiamine、carnitine、acetylcarnitine および dCyd の濃度を定量した結果 (図 11、表 5)、対照群の血漿中濃度および  $CL_R$  は文献値 (62,63,64) と一致した。dCyd は血漿中で cytidine deaminase によって速やかに変換されるため (65)、血漿中 dCyd 濃度を検出することはできなかった。血漿中 thiamine および acetylcarnitine 濃度は弱い日内変動を示し、それぞれ時間経過とともに徐々に増加または減少した。但し、これらの日内変動は NMN (14) と比較して明らかに小さいものであった。Carnitine においては少なくとも日中の血漿中濃度は一定であった。dCyd を含むこれらの  $X_{urine}$  は、PYR 処置によって著しく低下した。血漿中 thiamine、carnitine および acetylcarnitine 濃度が PYR 処置によりわずかに低下していることから、 $X_{urine}$  の低下は、一部、血漿中濃度の低下に起因している可能性がある。しかしながら、PYR 処置によって thiamine、carnitine および acetylcarnitine の  $CL_R$  がそれぞれ約 80%、90% および 90% 低下したデータは、PYR がこれらの尿中排泄を阻害したことを表している (表 5)。

これまでに、MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞を用いた *in vitro* 輸送実験により、thiamine が MATE1 および MATE2-K の基質であることが示されている (47)。この知見は、本章の結果でも再現された (図 12)。ラット腎の BBMV では thiamine/ $H^+$  対向輸送が認められている (66)。これらの *in vitro* 実験結果は、thiamine が MATEs を介して尿中排泄されることを支持する。一方、carnitine、acylcarnitine および dCyd が MATE の基質であるかどうかは、議論の余地がある。マウスに重水素標識 carnitine を投与した動物実験において、臨床結果と同様に  $CL_R$  が PYR 処置により低下したこと、ならびに acetylcarnitine/free carnitine 比が PYR の影響を受けなかったことは (図 14)、PYR

が carnitine の生合成を阻害する可能性や腎における carnitine と acetylcarnitine との相互変換を阻害する可能性を排除し、carnitine が Mate1 の基質であることをサポートした。一方、MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞において、carnitine の特異的な取り込みは見られなかった（データ示さず）。これは既報とも一致する (47)。但し、cephalexin の例では、MATE 発現細胞で cephalexin の特異的な取り込みは確認できなかったが、PYR および cimetidine が cephalexin のマウス腎内濃度を有意に上昇させた (56)。加えて、Mate1(-/-)マウスにおいて cephalexin の尿中排泄の著明な遅延が認められた (67)。これらの *in vivo* 実験から、cephalexin の尿中排泄に Mate1 が関与することが実証されている。よって、MATE 発現細胞で carnitine の特異的な取り込みが見られなかったことに基づいて、MATE を介した尿中 carnitine 排泄の可能性を否定することはできない。dCyd に関しては、MATE の基質であることをサポートするデータを得ることができなかった。

腎は、thiamine、carnitine および acetylcarnitine を糸球体ろ過後の尿から効率よく再吸収することによって、これらの内因性物質の恒常性を保つ重要な役割を果たしている。実際、これらの化合物の  $CL_R$  は、それぞれ約 50、3 および 6 mL/min であり、糸球体ろ過速度 (GFR、約 120 mL/min) と比較して小さい。Thiamine の再吸収過程には thiamine transporter-1 および-2 (THTR-1/*SLC19A2* および THTR-2/*SLC19A3*) (68) が、carnitine および acetylcarnitine の再吸収過程には高親和性の  $Na^+$ /L-carnitine cotransporter である OCTN2/*SLC22A5* (69) が関与している。dCyd の再吸収に関与するトランスポーターの候補としては、equilibrative nucleoside transporter (ENT1/*SLC29A1*) および concentrative nucleoside transporters (CNT1/*SLC28A1*、CNT2/*SLC28A2* および CNT3/*SLC28A3*) が挙げられる (70)。PYR が近位尿細管上皮細胞 BBM での排出を完全に阻害するが、再吸収過程に全く影響せず、かつ、腎における生合成や代謝を無視することができると仮定した場合、PYR 処置後の腎クリアランスを GFR と比較することによって、再吸収の比率

を求めることができる (図 15A)。Thiamine については 90%以上が再吸収されていると考えられる。さらに、この概算した再吸収の比率を用いて分泌クリアランスを求めると、thiamine の分泌クリアランスは GFR の 4 倍程度と概算される。実際、再吸収が飽和する程の高い血漿中濃度において、thiamine の  $CL_R$  はヒト腎血漿流量に近い値を示す (71)。

これまでに、OCT2 遺伝子をトランスフェクトした HeLa 細胞において、OCT2 による thiamine の取り込みが認められなかったことが報告されているが (72)、本研究では、HEK293 細胞を用いて thiamine が OCT2 の基質であることを示すことができた (図 13)。この乖離理由は不明である。この知見から、側底膜に発現する OCT2 は thiamine の血液から尿細管上皮細胞への取り込みに関与している可能性が考えられた。よって、腎における OCT2 および MATEs を介した尿細管分泌は、再吸収が飽和するような高濃度の thiamine が血液中に存在する際に、体循環から thiamine を除去する役割を果たしていると考えられる。

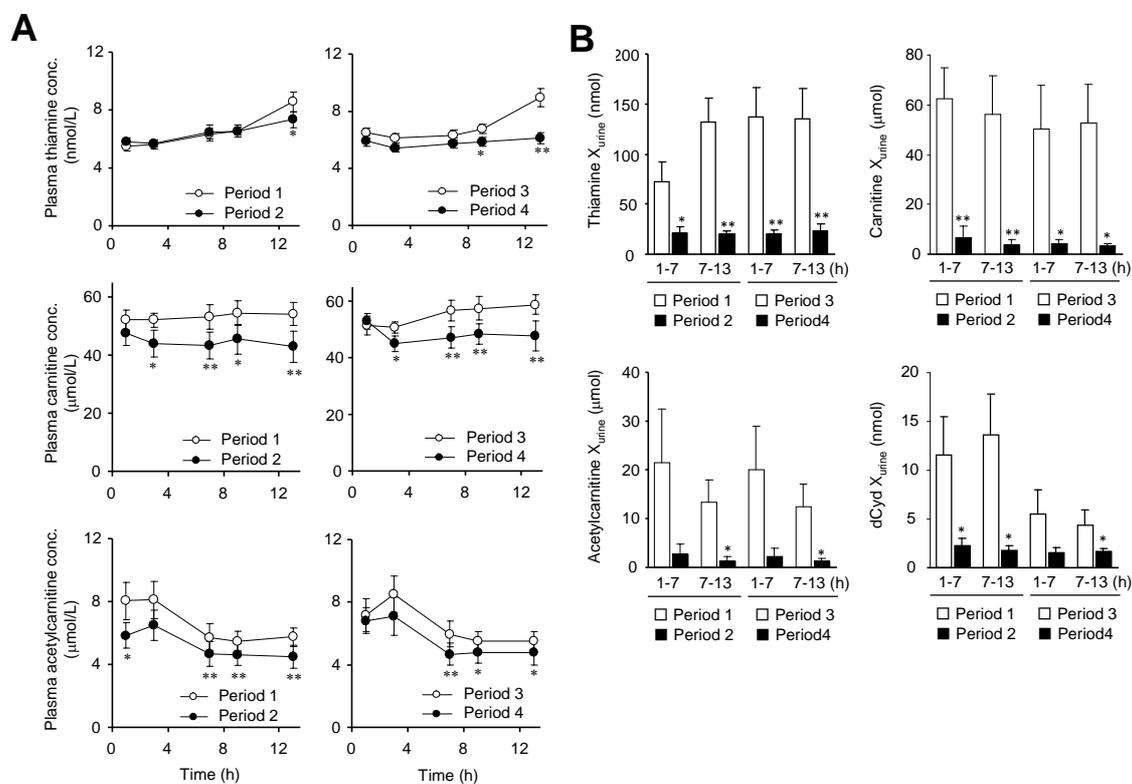
同様に、carnitine の分泌クリアランスは、GFR の 9 倍と概算される (図 15B)。しかしながら、carnitine は高用量で投与された場合でも、その腎クリアランスは依然として GFR を下回り (73)、carnitine が腎尿細管分泌を受けることをサポートする臨床エビデンスは得られていない。それゆえ、側底膜側からの取り込みを無視できると仮定したダイアグラムの方が carnitine には適切といえるかもしれない (図 15C)。今後、腎における carnitine の生合成や代謝を考慮することによって、クリアランスを正確に見積もることができると考えられ、腎における carnitine の動態を速度論的に解析するには、さらなる研究が必要である。

MATE 阻害の生体内低分子マーカーとして、現在のところ、NMN と creatinine が使用できるが、これらが分泌タイプであるのに対し、thiamine は再吸収タイプである点が異なる。また、NMN の血漿中濃度が大きな日内変動を示すのに対し (14)、thiamine の

日内変動は比較的小さい。それゆえ、NMN については腎クリアランスによる評価が必要であるが、thiamine は尿中排泄量でも評価が可能と考えられる。MATEs 阻害による NMN および thiamine の  $CL_R$  の低下率 (70%~80%) は、プローブ薬剤の metformin (34% (13)) を上回っており、MATE マーカーとして適していることを示している。但し、thiamine は食物から摂取する成分であることから、臨床試験時には食事内容のコントロールが必要であると考えられる。

本章における知見から、thiamine が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明らかとなった。Thiamine の尿中排泄は、metformin よりも感受性が高く、かつ、NMN よりも日内変動が小さいことから、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。

## 第二章 図表



**図 11. Thiamine、carnitine、acetylcarnitine および dCyd の血漿中濃度推移および尿中排泄量における pyrimethamine 処置の影響**

Period 2 および Period 4 では、metformin 投与の 1 時間前に pyrimethamine (PYR) が経口投与された。Metformin は 0.1 mg (Period 1 および Period 2) または 250 mg (Period 3 および Period 4) が経口投与された。各マーカー候補の (A) 血漿中濃度、(B) 尿中排泄量 ( $X_{urine}$ ) は、LC-MS/MS によって定量された。対照群 (Period 1 および Period 3) を白抜きで、PYR 処置群 (Period 2 および Period 4) を黒塗りで示す。各ポイントは 8 例の平均 ± 標準誤差を示す。時間軸は PYR 投与後の時間を表す。\* および \*\* は、対照群に対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

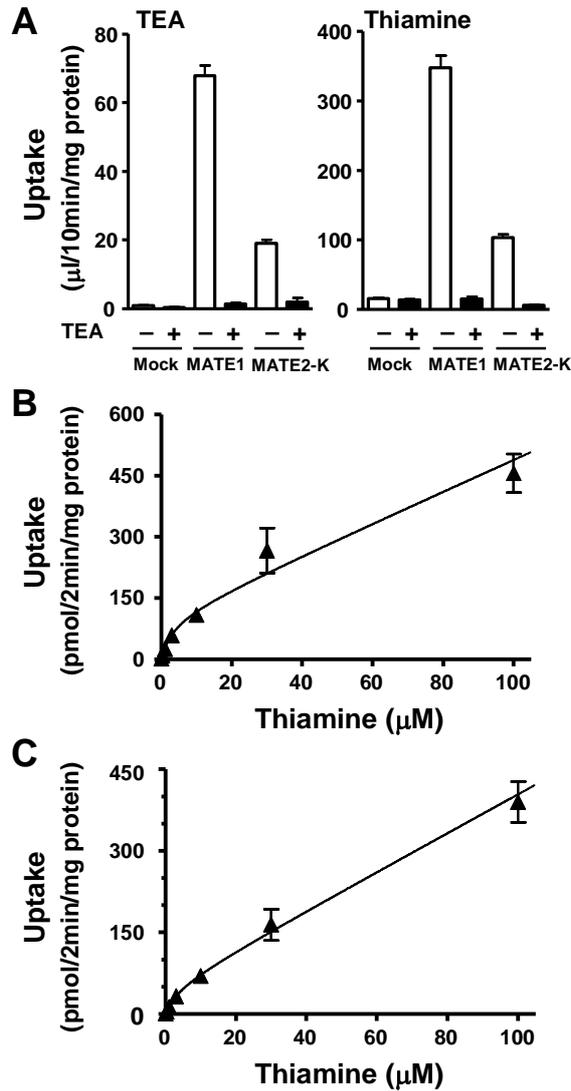


図 12. MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞における TEA および thiamine の取り込み

(A)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) 存在下のプレインキュベーションにより MATE1 発現 HEK293 細胞内および MATE2-K 発現 HEK293 細胞内を酸性化させた後、TEA (5 mM) の存在下 (黒塗り) および非存在下 (白抜き) において、 $[^{14}\text{C}]\text{TEA}$  (36  $\mu\text{M}$ ) または  $[^3\text{H}]\text{thiamine}$  (10 nM) と 37°C で 10 分間インキュベートした。(B) および (C) のグラフは、それぞれ MATE1 発現細胞および MATE2-K 発現細胞における輸送活性の濃度依存性を示す。実線は、式 1 (実験の部を参照) に基づく非線形回帰解析のフィッティングを示す。データは、平均  $\pm$  標準誤差 (n=3) を示す。

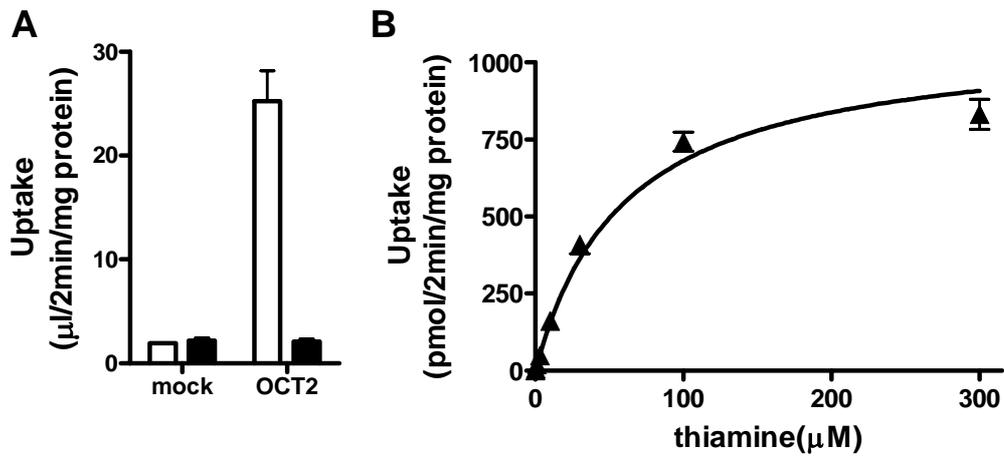


図 13. OCT2 発現 HEK293 細胞における thiamine の取り込み

(A) OCT2 発現 HEK293 細胞を TEA (5 mM) の存在下 (黒塗り) および非存在下 (白抜き) において、<sup>3</sup>H]thiamine (10 nM) と 37°C で 2 分間インキュベートした。

(B) OCT2 発現細胞における thiamine の輸送活性の濃度依存性を示す。実線は、式 1 (実験の部を参照) に基づく非線形回帰解析のフィッティングを示す。データは、平均 ± 標準誤差 (n=3) を示す。

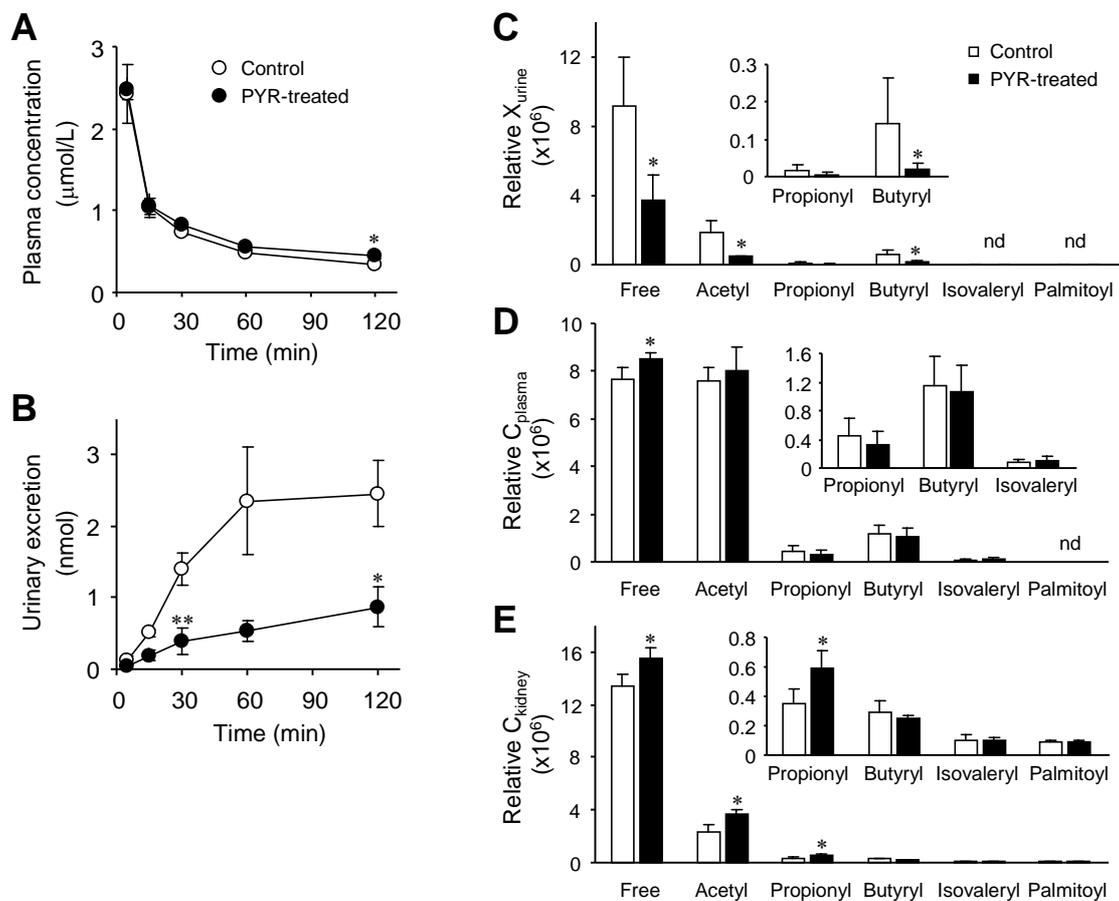


図 14. Carnitine- $d_3$  のマウス体内動態における pyrimethamine 処置の影響

Pyrimethamine (PYR、0 または 0.5 mg/kg) をマウスに静脈内投与し、その 30 分後に carnitine- $d_3$  (0.25 mg/kg) を静脈内投与した。Carnitine- $d_3$  の (A) 血漿中濃度推移および (B) 累積尿中排泄量 ( $X_{\text{urine}}$ ) は、LC-MS/MS によって測定された。対照群を白抜きで、PYR 処置群を黒塗りです。carnitine- $d_3$  投与 120 分後に得られた膀胱尿、血漿および腎は、メタボローム解析条件での LC-MS 測定に供された。(C) carnitine- $d_3$  およびそのアシル体の相対的  $X_{\text{urine}}$  は、尿容量 (mL) とピーク面積の積を表す。(D) 相対的血漿中濃度 ( $C_{\text{plasma}}$ ) および (E) 相対的腎内濃度 ( $C_{\text{kidney}}$ ) はいずれもピーク面積を表す。各ポイントは 3 または 4 例の平均  $\pm$  標準誤差を示す。\* および \*\* は、対照群に対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

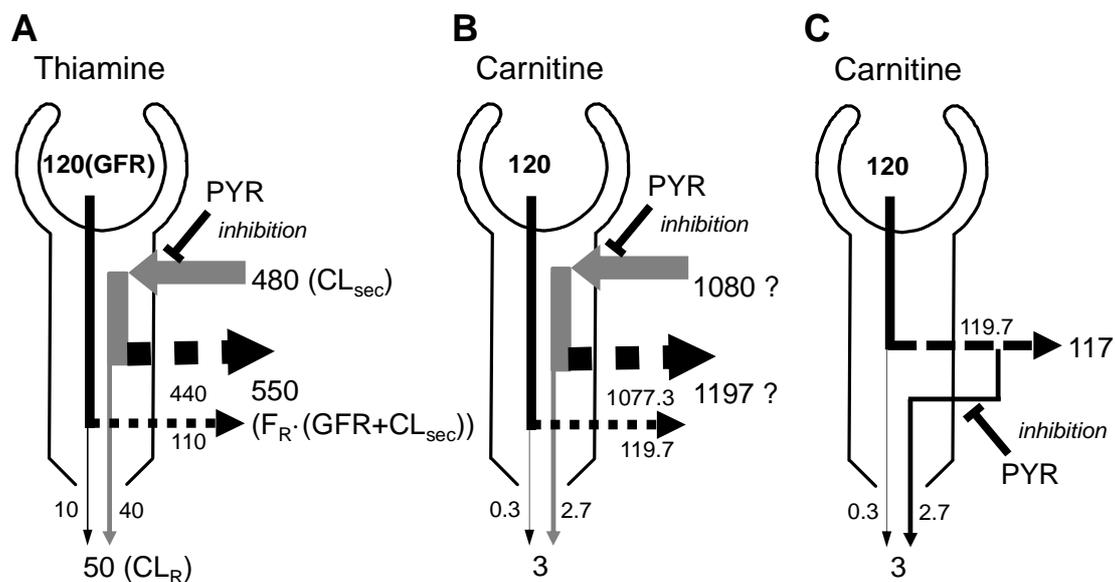


図 15. Thiamine および carnitine のヒト腎における動態の推定スキーム

(A) thiamine および (B) carnitine の  $CL_R$  は、 $CL_R = (GFR + CL_{sec}) \cdot (1 - F_R)$  によって定義された。ここで、 $GFR$ 、 $CL_{sec}$  および  $F_R$  は、それぞれ糸球体ろ過速度、尿細管分泌クリアランスおよび尿からの再吸収率を表す。Carnitine については、側底膜側の取り込みがないと仮定したダイアグラム (C) も作成した。これらのダイアグラムには糸球体ろ過 (黒色の矢印)、尿細管分泌 (灰色の矢印)、再吸収 (黒色の破線) のクリアランスの概算値を示す。数値の単位は  $mL/min$  である。なお、pyrimethamine は  $GFR$  および再吸収 [ $F_R \cdot (GFR + CL_{sec})$ ] に影響しないと仮定した。

表 4. 健康成人およびマウスにおいて pyrimethamine 処置により変動した生体内低分子化合物（マーカー候補）

No.	Identity	Retention time (min)	Protonated molecule (m/z)	Product ion (m/z)			Fold change (PYR-treatment/control)				
				Major	Others		Human †		Mouse ‡		
							Urine	Plasma	Urine	Plasma	Kidney
1	2'-deoxycytidine	3.1	228.09777	112.05058	189.10353	203.04364	0.5 ±0.1	N.D.	0.2 ±0.1	N.D.	N.D.
2	U196*	6.4	196.07310	114.12756	152.08356		0.5 ±0.3	1.2 ±0.2	0.5 ±0.1	0.8 ±0.2	0.9 ±0.2
3	N-methylnicotinamide	7.2	137.07066	94.06507			0.6 ±0.1	0.9 ±0.1	0.5 ±0.1	0.7 ±0.1	0.9 ±0.1
4	U132*	7.4	132.13782	114.09116	72.08055		0.3 ±0.1	N.D.	0.4 ±0.1	N.D.	1.4 ±0.5
5	L-Propionylcarnitine	7.7	218.13863	159.06537	85.02841	144.10213	0.2 ±0.1	0.8 ±0.05	0.3 ±0.1	0.8 ±0.2	1.3 ±0.2
6	Acetylcarnitine	8.0	204.12310	85.02834	145.04955	60.08047	0.3 ±0.1	0.9 ±0.1	0.3 ±0.1	1.0 ±0.1	1.3 ±0.2
7	Carnitine	8.4	162.11245	103.03891	60.08050	85.02836	0.4 ±0.2	1.0 ±0.1	0.5 ±0.1	1.0 ±0.02	1.0 ±0.03
8	Thiamine	8.8	265.11148	122.07133	144.04787	156.04790	0.3 ±0.1	N.D.	0.3 ±0.1	0.9 ±0.3	1.0 ±0.1
9	U171*	9.4	171.11242	124.08679	85.07588	109.07594	0.2 ±0.1	1.1 ±0.3	0.4 ±0.2	N.D.	1.7 ±0.6
10	U146*	9.7	146.11742	87.04407	60.08052		0.3 ±0.1	0.9 ±0.1	0.4 ±0.2	1.0 ±0.1	1.1 ±0.1
11	U160*	10.0	160.13317	101.05978	60.08054		0.2 ±0.1	0.7 ±0.1	0.4 ±0.2	1.2 ±0.2	1.1 ±0.2

\* 未同定化合物

N.D. : 検出下限未満

† クロスオーバーで試験された各被験者の変化倍率から計算された平均 ± 標準誤差 (n = 8) を表す。

‡ コントロール群および pyrimethamine 処置群の平均ピーク面積から計算された変化倍率を表す。標準誤差は、誤差伝搬式により概算した。

表 5. 健康成人男性の thiamine、carnitine および acetylcarnitine の AUC および腎クリアランス (CL<sub>R</sub>) における pyrimethamine 処置の影響

Compound	Parameter	Interval (h)	Period	Control	Period	PYR-treatment	
Thiamine	AUC (nmol·h/L)	1-7	1	35.0±2.0	2	35.8±1.8	
			3	37.6±2.1	4	33.7±1.8	
		7-13	1	43.1±3.0	2	40.8±2.2	
			3	44.6±2.3	4	35.6±2.0	**
	CL <sub>R</sub> (mL/min)	1-7	1	32.3±7.4	2	9.54±2.46	**
			3	58.6±9.4	4	9.55±1.85	**
		7-13	1	48.6±6.2	2	8.14±0.92	**
			3	48.1±8.3	4	10.7±3.1	**
Carnitine	AUC (μmol·h/L)	1-7	1	315±19	2	266±27	**
			3	317±17	4	282±19	*
		7-13	1	326±24	2	266±30	**
			3	347±23	4	288±25	**
	CL <sub>R</sub> (mL/min)	1-7	1	3.31±0.65	2	0.333±0.196	**
			3	2.49±0.75	4	0.242±0.076	*
		7-13	1	2.70±0.56	2	0.172±0.087	**
			3	2.37±0.57	4	0.180±0.042	**
Acetylcarnitine	AUC (μmol·h/L)	1-7	1	43.8±6.5	2	34.5±5.0	*
			3	44.6±6.0	4	37.4±5.8	*
		7-13	1	33.6±4.0	2	27.5±4.3	**
			3	33.4±4.1	4	28.6±4.1	**
	CL <sub>R</sub> (mL/min)	1-7	1	6.67±2.04	2	0.881±0.506	**
			3	6.13±2.08	4	0.746±0.314	*
		7-13	1	6.01±1.31	2	0.535±0.266	**
			3	5.55±1.22	4	0.645±0.145	**

Period 1 ではマイクロドーズの metformin (100 μg、po)、Period 2 ではマイクロドーズの metformin および pyrimethamine (50 mg、po)、Period 3 では治療用量の metformin (250 mg、po)、Period 4 では治療用量の metformin および pyrimethamine を被験者に投与した。速度論的パラメータの計算方法は、実験の部に示す。データは 8 例の平均±標準誤差を表す。Interval (h) は PYR 投与後の時間を表す。\* および \*\* は、対照群に対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  または  $P < 0.01$ ) を表す。

表 6. MATE1 および MATE2-K を介した thiamine 取り込みの速度論的パラメータ

Parameter	MATE1	MATE2-K
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$3.54 \pm 1.02$	$3.94 \pm 0.79$
$V_{\max}$ (pmol/2min/mg protein)	$105 \pm 25$	$50.7 \pm 9.3$
$P_{\text{dif}}$ ( $\mu\text{L}/2\text{min}/\text{mg protein}$ )	$3.87 \pm 0.66$	$3.55 \pm 0.27$

各値は 図 12 に示したデータから求めた。データは平均  $\pm$  標準誤差 ( $n = 3$ ) を表す。

### 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～

### 第三章 要約

**目的：**Thiamine のマウス体内動態における organic cation transporter 1 (Oct1) および Oct2 の役割を明確にし、その結果に基づいて thiamine が OCTs の機能評価マーカーとなりうる可能性を検討することを本章の目的とした。

**方法：**Oct1、Oct2、または Oct3 を発現させた HEK293 細胞、ならびに、Oct1/2(+/+)マウス由来および Oct1/2(-/-)マウス由来の新鮮単離肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込み活性を評価した。雄性 Oct1/2(+/+)マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスに thiamine-*d*<sub>3</sub> の静脈内持続注入 (1 および 100 nmol/kg/min) を行い、その体内動態を比較した。MATE 阻害実験には pyrimethamine (5 mg/kg) を用いた。また、雌性マウスの血漿中および乳汁中内因性 thiamine 濃度を測定した。

**結果：**Thiamine は、Oct1 および Oct2 の基質であったが、Oct3 の基質ではなかった。Oct1/2 欠損により、*in vitro* での肝細胞への [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込みは有意に低下し、かつ、*in vivo* において内因性 thiamine の血漿中濃度は 5.8 倍にまで上昇した。Thiamine-*d*<sub>3</sub> の血漿クリアランスは、Oct1/2(-/-)マウスにおいて有意に低かった。高用量注入時には、Oct1/2 欠損マウスおよび pyrimethamine 処置マウスで thiamine-*d*<sub>3</sub> の腎クリアランスが有意に低下した。Oct1/2(-/-)マウスの消化管における total thiamine 濃度および total thiamine-*d*<sub>3</sub> 濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて有意に低下したが、腎、肝および脳内の濃度は変化しなかった。Oct1/2(-/-)マウスにおける内因性 thiamine の乳汁/血漿中濃度比は、Oct1/2(+/+)マウスの 28 分の 1 であった。

**結論：**Oct1 は、循環血から肝細胞への thiamine の取り込みに関与し、thiamine の血漿クリアランスの決定因子となっていることが示唆された。また、過剰摂取時には、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。さらに副次的な知見であるが、Oct1/2 欠損により消化管組織中 total thiamine 濃度が低下すること、ならびに Oct1 は thiamine の乳汁分泌に関与していることが示唆された。

### 第三章 緒言

Organic cation transporters (OCTs/*SLC22A*) および multidrug and toxin extrusion proteins (MATEs/*SLC47A*) はいずれも様々な内因性および外因性カチオンを基質とし、それぞれが組織への取り込みおよび排出に関与することにより、体内の有機カチオン輸送システムを構築している(74)。OCTファミリーは3つのアイソフォーム、OCT1 (*SLC22A1*)、OCT2 (*SLC22A2*) および OCT3 (*SLC22A3*) からなる。ヒトにおいては、OCT1 および OCT2 がそれぞれ肝細胞および腎尿細管上皮細胞の側底膜においてカチオン性薬物の循環血からの取り込みに関与している。一方、ユビキタスに発現する OCT3 の薬物動態における役割については明らかとなっていない(75)。げっ歯類では、Oct1 が腎にも発現しており、Oct2 とともにカチオン性薬物の腎への取り込みに関与している(76)。ヒト MATE1 (*SLC47A1*) および MATE2-K (*SLC47A2*)、ならびに、げっ歯類の Mate1 は、腎近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜 (BBM) に発現している。MATE1 および Mate1 については、肝細胞の胆細管膜にも発現している(45)。それゆえ、MATEs は、様々なカチオン性薬物を細胞内から尿もしくは胆汁へと排出する輸送体として機能していると考えられている。

第二章で示したように、ヒトに MATE 阻害剤である pyrimethamine (PYR) を投与すると、MATEs の内因性基質 thiamine (vitamin B1) の尿中排泄量は有意に低下した。Thiamine は、cDNA トランスフェクト細胞を用いた *in vitro* 実験において MATE1 および MATE2-K によって輸送されることが報告されている(47)。我々は、同様の実験において、thiamine が MATEs の基質であるとともに、OCT2 の基質であることも明らかにした(第二章参照)。よって、thiamine は、医薬品開発における薬物相互作用のリスク評価において、MATEs のみならず、OCTs のバイオマーカーとしても機能しうる可能性が

期待された。本章では、その可能性を検証するため、Oct1/2 ノックアウトマウス (Oct1/2(-/-) マウス) を用いて thiamine の体内動態における Oct1/2 の役割に関して検討した。

これまでに、thiamine 特異的なトランスポーターとして、THTR-1 (*SLC19A2*) および THTR-2 (*SLC19A3*) の2つがクローニングされている (72,77,78)。THTR-1 は、骨格筋をはじめ、胎盤、心臓、肝および腎に高発現している (72)。一方、THTR-2 は、十二指腸に高発現している (77)。加えて、赤血球における THTR-1 の発現 (79) や腎および脳における THTR-2 の発現が示唆されている (80,81)。THTR-1 は、糖尿病、難聴、貧血といった症状を呈する thiamine-responsive megaloblastic anemia (OMIM ID #249270) の原因遺伝子である (82,83)。Thtr-1(-/-) マウスでは、赤血球における thiamine の取り込みが顕著に低下した (84)。THTR-2 は、再発性亜急性脳症の症状を呈する biotin-responsive basal ganglia disease (OMIM ID #607483) の原因遺伝子である (85)。Thtr-2(-/-) マウスでは、小腸からの thiamine 吸収の低下が認められた (86)。ラット肝細胞における thiamine の取り込みには飽和性が見られること、ならびに 4 級アミンの choline によってその取り込みが阻害されることが報告されている (87)。Choline は THTR-1 に対する阻害活性を持たないが、OCT1 に対して阻害活性を示す (72,74)。これは OCT1 が肝への thiamine の取り込みに関与している可能性を示すものである。そこで本章では、組織への thiamine の取り込みにおける Oct1/2 の役割、ならびに thiamine の血漿クリアランスに Oct1/2 欠損が与える影響について検証することを第一の目的とした。

生理的条件下において thiamine は、腎で糸球体ろ過および尿細管分泌された後、そのほとんどが再吸収される (80)。第二章に示したように、我々の研究では、尿中 thiamine の 90%以上が再吸収されると試算された。一方、過剰量の thiamine を摂取した際には、再吸収が飽和するため、糸球体ろ過および尿細管分泌された thiamine は速やかに尿中排泄される (71)。本章では、この thiamine の尿細管分泌における Oct1/2 および *Mate1* の

役割を明らかにすることを第二の目的とした。

さらに本章では、組織中 total thiamine 濃度の恒常性ならびに thiamine の乳汁分泌における Oct1/2 欠損の影響についても検討した。生体内において thiamine は、thiamine pyrophosphokinase (TPK) によって、thiamine pyrophosphate (TPP) にリン酸化される (88)。TPP は、複数の重要な細胞内代謝反応の補酵素として機能している。Pentose phosphate 経路の transketolase、ミトコンドリア内の tricarboxylic acid (TCA) 回路の pyruvate dehydrogenase および  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase やアミノ酸異化を行う branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase、ならびに、ペルオキシソーム内の分岐脂肪酸の  $\alpha$ -酸化を行う 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase の酵素反応に必須とされている (89,90)。Thiamine 欠乏症として、脚気、乳酸アシドーシス、ウェルニッケ・コルサコフ症候群、中枢および末梢の神経障害、ならびに冠動脈障害が知られている (91,92)。このように thiamine は組織におけるエネルギー代謝に重要な役割を果たしている。そこで、組織への thiamine の取り込みの低下が推察される Oct1/2(-/-) マウスにおいて thiamine 欠乏状態になっているか否かを検証するため、組織中 total thiamine 濃度を測定した。

また、thiamine は乳児にとっても必須の栄養素である (93)。ごく最近、Ito らは、Oct1 が授乳期の乳腺上皮細胞 (MEC) で誘導され、乳汁への Oct1 基質の分泌に関与していることを明らかにした (94)。そこで今回、thiamine の乳汁分泌における Oct1 の役割について Oct1/2(-/-) マウスを用いて検討した。

以上のように、本章では、生理的条件および過剰摂取条件の両方で thiamine のマウス体内動態における Oct1 の役割を *in vivo* 速度論的解析によって検証し、その結果から thiamine の OCT1 機能評価マーカーとしての可能性を明示する。加えて、組織中 total thiamine 濃度の恒常性、ならびに thiamine の乳汁分泌に関するメカニズムに関して新しい知見を与えるものである。

### 第三章 結果

#### cDNA トランスフェクト細胞における thiamine の取り込み

Oct1 発現細胞、Oct2 発現細胞 および Oct3 発現細胞における [<sup>3</sup>H]MPP<sup>+</sup> (Oct1、Oct2、Oct3 の典型基質 ; 100 nM) の取り込みは、empty-vector を導入したコントロール細胞よりも有意に高く、かつ、その取り込みは TEA によって阻害された (図 16A)。Oct1 発現細胞および Oct2 発現細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine (100 nM) の取り込みもコントロール細胞と比べて有意に高く、かつ、その取り込みは TEA によって阻害された。一方、Oct3 発現細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込みはコントロール細胞に比べて増加傾向を示したが、TEA による阻害効果はほとんど見られなかった (図 16A)。Oct1 発現細胞および Oct2 発現細胞における thiamine の取り込みは、飽和性の取り込みと非飽和性の取り込みから構成された (図 16B および図 16C)。最小二乗法によって得られた Oct1 および Oct2 の速度論的パラメータを表 7 に示す。

#### マウス肝細胞における thiamine の取り込み

Organic anion transporting polypeptides (Oatps) および Ocats のそれぞれの典型的基質である estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide および MPP<sup>+</sup> のマウス単離肝細胞における取り込み活性を図 17 に示す。Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide の取り込みは、Oct1/2 野生型 (Oct1/2(+/+)) マウスと Oct1/2(-/-) マウスにおいて同等であり、その取り込みは、Oatps 阻害剤の rifampicin によって有意に阻害された。一方、MPP<sup>+</sup> の取り込みは、Oct1/2(+/)マウス由来肝細胞と比較して、Oct1/2(-/-) マウス由来肝細胞において有意に低く、TEA 添加によってさらに低下した。

[<sup>3</sup>H]thiamine の肝細胞取り込み実験における基質濃度 (100 nM) は、Yoshioka らがラ

ット肝細胞で求めた2つの  $K_m$  値 (1.3 および 34  $\mu\text{M}$ ) (87) に基づいて設定した。本研究で求めた  $K_m$  値を考慮すると、過剰添加濃度 (500  $\mu\text{M}$ ) は、Oct1 を介する取り込みを飽和させるのに十分な濃度であると考えられた。Oct1/2(-/-)マウス由来肝細胞におけるトレーサー濃度の [ $^3\text{H}$ ]thiamine の取り込みは、Oct1/2(+/+)マウス由来肝細胞と比較して有意に低かった (図 18A)。また、Oct1/2(+/+)マウス由来肝細胞への [ $^3\text{H}$ ]thiamine の取り込みは、過剰量の非標識 thiamine (500  $\mu\text{M}$ ) または TEA の添加によって有意に低下した (図 18B)。Oct1/2(-/-)マウス由来肝細胞への [ $^3\text{H}$ ]thiamine の取り込みも、統計学的に有意ではないものの、過剰量の非標識 thiamine (500  $\mu\text{M}$ ) または TEA の添加によって低下した。

### Oct1/2 欠損が血漿中内因性 thiamine 濃度に与える影響

マウスの飼料 (CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan) には vitamin として thiamine を含有している。本研究においては、この飼料由来の thiamine を内因性 thiamine として扱った。血漿中内因性 thiamine 濃度は、Oct1/2(+/+)マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスでそれぞれ、 $0.0972 \pm 0.0139$  および  $0.559 \pm 0.060$  nmol/mL ( $n=5$ ) であり、両者に統計学的に有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。

### Oct1/2 欠損が生理的条件下における thiamine- $d_3$ のクリアランスに与える影響 (Experiment 1)

Thiamine- $d_3$  を低用量 (1 nmol/kg/min) で定速持続注入した際の Oct1/2(+/+)マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度推移を図 19 に示す。尿中排泄量 ( $X_{\text{urine}}$ ) および薬物速度論的パラメータを表 8-Experiment 1 に示す。Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて有意に高かった。

Oct1/2(-/-)マウスでは、注入開始 80 分の血漿中 thiamine- $d_3$  濃度がプラトーに達していないことから、Oct1/2(-/-)マウスの  $CL_{plasma,app}$  は、真の値である  $CL_{plasma}$  よりも過大評価している。よって、Oct1/2(-/-)マウスの血漿クリアランス ( $CL_{plasma}$ ) は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて 80%以上低下していることになる。腎クリアランス ( $CL_R$ ) は、 $CL_{plasma}$  にほとんど寄与しなかった (Oct1/2(+/+) マウスで 0.36%)。Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスの  $X_{urine}$  に有意な差はなかった。Oct1/2(-/-)マウスの  $CL_R$  は、統計学的に有意ではないものの、Oct1/2(-/-) マウスよりも低い値を示した (表 8-Experiment 1)。

### 血液/血漿中 thiamine- $d_3$ 濃度比

Oct1/2(+/+) マウスにおける thiamine- $d_3$  の血液/血漿中濃度比 ( $R_b$ ) は、実効濃度が 0.085  $\mu\text{M}$  (内因性 thiamine 濃度 0.075  $\mu\text{M}$  と thiamine- $d_3$  添加濃度 0.01  $\mu\text{M}$  を足した値) のとき、2.68 であった (図 20)。Oct1/2(-/-) マウスにおける  $R_b$  値は、実効濃度が 0.48  $\mu\text{M}$  (内因性 thiamine 濃度 0.47  $\mu\text{M}$  と thiamine- $d_3$  添加濃度 0.01  $\mu\text{M}$  を足した値) のとき、0.78 であった。3  $\mu\text{M}$  以上の実効濃度における Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスの  $R_b$  値はいずれも約 1 であった。

### Oct1/2 欠損が過剰摂取時の thiamine- $d_3$ のクリアランスに与える影響 (Experiment 2)

Thiamine- $d_3$  を高用量 (100 nmol/kg/min) で定速持続注入した際の Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度推移を、図 21A に示す。 $X_{urine}$  および薬物速度論的パラメータを表 8-Experiment 2 に示す。過剰摂取条件下において、Oct1/2(+/+)マウスにおける thiamine- $d_3$  の尿中排泄は、体循環からの消失の 67%を占めた。Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は、Oct1/2(+/+) マウスに比べて有意に高かった。Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は、注入開始 80 分で

プラトーに達しなかったことから、Oct1/2(-/-)マウスの  $CL_{\text{plasma,app}}$  は、真の値である  $CL_{\text{plasma}}$  よりも過大評価している。よって、Oct1/2(-/-)マウスの  $CL_{\text{plasma}}$  は、Oct1/2(+/+)マウスと比較して 78% 以上低下していることになる。Oct1/2(+/+)マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスの  $X_{\text{urine}}$  に有意な差はなかったが、Oct1/2(-/-)マウスでは血漿中濃度が増加したことから、Oct1/2(-/-)マウスの  $CL_R$  は、Oct1/2(+/+)マウスと比較して 79% 低下した。

### **Pyrimethamine による Mate 阻害が thiamine- $d_3$ のクリアランスに与える影響**

#### **(Experiment 3)**

Pyrimethamine (PYR) 処置群マウスには、thiamine- $d_3$  (100 nmol/kg/min) の定速持続注入開始 10 分前に、選択的 MATE 阻害剤の PYR (5 mg/kg) を急速静脈内投与した。thiamine- $d_3$  注入開始 80 分後の腎および血漿中 PYR の総濃度は、それぞれ  $51.1 \pm 3.4$  および  $5.55 \pm 0.81 \mu\text{M}$  であった。腎および血漿中 PYR の非結合型濃度を、既報の非結合型分率 (腎および血漿でそれぞれ 0.026 および 0.081 (55)) と総濃度との積として求めたところ、それぞれ  $1330 \pm 87$  および  $449 \pm 66 \text{ nM}$  であった。腎内 PYR の非結合型濃度は、マウス Mate1 に対する  $K_i$  値 (145 nM (55)) に比べて顕著に高かった。血漿中の PYR 非結合型濃度は、マウス Oct1 および Oct2 に対する  $K_i$  値 (それぞれ 3.6 および 6.0  $\mu\text{M}$  (55)) に比べて顕著に低かった。よって、PYR 処置により Mate1 は阻害されているが、Oct1 および Oct2 は阻害されていないものと考えられた。

対照群および PYR 処置群の thiamine- $d_3$  の血漿中濃度推移を、図 21B に示す。 $X_{\text{urine}}$  および薬物速度論的パラメータを表 8-Experiment 3 に示す。PYR 処置群マウスにおける thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は、対照群に比べて有意に高かった。PYR 処置群マウスの  $CL_{\text{plasma}}$  および  $CL_R$  は、対照群と比較してそれぞれ 47% および 58% 低下した。

### Oct1/2 欠損が組織中および血漿中 total thiamine 濃度に与える影響

TMP および TPP の標準品 (1 および 10  $\mu\text{M}$ ) は、acid phosphatase を添加後、室温で一晩放置することによって完全に水解した (データ示さず)。酵素水解後の thiamine 濃度を total thiamine 濃度と定義した。雄性 Oct1/2(+/+)マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスから thiamine- $d_3$  の定速持続注入開始 80 分後に採取した、血漿、腎、肝、十二指腸、空腸、回腸、結腸および脳における内因性 total thiamine 濃度と外因性 total thiamine- $d_3$  濃度を、表 9 に示す。腎、肝および脳内の total thiamine および total thiamine- $d_3$  濃度には、Oct1/2(+/+)マウスと Oct1/2(-/-)マウスの間で差がなかったが、Oct1/2(-/-)マウスの消化管における total thiamine および thiamine- $d_3$  濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて有意に低かった (それぞれ 0.6~0.8 倍および 0.3~0.4 倍)。一方、Oct1/2(-/-)マウスの血漿中 total thiamine および total thiamine- $d_3$  濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて有意に高かった (それぞれ 2.7 倍および 3.2 倍) (表 9)。血漿には、thiamine のリン酸エステルとして、thiamine monophosphate (TMP) が存在するが、TPP はほとんど存在していない (95)。そこで、酵素水解による血漿中 thiamine の増加分をすべて TMP と仮定すると、Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスの血漿中 TMP 濃度は、それぞれ  $0.119 \pm 0.027$  および  $0.0369 \pm 0.0115$  nmol/mL であり、統計学的に有意な差を示した ( $P < 0.05$ ,  $n=5$ )。

### Oct1/2 欠損が授乳期マウスの血漿中および乳汁中 thiamine 濃度に与える影響

授乳期の雌性 Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中および乳汁中の内因性 thiamine 濃度を、図 22 および表 10 に示す。Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中 thiamine 濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて 2.8 倍高かった。これに対し、Oct1/2(-/-)マウスにおける乳汁中 thiamine 濃度は、Oct1/2(+/+)マウスの 9.8 分の 1 であった。Oct1/2(-/-)マウスにおける乳汁/血漿中濃度比 (M/P) は、Oct1/2(+/+)マウスの 28 分の 1

であった。

### 第三章 考察

#### 1. OCTs 機能評価マーカーとしての thiamine の可能性

本章の主な目的は、マウスを用いて thiamine の血漿クリアランスおよび腎クリアランスにおける Octs の役割を検証することにより、thiamine が OCTs を介した薬物相互作用のリスク評価マーカーとなりうる可能性を明示することである。

##### (1) Octs による thiamine 輸送活性

*In vitro* 実験により、thiamine が、組織特異的に発現するアイソフォームである Oct1 および Oct2 の基質であるが、ユビキタスに発現する Oct3 の基質ではないことを明らかにした (図 16)。Oct1 および Oct2 を介した thiamine 輸送の  $K_m$  値は、それぞれ 36.3 および 22.6  $\mu\text{M}$  であり (表 7)、thiamine 特異的トランスポーター THTR-1 および THTR-2 の  $K_m$  値 (それぞれ 2.5  $\mu\text{M}$  (72) および 27 nM (77)) 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。

##### (2) Thiamine の血漿クリアランスにおける Oct1/2 の役割

Thiamine の体内動態における Oct1 および Oct2 の重要性を検証するため、Oct1/2(-/-) マウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 実験を行った。Oct1/2(-/-) マウス由来肝細胞では、Oct1/2(+/+) マウス由来肝細胞に比べて取り込み活性が著明に低下した (図 18)。Oct1/2(-/-) マウスにおける内因性 thiamine の血漿中濃度は、Oct1/2(+/+) マウスよりも 5.8 倍高い値を示した。一方、血漿中 TMP 濃度は、Oct1/2(-/-) マウスにおいて有意に低かった。次いで、Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスにおける thiamine- $d_3$  の体内動

態試験を行い、速度論的解析を行った。Thiamine- $d_3$  を 1 nmol/kg/min で静脈内持続注入時において、thiamine- $d_3$  の血漿中濃度が、内因性 thiamine 濃度の 20 分の 1 未満であったことから (図 19)、thiamine- $d_3$  の体内動態は、生理的条件下の内因性 thiamine の体内動態を表しているものと考えられた。Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中 thiamine- $d_3$  濃度は、Oct1/2(+/+)マウスに比べて有意に高くなり (図 19)、 $CL_{\text{plasma}}$  は 80%低下した (表 8-Experiment 1)。但し、Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中 thiamine- $d_3$  濃度は、注入開始 80 分後に定常状態に達していないため、 $CL_{\text{plasma}}$  を過大評価している。従って、Oct1/2 欠損による実際の  $CL_{\text{plasma}}$  低下は、実測値よりもさらに大きいものと考えられる。体内からの thiamine- $d_3$  の消失において、尿中排泄の寄与はごくわずかであったことから (表 8-Experiment 1)、腎特異的に発現する Oct2 の欠損ではなく、腎のほか、肝および消化管に発現する Oct1 の欠損がこの変化に大きく寄与していることが示唆された。Oct1/2 欠損に伴う  $CL_{\text{plasma}}$  低下分が、そのまま Oct1 介在輸送の寄与率を表しているかどうかについては議論の余地がある。第一に、腎外クリアランス全体に占める、Oct1 が発現する肝および消化管におけるクリアランスの割合が現時点で不明である。これには、Oct1/2(+/+)マウスと Oct1/2(-/-)マウスにおける各組織の固有クリアランスを比較することが必要である。第二に、非線形性が存在する場合、Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中の内因性 thiamine 濃度が Oct1/2(+/+)マウスよりも高いことが、thiamine- $d_3$  のクリアランスや組織移行に影響を与えている可能性がある。

赤血球における THTR-1 を介した thiamine の取り込みに飽和性が認められていることから (84)、Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine- $d_3$  の  $R_b$  値が Oct1/2(+/+)マウスのものと異なることが推察された。実際に、Oct1/2(+/+)マウスと Oct1/2(-/-)マウスの血液を用いて、生理的条件下の濃度の内因性 thiamine が存在する状態 (それぞれ約 0.1 および 0.5  $\mu\text{M}$ ) での thiamine- $d_3$  の  $R_b$  値を測定した結果、Oct1/2(-/-)マウスの  $R_b$  値は、Oct1/2(+/+)

マウスの3分の1であった(図20)。Oct1/2(-/-)マウスの内因性 thiamine 濃度(約 0.5  $\mu$ M)と同程度の濃度においては、Oct1/2(+/+)マウスの  $R_b$  値は、Oct1/2(-/-)マウスと同等にまで低下した(図20)。よって、Oct1/2(-/-)マウスでは、血漿中濃度の上昇に伴って赤血球への取り込みが低下したものと考えられた。Oct1/2(+/+)マウスと Oct1/2(-/-)マウスにおける血液中 thiamine 濃度における差は、 $R_b$  値の非線形性によって、血漿中濃度の差よりも小さくなっている。従って、この赤血球における取り込みの非線形性は、生体内 thiamine 量を制限する方向に働いていると考えられる。

血漿中 thiamine 濃度が疾病と関連する症例として、Thornally らは、英国内の1型および2型糖尿病患者が低い血漿中 thiamine 濃度を示すこと、ならびに、高用量の thiamine 投与により、糖尿病合併症(細小血管障害)の主要評価項目である尿中 albumin 排泄量(UAE)が低下したことを報告している(79,96)。よって、OCT1 阻害による血漿中 thiamine 濃度の是正は、細小血管障害リスクの低減効果をもたらす可能性がある。

### (3) Thiamine の腎クリアランスにおける Oct1/2 の役割

Oct1/2 の腎における役割については、Octs が両方向性の輸送特性を有すること、ならびに、生理的条件下では尿中 thiamine の大部分が再吸収を受けることを考え合わせると、Oct1/2 は、腎において側底膜での血液への thiamine の排出に関与している可能性が考えられた。しかしながら、Oct1/2(-/-)マウスにおける  $CL_R$  は、統計学的な有意差はないものの、減少傾向を示したことから(表8-Experiment 1)、Oct1/2 は、thiamine の尿への分泌に関与していると考えられる。Thiamine の再吸収に関与するトランスポーターは、現在のところ、完全な同定に至っていない。免疫組織化学的染色によって、ヒト腎における THTR-1 および THTR-2 が近位尿細管上皮細胞の BBM に局在することが示され、尿からの取り込み過程に両トランスポーターが関与することが推察された(80)。加えて、

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞では THTR-2 は頂端膜に、THTR-1 が基底膜および頂端膜の両方に発現していたことから (97)、Larkin らは、THTR-1 が尿細管上皮細胞の側底膜にも存在するものとして、THTR-1 を循環血への排出トランスポーターの候補としている (80)。

Oct1 および Oct2 を介した thiamine の尿細管分泌を明瞭化するため、Thtrs による再吸収が飽和した状態、即ち、過剰量の thiamine が存在する条件下で thiamine の  $CL_R$  を測定した (表 8-Experiment 2)。過剰量の thiamine- $d_3$  (100 nmol/kg/min) をマウスに静脈内持続注入した結果、尿中排泄が循環血からの主な消失ルートとなり (67%以上)、 $CL_R$  は糸球体ろ過速度 (GFR ; 17 mL/min/kg (55)、14 mL/min/kg (98)) よりも大きな値を示した。Oct1/2(-/-)マウスと pyrimethamine 処置マウスでは、thiamine- $d_3$  の  $CL_R$  の有意な低下が認められた (表 8- Experiment 2 および Experiment 3)。これは、Oct1/2 および Mate1 が thiamine の尿細管分泌に寄与していることを示唆するものである。Pyrimethamine 処置マウスの  $CL_R$  が、Oct1/2(-/-)マウスと比較して大きかったことから、本実験における pyrimethamine 投与条件では尿細管分泌を完全に抑えることができなかったと考えられる。この理由として、Mate1 を完全に阻害させるには不十分な pyrimethamine 濃度であった可能性、ならびに、Mate1 よりも寄与は小さいが pyrimethamine によって阻害を受けない未知のトランスポーターが関与している可能性の 2 つが考えられる。

#### (4) OCTs 機能評価マーカーとしての期待

以上の結果から、生理的条件下の血漿中 thiamine 濃度の決定因子としての Oct1 の重要性、ならびに thiamine 過剰摂取時の thiamine の尿細管分泌における Oct1、Oct2 および Mate1 の重要性が示された。それゆえ、今後ヒトにおける検証試験が必要ではあるが、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。

## 2. 組織中 total thiamine 濃度の恒常性における Oct1/2 欠損の影響

上述した通り、Oct1/2 が組織への thiamine の取り込みに関与していることが示唆されたことから、Oct1/2(-/-)マウスの組織で thiamine 欠乏状態となっている可能性が考えられた。これを検証するため、thiamine とその活性体 TPP 等のリン酸エステルを含む total thiamine の組織中濃度を測定した (表 9)。肝、腎、脳では TPP および TMP の合計が total thiamine の 90%以上を占める (99)。本研究で得られた組織中 total thiamine 濃度は、既報値 (99) と一致した。血漿中濃度とは異なり、腎、肝および脳内の total thiamine 濃度は、Oct1/2(+/+) マウスと Oct1/2(-/-)マウスの間で違いがほとんど認められなかった。小腸および大腸内濃度では、Oct1/2(-/-)マウスで有意な低下がみられた。しかしながら、Oct1/2(-/-)マウスの消化管内 total thiamine 濃度は、thiamine 欠乏症状が見られる組織中濃度 (100) よりは相当高い値であった。よって、通常餌で飼育された Oct1/2(-/-)マウスは、少なくとも生理的条件下において thiamine 欠乏状態には至らないものと考えられた。

Oct1/2 欠損による組織への thiamine 取り込みの低下分は、血漿中濃度の増加分によって補われると考えられる。この点は、Oct1(-/-) マウスにおいて肝への移行が顕著に抑制された metformin の体内動態結果 (101) とは全く異なる。これは、肝細胞では Oct1 以外に、thiamine 特異的トランスポーターの Thtr-1 または Thtr-2 による血漿からの thiamine の取り込みが存在するからだと説明することができる。実際、Oct1/2(-/-)マウス由来肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込みにおいて、統計学的有意性はないものの、過剰量の thiamine の添加によって取り込み活性の低下傾向がみられている (図 18B)。内因性

thiamine の血漿中濃度は、THTR-2 の  $K_m$  値 (27 nM (77)) よりも高かった。ヒト THTRs とマウス Thtrs の  $K_m$  値に種差がないと仮定すると、マウス血液からの Thtr-2 を介した輸送が生理的条件下においても飽和していることを示す。よって、Thtr-1 (THTR-1 の  $K_m$  値 2.5  $\mu$ M (72)) が、Thtr-2 よりも大きく寄与しているものと考えられる。また、reduced folate carrier (RFC、*SLC19A1*) が、THTR-1 が変異を起した際に、血漿から組織への TMP を取り込むことで代替輸送ルートの機能を果たし、組織内 total thiamine 濃度の維持に寄与している可能性が報告されている (102)。Oct1/2(-/-)マウスにおける血漿中 TMP 濃度が Oct1/2(+/+)マウスより有意に低下していたことから、TMP が Oct1/2(-/-)マウスの肝内および腎内 total thiamine 濃度の維持に寄与している可能性が考えられる。

一方、消化管においては、Thtr-1 および Thtr-2 が管腔側から血液側への thiamine 輸送に関与しているため (103)、血液側からの thiamine 輸送担体は Oct1 以外に存在しないものと考えられる。このように考えれば、Oct1 の機能低下が消化管組織内 total thiamine 濃度に与えた影響を説明できる。我々の推察 (101) とは異なり、Han らは、OCT1 および Oct1 がそれぞれヒトおよびマウスの消化管の頂端膜に局在していることを示した (104)。この知見に基づけば、Oct1 欠損による消化管細胞内 thiamine 濃度の低下は、胆汁に排泄された thiamine の管腔側からの取り込みが低下することによって引き起こされたものと考えられる。Thiamine の消化管吸収における Oct1 の関与を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

脳には Oct1/2 がほとんど発現していない (76)。Oct1/2(-/-)マウスの血漿中 thiamine 濃度が Oct1/2(+/+)マウスの 5.8 倍であるにも関わらず、脳内 total thiamine の増加は見られなかった。Thiamine の脳内濃度は、thiamine の取り込みトランスポーターの飽和によって維持されているものと推定される。実際、*in situ* ラット脳還流実験において、脳への thiamine の取り込みに飽和性が認められ、その取り込みの  $K_m$  値は 96 nM であった

(105)。本研究で測定した内因性 thiamine 濃度が 100 nM 程度であることから、生理的条件下、thiamine の脳移行は非線形性領域であると考えられる。

以上のように、Oct1/2 欠損は消化管組織内の total thiamine 濃度を低下させたが、その低下率は限定的であった。肝、腎および脳の total thiamine 濃度においては Oct1/2 欠損による影響は認められず、恒常性が保たれていた。

### 3. Thiamine の乳汁分泌における Oct1/2 欠損の影響

授乳期の Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine の乳汁/血漿中濃度比 (M/P) を測定したところ、Oct1/2(+/+)マウスの 28 分の 1 にまで低下していることが明らかとなった (図 22)。授乳期の雌性 Oct1/2(-/-)マウスの血漿中内因性 thiamine 濃度は、相当する Oct1/2(+/+)マウスよりも高かったのに対し、乳汁中 thiamine 濃度は、Oct1/2(+/+)マウスと比較して著しく低かった。授乳期マウスの乳腺における Oct1 の発現量が Oct2 よりも相当高いこと (94) を考慮すると、Oct1 が thiamine の乳汁分泌に関与していると考えられる。腎や肝とは異なり、Mate1 の発現は乳腺では著しく低いことから (94)、乳腺上皮細胞 (MEC) 内からの乳汁への thiamine の排出に関わるトランスポーターは不明である。これまでに ABC トランスポーターの breast cancer resistance protein (BCRP) が乳腺で riboflavin (vitamin B2) の乳汁分泌に関与することが報告されている (106)。しかしながら、Bcrp(-/-)マウスにおける、thiamine を含む他の vitamin B 群の濃度は、Bcrp(+/+)マウスと変わらなかった。乳汁への thiamine の排出には、他の未知トランスポーターが介在するものと考えられる。Maela 難民キャンプにおいて 636 名の授乳期の女性の乳汁中 total thiamine (thiamine および TMP) を測定した結果、その平均値は 755 nM (四分位範囲 : 730~781nM) であったが、全体の 4.1% は 300 nM 未満の濃度であった (107)。P283L や P341L のように機能低下を引き起こす、SLC22A1 遺伝子変異 (108,109) が関

連している可能性が考えられる。

以上のように、Oct1 は thiamine の乳汁分泌に大きく関与していることが示唆された。

第三章 図表

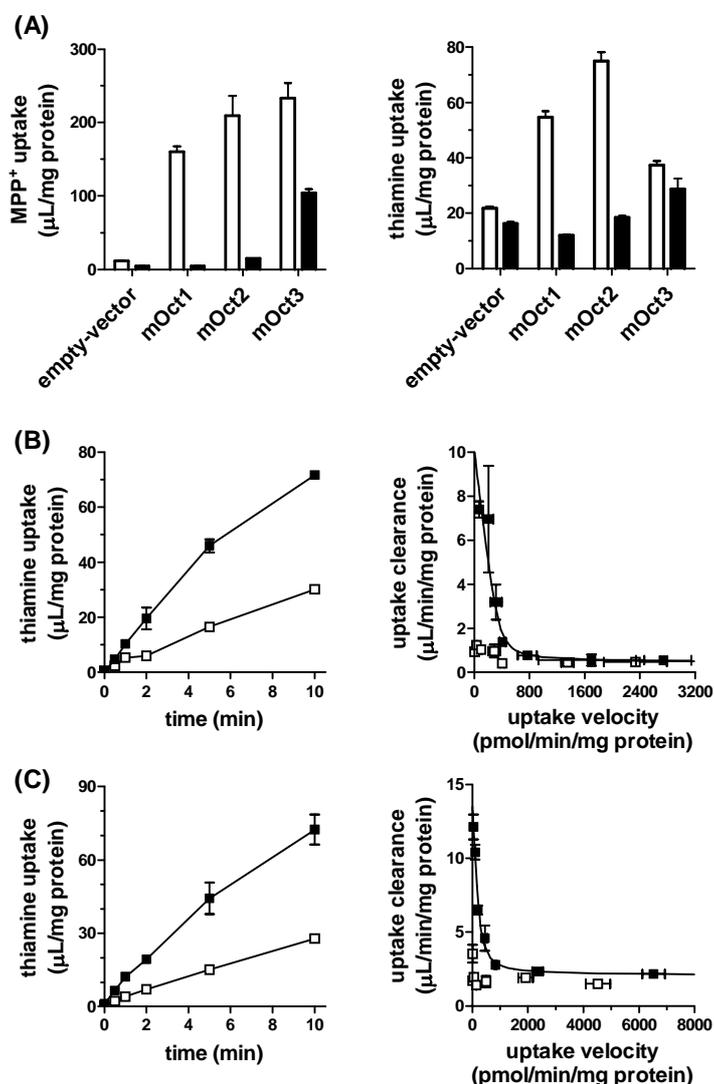


図 16. Oct1、Oct2、Oct3 の各発現細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込み

(A) 各 Oct 発現 HEK293 細胞、ならびに empty-vector 導入 HEK293 細胞を、<sup>[3</sup>H]MPP<sup>+</sup> (100 nM)、もしくは<sup>[3</sup>H]thiamine (100 nM) とともに、TEA (5 mM) の存在下 (黒塗り) または非存在下 (白抜き)、37°C で 10 分間インキュベートした。(B) Oct1 発現細胞 (黒塗り) および (C) Oct2 発現細胞 (黒塗り)、ならびに、empty-vector 導入細胞 (白抜き) における<sup>[3</sup>H]thiamine (100 nM) の取り込みを経時的に評価した (左のグラフ)。Thiamine の取り込みの濃度依存性を、Eadie-Hofstee プロットで表した (右のグラフ)。Thiamine 濃度は 3~3000 μM とした。データは平均 ± 標準誤差 (n = 3) で表す。

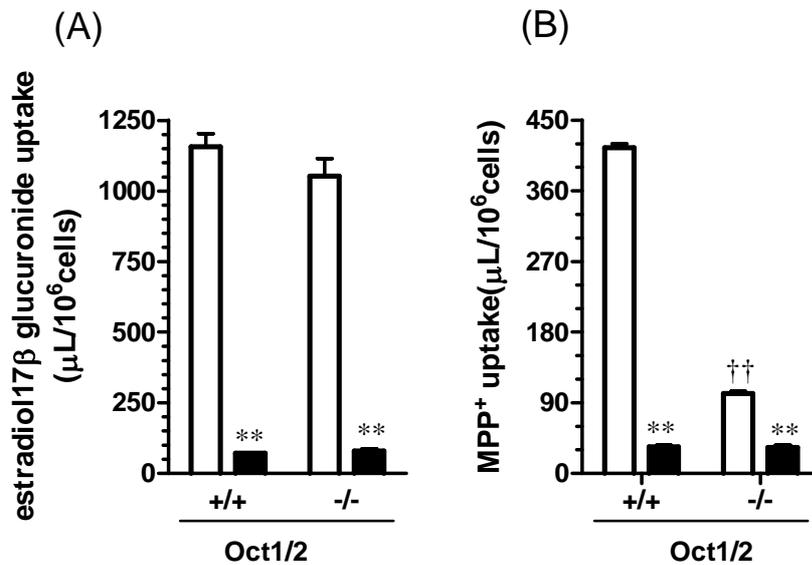


図 17. Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスから単離した肝細胞における estradiol 17β-D-glucuronide および MPP<sup>+</sup>の取り込み

マウス単離肝細胞における (A) estradiol 17β-D-glucuronide および (B) MPP<sup>+</sup> の取り込みを 37°C で 2 分間インキュベート後に評価した。阻害剤の非存在下 (白抜き) および存在下 (黒塗り) における取り込みを表す。阻害剤として、estradiol 17β-D-glucuronide の取り込みには rifampicin (100 μM) を、MPP<sup>+</sup> の取り込みには TEA (5 mM) を用いた。データは 平均 ± 標準誤差 (n = 3) で表す。

\*\* は、対照条件に対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.01$ ) を表す。

†† は、Oct1/2(+/+)マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.01$ ) を表す。

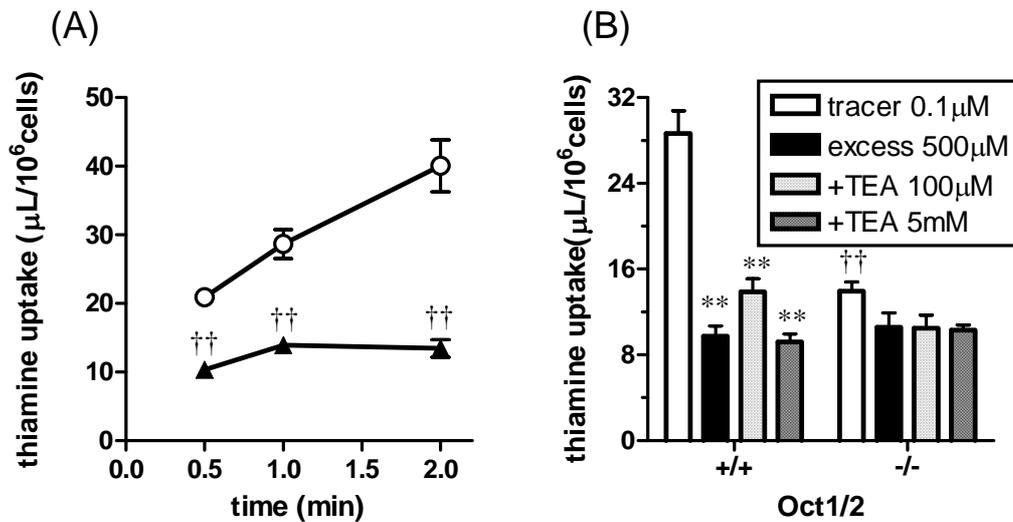


図 18. Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスから単離した肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込み

(A) Oct1/2(+/+)マウス（白抜き）および Oct1/2(-/-)マウス（黒塗り）から単離した新鮮な肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine（100 nM）の取り込みを 37°C で所定時間インキュベート後に評価した。(B) マウス単離肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込み（100 nM）を 37°C で 1 分間インキュベート後に評価した。 [<sup>3</sup>H]thiamine（100 nM）の取り込みにおける thiamine（500 μM）添加および TEA（100 μM および 5 mM）添加の影響についても評価した。データは平均 ± 標準誤差（n = 3）で表す。

\*\* は、対照条件に対する差の統計学的有意性（ $P < 0.01$ ）を表す。

†† は、Oct1/2(+/+)マウスに対する差の統計学的有意性（ $P < 0.01$ ）を表す。

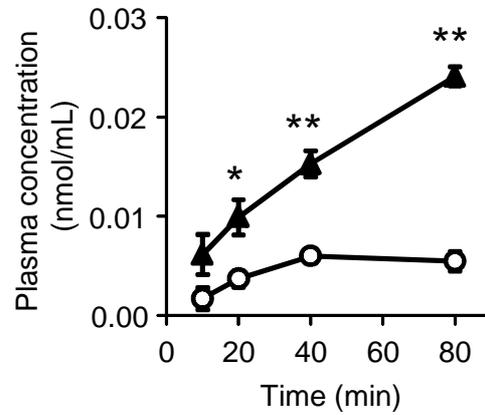


図 19. マウスに低用量で thiamine- $d_3$  を投与時の血漿中濃度における Oct1/2 欠損の影響

Thiamine- $d_3$  を 1 nmol/kg/min の速度でマウスに静脈内持続注入した。血液は注入開始後の所定時間に頸静脈から採血した。Oct1/2 (+/+) マウス（白抜き）および Oct1/2 (-/-) マウス（黒塗り）における thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は LC-MS/MS を用いて測定した。各ポイントは、平均値 ± 標準誤差 (n = 4) を表す。

\*および\*\* は、Oct1/2 (+/+) マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

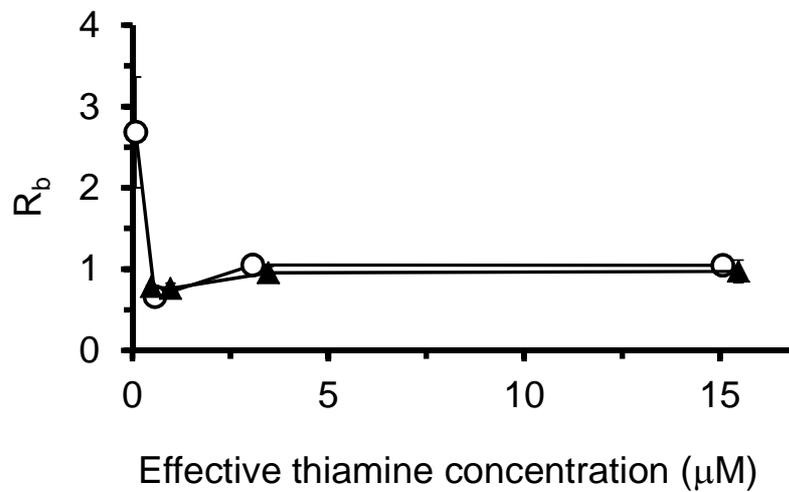


図 20. 雄性 Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスにおける thiamine の血液/血漿中濃度比

Oct1/2(+/+) マウス（白抜き）および Oct1/2(-/-) マウス（黒塗り）から採取した新鮮な血液試料に thiamine- $d_3$  を添加後、37°C で 30 分間インキュベートした。横軸は、所定の thiamine- $d_3$  添加濃度（0.01、0.5、3、15  $\mu\text{M}$ ）と内因性 thiamine 濃度（Oct1/2(+/+) マウス、0.075  $\mu\text{M}$ ； Oct1/2(-/-) マウス、0.47  $\mu\text{M}$ ）とを足し合わせた実効濃度を表す。縦軸は、thiamine- $d_3$  の血液/血漿中濃度比（ $R_b$ ）を表す。データは平均  $\pm$  標準誤差（ $n = 3$ ）を表す。

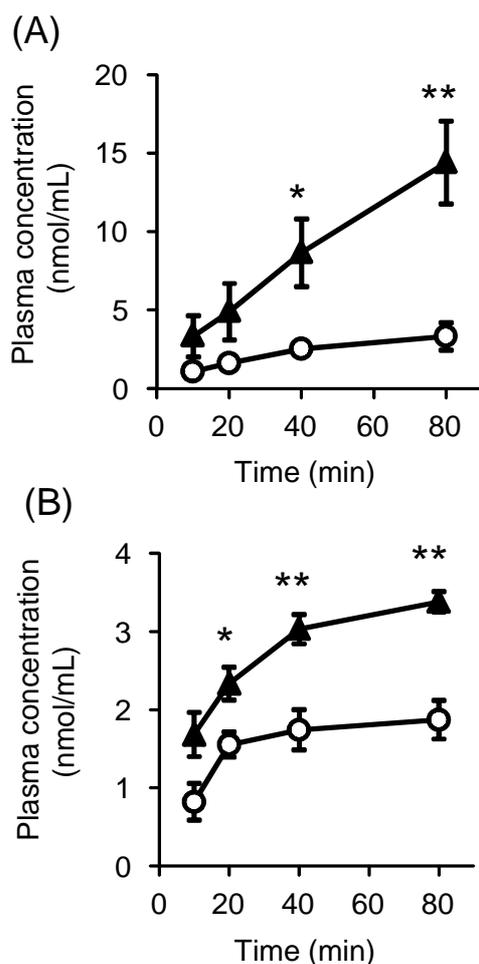


図 21. マウスに高用量で thiamine- $d_3$  を投与時の血漿中濃度における Oct1/2 欠損および Mate1 阻害の影響

(A) Thiamine- $d_3$  を 100 nmol/kg/min の速度でマウスに静脈内持続注入した。血液は注入開始後の所定時間に頸静脈から採血した。Oct1/2(+/+) マウス (白抜き) および Oct1/2(-/-) マウス (黒塗り) における thiamine- $d_3$  の血漿中濃度は LC-MS/MS を用いて測定した。各ポイントは、平均値  $\pm$  標準誤差 (n = 4 または 5) を表す。\* および \*\* は、Oct1/2(+/+) マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

(B) Pyrimethamine 処理群マウスには pyrimethamine (5 mg/kg) を thiamine- $d_3$  の持続注入開始 10 分前に急速静脈内投与した。対照群マウス (白抜き) および pyrimethamine 処理群マウス (黒塗り) の各ポイントは、平均値  $\pm$  標準誤差 (n = 4) を表す。\* および \*\* は、対照群マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

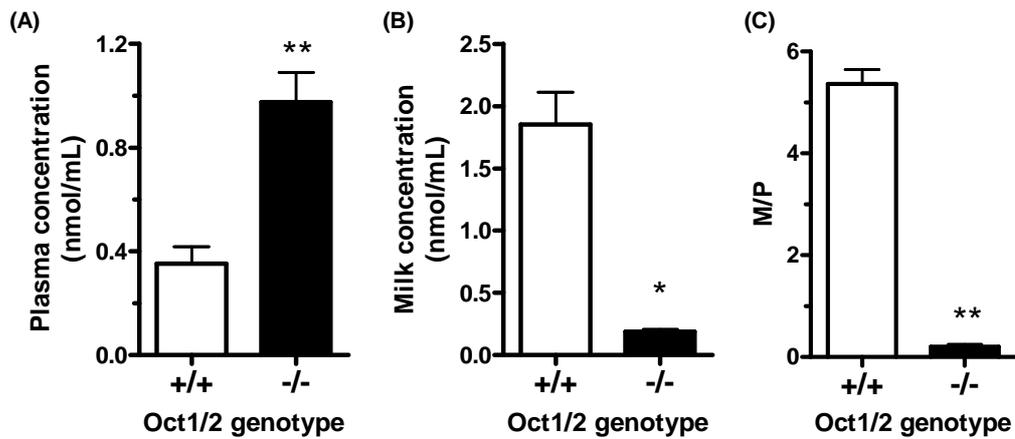


図 22. 授乳期雌性マウスの血漿中および乳汁中 thiamine 濃度における Oct1/2 欠損の影響

雌性 Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-)マウスにおける内因性 thiamine の (A) 血漿中濃度および (B) 乳汁中濃度を測定した。(C) M/P は乳汁/血漿中濃度比を表す。乳汁は、授乳期の雌性マウスから 1 日 1 回、3 日間搾乳された (表 10 参照)。血液は最終日の搾乳後直ちに頸静脈から採血された。各ポイントは平均値 ± 標準誤差 (n = 3) を表す。

\*および\*\* は、Oct1/2(+/+)マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

表 7. Oct1 および Oct2 を介した thiamine 取り込みの速度論的パラメータ

Parameter	Oct1	Oct2
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	36.3 $\pm$ 9.2	22.6 $\pm$ 4.4
$V_{\text{max}}$ (pmol/min/mg protein)	353 $\pm$ 52	258 $\pm$ 36
$P_{\text{dif}}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	0.454 $\pm$ 0.048	2.09 $\pm$ 0.11

各値は 図 16 に示したデータから求めた。データは平均  $\pm$  標準誤差 (n = 3) を表す。

表 8. Oct1/2(+/+) マウスと Oct1/2(-/-) マウス間、もしくは、対照群マウスと PYR 処置群マウス間における thiamine- $d_3$  の薬物速度論的パラメータの比較

Parameter	Unit	Experiment 1		Experiment 2		Experiment 3	
		Oct1/2(+/+)	Oct1/2(-/-)	Oct1/2(+/+)	Oct1/2(-/-)	Control	PYR (5 mg/kg)
Infusion rate	nmol/kg/min	1	1	100	100	100	100
$C_{80min}$	nmol/mL	0.00546 ± 0.00098	0.0241 ± 0.0010 **	3.32 ± 0.88	14.4 ± 2.6 **	1.87 ± 0.25	3.38 ± 0.13 **
$AUC_{0-80min}$	nmol·min/mL	0.362 ± 0.047	1.15 ± 0.06 **	177 ± 33	654 ± 156 *	121 ± 13	210 ± 12 **
$X_{urine}$	nmol	0.00991 ± 0.00471	0.00957 ± 0.00289 n.s.	169 ± 55	105 ± 25 n.s.	123 ± 11	90.6 ± 11.9 n.s.
$CL_{plasma}$	mL/min/kg	209 ± 50	N/A	38.3 ± 11.4	N/A	56.3 ± 7.1	29.7 ± 1.1 *
$CL_{plasma,app}^\dagger$	mL/min/kg	N/A	41.6 ± 1.6	N/A	8.49 ± 2.20	N/A	N/A
$CL_R$	mL/min/kg	0.710 ± 0.256	0.240 ± 0.064 n.s.	24.8 ± 6.9	5.13 ± 1.04 *	34.9 ± 4.4	14.7 ± 2.3 **

各値は図 19 および図 21 に示したデータから求めた。各値は平均 ± 標準誤差 (n = 4 あるいは 5) を表す。

$AUC_{0-80min}$  : 時間ゼロから 80 分までの血漿中濃度-時間曲線下面積、 $C_{80min}$  : 持続注入開始後 80 分における血漿中濃度

$CL_{plasma}$  および  $CL_{plasma,app}$  : 血漿中濃度に基づく全身クリアランス (血漿クリアランス)、 $CL_R$ , 腎クリアランス、N/A : 該当データなし

\* および \*\* は、Oct1/2(+/+)マウスもしくは対照群マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

n.s. は、Oct1/2(+/+)マウスもしくは対照群マウスに対する差に統計学的有意性がないことを表す。

† は、非定常状態で算出された値であることを表す。

表 9. Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスにおける内因性 total thiamine および外因性 total thiamine- $d_3$  の組織内濃度

Tissue	Total endogenous thiamine (nmol/mL or nmol/g tissue)				Total exogenous thiamine- $d_3$ (pmol/mL or pmol/g tissue)			
	Oct1/2(+/+)	Oct1/2(-/-)		Fold change	Oct1/2(+/+)	Oct1/2(-/-)		Fold change
Plasma	0.216 ± 0.028	0.588 ± 0.061	**	2.7	8.54 ± 1.11	27.3 ± 0.4	**	3.2
Kidney	38.2 ± 2.3	37.0 ± 0.9	n.s.	1.0	265 ± 27	249 ± 33	n.s.	0.9
Liver	28.1 ± 2.0	25.9 ± 1.7	n.s.	0.9	148 ± 16	196 ± 39	n.s.	1.3
Duodenum	10.1 ± 0.7	6.16 ± 0.40	**	0.6	88.2 ± 25.1	25.0 ± 4.5	*	0.3
Jejunum	12.3 ± 1.5	7.33 ± 0.71	*	0.6	88.1 ± 23.7	24.6 ± 3.8	*	0.3
Ileum	8.62 ± 0.83	5.64 ± 0.81	*	0.7	44.7 ± 10.6	16.0 ± 3.9	*	0.4
Colon	7.46 ± 0.35	5.75 ± 0.52	*	0.8	59.7 ± 10.1	16.5 ± 2.4	**	0.3
Brain	7.49 ± 0.67	8.25 ± 0.34	n.s.	1.1	9.44 ± 0.76	9.58 ± 0.96	n.s.	1.0

Experiment 1 において、Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスに thiamine- $d_3$  を 1 nmol/min/kg の速度で静脈内持続注入した。

注入開始から 80 分後に血漿と組織を採取した。各値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4) を表す。

\* および\*\* は、Oct1/2(+/+) マウスに対する差の統計学的有意性 ( $P < 0.05$  および  $P < 0.01$ ) を表す。

n.s. は、Oct1/2(+/+) マウスに対する差に統計学的有意性がないことを表す。

表 10. 雌性 Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスにおける乳汁中 thiamine 濃度

Genotype	Milk concentration (nM)			
	Day 1	Day 2	Day 3	Mean $\pm$ S.E.M.
Oct1/2(+/+)	2210	1800	1860	1957 $\pm$ 128
	2080	1290	695	1355 $\pm$ 401
	2010	1980	2730	2240 $\pm$ 245
Oct1/2(-/-)	121	150	382	218 $\pm$ 83
	106	139	244	163 $\pm$ 42
	139	121	294	185 $\pm$ 55

乳汁は、授乳期の雌性 Oct1/2(+/+) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウス各 3 例から 1 日 1 回、3 日間搾乳された。乳汁中濃度は、各例における各日の測定値および 3 日間の平均  $\pm$  標準誤差を表す。

## 結論および今後の展望

本論文において、遺伝子多型や阻害剤投与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生体内低分子マーカーまたはその候補を同定した。

第一章では、docetaxel の副作用発現頻度との関連が示唆されている MRP2 遺伝子の SNP、rs12762549 (G > C) に注目した。この SNP に基づいて層別化した健康成人男性の血漿を用いてメタボローム解析を行うことにより、リスクアレル (C アレル) 保有者の血漿に genistein および dihydrogenistein の抱合代謝物 5 種が蓄積していることを見出した。これらの isoflavonoid 抱合代謝物は C アレルの数に依存して血漿中濃度が上昇していること、*in vitro* でヒト MRP2 の基質であること、ならびに、Mrp2 欠損ラットの血漿にも蓄積することが示された。よって、isoflavonoid 抱合代謝物は、MRP2 の *in vivo* 活性を評価する生体内低分子マーカーとして有望であると考えられる。

第二章では、選択的 MATE 阻害剤 pyrimethamine 投与の有無に基づき、健康成人男性の尿を用いてメタボローム解析を行うことにより、MATE 阻害によって thiamine の尿中排泄が有意に低下することを見出した。Thiamine の腎クリアランスの低下率は約 80% であり、代表的プローブ薬剤の metformin (約 34%) を大きく上回った。既知の生体内低分子マーカーである N-methylnicotinamide (NMN) については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である (14)。これに対し、thiamine は日内変動が比較的小さいため、尿中排泄量で評価できる点がメリットといえる。よって、thiamine は MATEs の *in vivo* 活性を評価する生体内低分子マーカーとして適していると考えられた。

第三章では、前章で MATEs 機能マーカーとして同定された thiamine について、マウス体内動態を詳細に検討した結果、マウス Oct1 が肝への thiamine の取り込みに関与し、

thiamine の全身クリアランスの決定因子となっていることが示唆された。今後、ヒトにおける検証が必要であるが、血漿中 thiamine 濃度が OCT1 機能評価マーカーとなる可能性が示された。また、過剰摂取時に thiamine は Oct1/2 および Mate1 を介した尿細管分泌により速やかに尿中排泄されることが示唆されたことから、ヒト OCT2/MATEs を介した尿細管分泌の機能評価のためのプローブ基質としても活用できるものと期待される。

本研究において MRP2 および MATEs の機能評価マーカーとしてそれぞれ同定された isoflavonoid 抱合代謝物および thiamine は、いずれも食物由来成分であることから、血漿中濃度または尿中排泄量が食事によって影響を受けるものと考えられる。これらを薬物相互作用のリスク評価においてマーカーとして活用する際には、食事メニューをコントロールすることが重要である。また、個体間差を排除するため、同一被験者におけるクロスオーバー試験デザインが望ましい。また、複数の生体内低分子マーカーで判定することにより、薬物トランスポーターの機能低下以外の要因で発生する偽陽性／偽陰性を感知できる確率が高まり、より信頼性の高い評価が行えるものとする。

本研究で用いた手法、即ち、遺伝子変異もしくは阻害剤投与の有無に基づいたメタボローム解析は、MRP2 および MATEs 以外の薬物トランスポーターに対しても同様に、生体内低分子マーカーの同定が可能であると考えられる。さらに、薬物代謝酵素の生体内低分子マーカーの探索に関してもその応用が可能と思われる。生体内低分子マーカーを用いて、臨床早期段階（Phase 1）で医薬品候補化合物の薬物相互作用リスクを *in vivo* 評価する戦略は、医薬品開発の効率化に大いに貢献するものとする。医薬品候補化合物の *in vitro* 試験で阻害活性が示唆された場合においても、Phase 1 試験における生体内低分子マーカーの評価で阻害活性が全く検出されなければ、プローブ薬剤を用いた臨床薬物相互作用試験を回避できるものと考えられる。Phase 1 試験で評価することの副次的な利点として、Phase 1 では薬効用量の数倍以上の高い用量まで投与すること

が一般的であり、阻害活性の用量依存性を含めた定量的評価ができることや、*in vitro* 試験では予期しなかった薬物由来の代謝物や予想以上の組織内への濃縮によって引き起こされる機能阻害であっても検出できることがあげられる。その結果として、薬物相互作用を回避した安全性の高い医薬品の開発に貢献するものである。

今後、生体内低分子マーカーがプローブ薬剤の代替として機能するエビデンスを蓄積して、マーカーの信頼性を確立していくことが重要である。近い将来、数多くの生体内低分子マーカーがバリデートされ、薬物相互作用のリスク評価に有効に活用されることを強く期待するものである。

## 謝 辞

本研究の推進あたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻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主宰 杉山 雄一 先生、ならびに、東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 楠原 洋之 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 前田 和哉 講師、ならびに、林 久允 助教に深謝いたします。また、本研究を支えてくださいました東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室の関係各位に心から御礼申し上げます。

臨床研究の実施に際し御尽力いただきました北里研究所北里大学東病院臨床試験センター長 熊谷 雄治 先生、ならびに、遺伝子多型解析に御尽力いただきました九州大学大学院薬学府臨床薬学講座薬物動態学分野 家入 一郎 教授に深謝いたします。

MATE 発現細胞を御供与いただきました名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅 博昭 教授、東京薬科大学薬学部薬物動態制御学教室 井上 勝央 教授、ならびに、MATE 研究に関して有益な御指導を賜りました京都薬科大学学長 乾 賢一 教授、立命館大学薬学部医療薬剤学研究室 桂 敏也 教授、京都大学医学部附属病院薬剤部 米澤 淳 講師、ならびに、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科生体膜生化学分野 森山 芳則 教授に厚く御礼申し上げます。

Oct1/2 ノックアウトマウスを用いた実験に際し御尽力いただきました東京大学医学部附属病院薬剤部 鈴木 洋史 教授、千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 伊藤 晃成 教授、東京警察病院小児科 伊藤 直樹 先生に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究の機会と多大なる御支援を与えてくださいました大正製薬株式会社 奥山 茂 医薬研究本部長、中井 康博 医薬開発副本部長、佐藤 靖 安全性・動態

研究所長、山口 順一 薬物動態研究室長、神宮 茂司 薬物動態研究室グループマネージャーに深く感謝いたします。そして、私の研究を支えてくださいました大正製薬株式会社薬物動態研究室の各位に心より感謝の意を表します。

## 実験の部

### 第一章

インターネット公表不可

## 第二章

### 試薬

Pyrimethamine (PYR) は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より購入した。Thiamine- $d_3$  hydrochloride は Toronto Research Chemicals (North York, Canada) より購入した。Carnitine- $d_3$ 、acetylcarnitine- $d_3$  および 2'-deoxycytidine- $^{15}\text{N}_3$  は Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) より購入した。Carnitine- $d_9$  は CDN Isotopes (Quebec, Canada) より購入した。 $^{14}\text{C}$ ]TEA bromide (3.5 mCi/mmol) および  $^3\text{H}$ ]thiamine hydrochloride (20 Ci/mmol) は、それぞれ PerkinElmer Life and Analytical Science (Waltham, MA, USA) および American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) より購入した。他の試薬は市販の特級品または分析用グレード品を用いた。

### 臨床研究検体

健康成人ボランティアにおける metformin および pyrimethamine の薬物動態学的薬物相互作用試験に関する研究プロトコールは、東京大学薬学系研究科および北里大学東病院の治験審査委員会によって承認され、UMIN 臨床試験登録システム ([www.umin.ac.jp/ctr/index.htm](http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm)) に登録された (UMIN000002739) (13)。ボランティアから書面によるインフォームド・コンセントを取得した。8名の男性被験者はいずれも診察と臨床検査において身体的に正常であり、重大な病歴や薬物に対する過敏性を持たないことが確認された。被験者の年齢、体重および血清 creatinine 濃度の平均  $\pm$  標準偏差 (最低値～最高値) は、それぞれ  $28.0 \pm 4.5$  歳 (22～34 歳)、 $63.9 \pm 6.9$  kg (54.1～76.6 kg) および  $0.82 \pm 0.10$  mg/dL (0.66～0.94 mg/dL) であった。

本試験は、4期のクロスオーバーで行われた。被験者は一晩絶食した後に、Period 1 お

よび Period 2 ではマイクロドーズ (100 µg) の metformin の投与を、Period 3 および Period 4 では治療用量 (250 mg) の metformin の投与を受けた。Period 2 および Period 4 では、被験者は metformin の投与 1 時間前に Daraprim®錠 (50 mg pyrimethamine/tablet) の投与を受けた。試験中に metformin あるいは pyrimethamine の投与が起因すると考えられる有害事象は、腎障害とは関係のない血漿中 creatinine 濃度のわずかな上昇を除いて、認められなかった。所定時間に抗凝固剤として sodium heparin を用いて採血し、血液を遠心分離して血漿を得た。また、所定時間内に排泄された尿を全量回収し、その重量を測定した。血漿および尿試料は分析するまで -80°C で凍結保存された。

## 動物実験

全ての動物実験は、大正製薬株式会社動物実験規定に従って行われた。雄性 ddY マウスは、Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、空調管理された飼育室で予備飼育した。照明は 12 時間サイクルに設定した。飲料水および固型飼料 (MF; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) は自由に摂取させた。実験には 7~8 週齢で用いた。PYR 処置群には PYR (0.5 mg/kg、基剤：生理食塩水/ethanol = 9/1) を、対照群には投与基剤のみを急速静注し、その 30 分後に carnitine- $d_3$  (0.25 mg/kg) を急速静注した。いずれの投与も尾静脈から行った。carnitine- $d_3$  投与前と投与後の所定時間 (5、15、30、60 および 120 分) に、isoflurane 麻酔下、腹部後大静脈および膀胱からそれぞれ血液および尿を採取した。マウスの死亡を確認後直ちに腎を採取し、4 倍量の冷水を加えてホモジナイズした。抗凝固剤として EDTA を用いて採血し、血液を遠心分離して血漿を得た。

## メタボローム解析

臨床研究の Period 2 にて PYR 投与 7 時間後に得られたヒト血漿および蓄尿、ならび

に、動物実験にて PYR 投与 2.5 時間後に得られたマウス血漿、膀胱尿および腎を、これらの対照群の生体試料とともに測定試料とした。測定試料 50  $\mu$ L に、氷冷下の acetonitrile/methanol (9:1) 混液 200  $\mu$ L を加えた。これを攪拌後に遠心分離 (5 分、10,000  $\times$ g) し、得られた上清を LC-MS 分析に供した。LC システムは XBridge HILIC カラム (3.5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  50 mm; Waters, Milford, MA, USA) を装着した Agilent 1100 series 液体クロマトグラフ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用した。移動相には次に示す組成比で 10 mM ammonium acetate (pH 5.0) (溶媒 A) と acetonitrile (溶媒 B) を用いた。注入後 1 分までの溶媒 B の割合は 95% とし、次いで注入後 10 分に 70%、11 分に 50% となるように線形グラジエント溶出を行い、さらに注入後 12 分までは 50% のまま溶出を行った。流速は 1 mL/min とした。MS データは LTQ Orbitrap XL 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて採取した。イオン化はポジティブイオンモードのヒーテッド・エレクトロスプレー法を用い、次の測定条件で行った: スプレー電圧 2.5 kV、スキャン範囲  $m/z$  100~800、分解能 30,000、衝突エネルギー 35% とした。試料間におけるピーク保持時間のばらつき補正やピーク強度の自動算出には、フリーソフトウェア MZmine (44) を用いた。精密質量に基づく化学構造の検索は、HMDB (57) または KEGG (58) データベースを用いた。

### LC-MS/MS 定量法

分析対象化合物の安定同位体である、thiamine- $d_3$ 、2'-deoxycytidine- $^{15}\text{N}_3$ 、carnitine- $d_9$  および acetylcarnitine- $d_3$  を内標準物質として用いた。生体試料の前処理、LC システムおよび移動相溶媒については、メタボローム解析と同条件とした。thiamine および dCyd の定量における移動相は、注入後 0.5 分までの溶媒 B の割合を 90% とし、次いで注入後 2.2 分に 80%、2.7 分に 60%、4.5 分に 50% となるようにそれぞれ線形グラジエント溶出

を行い、さらに注入後5分までは50%のまま溶出を行った。Carnitineおよびacetylcarnitineの定量における移動相は、注入後0.2分までの溶媒Bの割合を75%とし、次いで注入後2.5分に50%となるように線形グラジエント溶出を行い、さらに注入後3分までは50%のまま溶出を行った。MSデータはAPI4000タンデム質量分析計（AB Sciex, Foster City, CA, USA）を用いて採取した。thiamineは $m/z$  265→122、dCydは $m/z$  228→112、thiamine- $d_3$ は $m/z$  268→125、dCyd- $^{15}N_3$ は $m/z$  231→115、carnitineは $m/z$  162→103、acetylcarnitineは $m/z$  204→85、carnitine- $d_9$ は $m/z$  171→103、acetylcarnitine- $d_3$ は $m/z$  207→85をモニターした。dCydの定量下限を0.3 ng/mL、それ以外の定量下限を1 ng/mLとした。また、PYR定量には、内標準物質として propranolol を用い、PYRのモニターイオンとして $m/z$  249→177を用いた。

#### トランスポーター遺伝子発現系を用いた *in vitro* 輸送実験

既報に従い、OCT2、MATE1あるいはMATE2-Kを安定発現させたHEK293細胞を作製した(53,114)。細胞は輸送実験の72時間前に、poly-L-lysineおよびpoly-L-ornithineでコートされた12 well細胞培養プレートに $1.5 \times 10^5$  cells/wellの密度で播種した。輸送実験の24時間前に、細胞培養液から5 mM sodium butyrateを添加した培養液に置換して、トランスポーターの発現を誘導した。*In vitro* 輸送実験は、既報(115)に準じて行われた。細胞をKrebs-Henseleit緩衝液で2回洗浄後、37°Cで15分間プレインキュベートした。Krebs-Henseleit緩衝液は、118 mM NaCl、23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>、4.8 mM KCl、1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、12.5 mM HEPES、5.0 mM glucoseおよび1.5 mM CaCl<sub>2</sub>から構成され、pH 7.4に調整された。取り込み実験は、37°C、TEA (5 mM)の存在下または非存在下、[<sup>14</sup>C]TEAあるいは[<sup>3</sup>H]thiamineの添加によって開始された。MATE介在輸送の評価では、細胞をNH<sub>4</sub>Cl (20 mM)でプレインキュベートして細胞内を酸性化し

たものを用いた。所定時間に培養液を取り除き、氷冷 Krebs–Henseleit 緩衝液を添加することにより取り込み輸送を停止した。0.5 N NaOH を添加後、4°C で一晩放置して細胞を溶解した。HCl で中和後、シンチレーションカクテルを加え、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。タンパク濃度は、Lowry 法 (116) により測定した。

### ***In vitro* 速度論的解析**

速度論的パラメータは、次式を用いて計算された。

$$v = V_{\max} \times S / (K_m + S) + P_{\text{dif}} \times S \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $P_{\text{dif}}$  は非飽和性取り込みクリアランス、 $v$  は基質取り込みの初速度、 $V_{\max}$  は最大取り込み速度、 $K_m$  はミカエリス定数、 $S$  は培養液中基質濃度とする。フィッティングは、MULTI program (117) を用いて非線形最小二乗法により行った。

### ***In vivo* 薬物速度論的解析**

血漿中濃度–時間曲線下面積 (AUC) は、台形法にて算出した。腎クリアランス ( $CL_R$ ) は、尿中排泄量 ( $X_{\text{urine}}$ ) を AUC で除して求めた。血漿クリアランス ( $CL_{\text{plasma}}$ ) は、用量を AUC で除して求めた。

### **統計学的解析**

データは平均±標準誤差として表した。臨床研究における2つの群間の有意差検定には対応のある Student  $t$  検定を用いた。動物実験における2つの群間比較には、等分散の場合、対応のない Student  $t$  検定を、不等分散の場合、Welch 検定法を用いた。有意水準は  $P < 0.05$  とした。いずれの統計解析にも SAS version 8 (SAS Institute, Cary, NC, USA)

を用いた。

### 第三章

#### 実験材料

Thiamine hydrochloride、thiamine monophosphate (TMP) chloride dihydrate、pyrimethamine、tetraethylammonium (TEA) および potato 由来凍結乾燥 acid phosphatase は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。重水素標識 thiamine (thiamine- $d_3$ ) 塩酸塩および beclotiamine 塩酸塩は Toronto Research Chemicals (North York, Canada) から入手した。 $[^3\text{H}]$ Thiamine (20 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA)、 $[^3\text{H}]$ 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) (83.7 Ci/mmol) は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) から購入した。TPP 塩化物は MP Biomedicals (Solon, OH, USA) から入手した。そのほかの試薬は分析グレードの市販品を使用した。

#### cDNA トランスフェクト細胞を用いた *in vitro* 輸送実験

マウス Oct1、Oct2 または Oct3 の cDNA を組み込んだ各 vector、もしくは empty-vector を安定にトランスフェクトした HEK293 細胞(55)は、poly-L-lysine および poly-L-ornithine でコートされた 12 well プレートに  $4 \times 10^5$  cells/well の密度で、輸送実験の 72 時間前に播種された。細胞培養液は、トランスポーターの発現を誘導するため、輸送実験の 24 時間前に 5 mM sodium butyrate を含む培養液に置き換えた。輸送実験は、既報 (115) に準じて行った。細胞は Krebs–Henseleit 緩衝液 (KHBS) で 2 度洗浄し、37°C で 15 分間プレインキュベートした。KHBS は、118 mM NaCl、23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>、4.8 mM KCl、1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、12.5 mM HEPES、5.0 mM glucose および 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> から構成され、pH 7.4 に調整された。プレインキュベーション後に培養液を、 $[^3\text{H}]$ MPP<sup>+</sup> (100 nM) または  $[^3\text{H}]$ thiamine (100 nM) を溶解した KHBS に置き換えることによって

取り込み実験を開始した。TEA (5 mM) の存在下または非存在下、37°C でインキュベートした。所定時間にインキュベーション緩衝液を取り除いた後、氷冷 KHBS を添加することによって、取り込み輸送を停止させた。細胞に NaOH を加え、4°C で一晩放置して溶解した後、HCl を用いて中和した。放射活性は液体シンチレーションカウンターにて測定した。タンパク濃度は Lowry 法 (116) を用いた。

### 速度論的解析

速度論的パラメータは次式から求めた。

$$v = V_{\max} \times S / (K_m + S) + P_{\text{dif}} \times S \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $P_{\text{dif}}$  は非飽和性取り込みクリアランス、 $v$  は基質取り込みの初速度、 $V_{\max}$  は最大取り込み速度、 $K_m$  はミカエリス定数、 $S$  は培養液中基質濃度とする。フィッティングは、MULTI program (117) を用いて非線形最小二乗法により行った。

### Oct1/2(+/-) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスからの肝細胞の単離

Oct1/2 野生型 (Oct1/2(+/+)) マウスおよび Oct1/2 ノックアウト (Oct1/2(-/-)) マウスの肝細胞は、collagenase 灌流法によるラット肝細胞調製法 (118) を一部改変した方法により調製した。肝は  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  を含まない Earle's 平衡塩溶液で調製した 1 mM EDTA 溶液、次いで、Hanks' 平衡塩溶液で調製した  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  を含む 1 mg/mL collagenase IV 溶液を用いて 6 mL/min の流速で灌流した。物理的な分離、ろ過および低速の遠心処理を行うことにより単離肝細胞を得た。細胞生存率は trypan blue 色素排除試験によって測定した (>75%) 。

## マウス肝細胞における [<sup>3</sup>H]thiamine の取り込み

KHBS に懸濁させた単離肝細胞を 37°C で 3 分間プレインキュベートした後、<sup>[3</sup>H]estradiol-17β-glucuronide、<sup>[3</sup>H]MPP<sup>+</sup> または<sup>[3</sup>H]thiamine を添加することによって、取り込み輸送を開始させた。所定時間に、遠心ろ過により培養液から細胞を分離させることによって取り込みを停止させた。インキュベーション溶液 80 μL を、下層に 2 M NaOH 50 μL、上層にオイル混液（密度：1.05 g/mL、シリコン油とミネラル油の混液；Sigma-Aldrich）100 μL を入れた 0.25 mL 遠心チューブ（Sarstedt, Numbrecht, Germany）に移し、10 秒間遠心処理を行った。細胞に取り込まれた放射能および培養液に残った放射能を、液体シンチレーションカウンター（LS6000SE; Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を用いて測定した。

## 血液/血漿中濃度比

4 濃度の thiamine-*d*<sub>3</sub>（0.01, 0.5, 3, 15 μM）を新鮮な血液に添加した試料を各 3 本調製し、37°C で 30 分間インキュベートした。血液試料を遠心処理（2,000 ×g、10 分間、4°C）して血漿を得た。Thiamine-*d*<sub>3</sub> の血液中濃度（C<sub>b</sub>）および血漿中濃度（C<sub>p</sub>）は、LC-MS/MS を用いて測定した。血液/血漿中濃度比（R<sub>b</sub>）は、次式により求められた。

$$R_b = C_b / C_p \quad (\text{式 2})$$

## 動物実験

遺伝子欠損マウス実験および pyrimethamine による阻害実験は、それぞれ東京大学および大正製薬株式会社の各動物実験委員会において承認された。Oct1/2(-/-) マウス（119,120）は、Taconic Farms（Germantown, NY, USA）から入手した。Oct1/2(+/-) マウスとして、FVB/Njcl マウス（Clea Japan, Tokyo, Japan）を用いた。これらを空調管理さ

れた飼育室で予備飼育した。照明サイクルは 12 時間に設定した。飲料水と固形飼料は自由摂取とした。Experiment 1 および Experiment 2 には 22 週齢の雄性マウスを、ならびに Experiment 3 には 7 週齢の雄性マウスを使用した。Isoflurane 麻酔下、生理食塩水に溶解した thiamine- $d_3$  を、Experiment 1 および Experiment 2 において、それぞれ 1 および 100 nmol/kg/min の注入速度で頸静脈から 80 分間の持続注入を行った。注入開始 10、20、40 および 80 分後に、抗凝固剤 (EDTA) 入りのチューブに採取し、血液を遠心処理して血漿を得た。最終サンプリングポイントでは、血液および膀胱尿の採取を行い、さらに、動物の死亡を確認後直ちに、腎、肝、脳、十二指腸、空腸、回腸および結腸を採取した。組織は重量を測定後、4 倍量の氷冷水でホモジナイズされた。Experiment 3 では、thiamine- $d_3$  (100 nmol/kg/min) の持続注入開始の 10 分前に、10% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin を用いて溶解した PYR (0 または 5 mg/kg) を頸静脈から急速注入した。血漿と尿試料は上述の方法により得た。乳汁は既報 (121) の方法に従い、1 日 1 回 3 日間、授乳期の雌性 Oct1/2(+/-) マウスおよび Oct1/2(-/-) マウスから採取した。最終日には、搾乳後直ちに、血液を頸静脈から採取した。試料は分析までの間、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存された。

#### LC-MS/MS による thiamine および thiamine- $d_3$ の定量

血液試料 (50  $\mu\text{L}$ ) に氷冷した 1.2 M perchloric acid 50  $\mu\text{L}$  を加え、氷冷下で 15 分間放置した後、混液を  $10,000 \times g$  で 4 分間遠心処理した。上清 50  $\mu\text{L}$  に 0.6 M KOH/1.8 M potassium acetate 50  $\mu\text{L}$  を加えて中和した後、混液を  $10,000 \times g$  で 4 分間遠心処理することにより脱塩した。この上清、ならびに、そのほかの生体試料に内標準物質を含む 4 倍量の acetonitrile/methanol (9:1, v/v) 混液を加えた。これを攪拌後、 $3,639 \times g$  で 10 分間遠心処理した。その上清を LC-MS/MS に注入した。Thiamine の定量には、LC システム

として XBridge HILIC カラム (3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  50 mm; Waters, Milford, MA, USA) を装着した Shimadzu LC-30AD (Kyoto, Japan) を用いた。移動相には溶媒 A として 10 mM ammonium acetate (pH 5.0) を、溶媒 B として acetonitrile を用い、流速を 1.0 mL/min とした。組成比は、注入後 0 から 0.5 分を 90%B とし、2.2 分に 80%B、2.7 分に 60%B、4.5 分に 50%B となるようにそれぞれ線形グラジエント溶出を行い、その後 0.5 分間 50% B のままアイソクラティック溶出を行った。MS データは、AB Sciex TripleQuad 5500 タンデム質量分析計 (Foster City, CA, USA) を用いて採取した。エレクトロスプレーイオン化法を用い、thiamine は  $m/z$  265 $\rightarrow$ 122、thiamine- $d_3$  は  $m/z$  268 $\rightarrow$ 125、beclotiamine (内標準物質) は  $m/z$  283 $\rightarrow$ 122 をモニターした。PYR の定量には、LC システムとして Shim-pack XR-ODS column (2.2  $\mu\text{m}$ , 3.0  $\times$  30 mm; Shimadzu) を装着した Agilent HP1100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いた。溶媒 A として 0.1% formic acid、溶媒 B として acetonitrile を用いた。流速は 1.3 mL/min とした。組成比は注入時に 2%B とし、次いで、注入後 1.0 分に 98%B となるように線形グラジエント溶出を行い、その後 0.3 分間 98%B のままアイソクラティック溶出を行った。MS データは AB Sciex API3000 タンデム質量分析計を用いて採取した。分析対象化合物の PYR は  $m/z$  249 $\rightarrow$ 177、その内標準物質の propranolol は  $m/z$  260 $\rightarrow$ 116 をモニターした。

### **Total thiamine の定量**

TPP および TMP を含む total thiamine 濃度は、Wielders らによって報告された酵素水解除法 (122) を一部改変して測定した。融解した組織ホモジネート 20  $\mu\text{L}$  に氷冷の 1.2 M perchloric acid 20  $\mu\text{L}$  を加えて攪拌後、0 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間放置した。その後に 10,000  $\times g$  で 10 分間遠心分離した。上清 20  $\mu\text{L}$  に、10  $\mu\text{L}$  の内標準溶液 (1  $\mu\text{M}$ 、生理食塩水に溶解) を加えた後、20  $\mu\text{L}$  の 0.6 M KOH/1.8 M potassium acetate を加えて中和した。その後、10,000

× g で 10 分間遠心分離して脱塩した。上清 (25 μL) は、25 μL の 4 mg/mL acid phosphatase (生理食塩水に溶解) と混合した後、室温で一晩放置して酵素水解を行った。最終的な pH は約 5 であった。Acetonitrile/methanol (9:1, v/v) 200 μL を加えて攪拌した後、3,639 × g で 10 分間遠心分離を行った。この上清を thiamine 定量条件の LC-MS/MS 分析に供した。

### 薬物速度論的解析

血漿中濃度に基づく全身クリアランス ( $CL_{\text{plasma}}$ ) は、持続注入速度を、注入開始 80 分における血漿中濃度で除することによって求めた。Oct1/2(-/-) マウスでは、血漿中濃度が注入後にプラトーに達しなかったことから、 $CL_{\text{plasma}}$  を  $CL_{\text{plasma,app}}$  として表した。腎クリアランス ( $CL_{\text{R}}$ ) は、80 分間の尿中排泄量 ( $X_{\text{urine}}$ ) を、投与後 80 分までの血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-80\text{min}}$ ) で除することによって求めた。 $AUC_{0-80\text{min}}$  は台形法により求めた。

### 統計解析

データは、平均 ± 標準誤差として表す。2 つの群間の有意差検定は、対応のない Student *t* 検定を用いた。*in vitro* 阻害実験では、分散分析を行った後に Tukey's 多重比較検定を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 参考文献

1. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, *et al.* SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy - a genomewide study. *N Engl J Med.* 2008;359(8):789-99.
2. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(12):873-9.
3. Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:581-612.
4. 厚生労働省医薬食品局. 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)  
<[http://www.japal.org/contents/pdf/notice/jimurenraku/20140708\\_jimu.pdf](http://www.japal.org/contents/pdf/notice/jimurenraku/20140708_jimu.pdf)> (8 July 2014)
5. US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations (Draft Guidance)  
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>> (14 September 2012).
6. European Medicines Agency. Guideline on the Investigation of Drug Interactions  
<[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf)> (21 June 2012)
7. Wikoff WR, Nagle MA, Kouznetsova VL, Tsigelny IF, Nigam SK. Untargeted metabolomics identifies enterobiome metabolites and putative uremic toxins as substrates of organic anion transporter 1 (Oat1). *J Proteome Res.* 2011;10(6):2842-51.

8. Krumpochova P, Sapthu S, Brouwers JF, de Haas M, de Vos R, Borst P, *et al.* Transportomics: screening for substrates of ABC transporters in body fluids using vesicular transport assays. *FASEB J.* 2012;26(2):738-47.
9. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broomé U, Einarsson C, *et al.* Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38685-9.
10. Galteau MM, Shamsa F. Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59(10):713-33.
11. Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, *et al.* 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(3):201-8.
12. Mårde Arrhén Y, Nylén H, Lövgren-Sandblom A, Kanebratt KP, Wide K, Diczfalusy U. A comparison of 4β-hydroxycholesterol : cholesterol and 6β-hydroxycortisol : cortisol as markers of CYP3A4 induction. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(6):1536-40.
13. Kusuhara H, Ito S, Kumagai Y, Jiang M, Shiroshita T, Moriyama Y, *et al.* Effects of a MATE protein inhibitor, pyrimethamine, on the renal elimination of metformin at oral microdose and at therapeutic dose in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(6):837-44.
14. Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, *et al.* N-methylnicotinamide is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions involving multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther.* 2012 ;92(5):635-41.
15. Imamura Y, Tsuruya Y, Damme K, Heer D, Kumagai Y, Maeda K, *et al.* 6β-Hydroxycortisol is an endogenous probe for evaluation of drug-drug interactions

- involving a multispecific renal organic anion transporter, OAT3/SLC22A8, in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 2014 ;42(4):685-94.
16. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(3):215-36.
  17. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch.* 2007; 453(5):643-59.
  18. Borst P, Zelcer N, van de Wetering K. MRP2 and 3 in health and disease. *Cancer Lett.* 2007; 234(1):51-61.
  19. Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res.* 2005; 22(10):1559-77.
  20. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, *et al.* A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 1997; 25(6):1539-42.
  21. Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, *et al.* Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(2): 203-7.
  22. Hoffmann U, Kroemer HK. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev.* 2004; 36(3-4):669-701.
  23. Ieiri I, Higuchi S, Sugiyama Y. Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009; 5(7):703-29.
  24. Maeda K, Sugiyama Y. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug*

- Metab. Pharmacokinet. 2008; 23(4):223-35.
25. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2006; 82(8):1074-84.
  26. Miura M, Satoh S, Inoue K, Saito M, Habuchi T, Suzuki T. Telmisartan pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Clin Chim Acta*. 2009; 399(1-2):83-7.
  27. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology*. 2007; 132(1):272-81.
  28. de Jong FA, Scott-Horton TJ, Kroetz DL, McLeod HL, Friberg LE, Mathijssen RH, *et al*. Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 81(1):42-9.
  29. Kim WJ, Lee JH, Yi J, Cho YJ, Heo K, Lee SH, *et al*. A nonsynonymous variation in MRP2/ABCC2 is associated with neurological adverse drug reactions of carbamazepine in patients with epilepsy. *Pharmacogenet Genomics*. 2010; 20(4):249-56.
  30. Izzedine H, Hulot JS, Villard E, Goyenvalle C, Dominguez S, Ghosn J, *et al*. Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *J Infect Dis*. 2006; 194(11):1481-91.
  31. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, *et al*. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation*. 2005; 112(24):3754-62.
  32. Kiyotani K, Mushiroda T, Kubo M, Zembutsu H, Sugiyama Y, Nakamura Y. Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. *Cancer Sci*. 2008; 99(5):967-972.
  33. Coldham NG, Darby C, Hows M, King LJ, Zhang AQ, Sauer MJ. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of

- the end-products of metabolism. *Xenobiotica*. 2002; 32(1):45-62.
34. Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol*. 1997; 272(1 Pt 1):G16-22.
  35. Kurisu H, Kamisaka K, Koyo T, Yamasuge S, Igarashi H, Maezawa H, *et al*. Organic anion transport study in mutant rats with autosomal recessive conjugated hyperbilirubinemia. *Life Sci* 1991; 49(14):1003-11.
  36. Kalliokoski A, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism and oral antidiabetic drugs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010; 107(4):775-81.
  37. Ide T, Sasaki T, Maeda K, Higuchi S, Sugiyama Y, Ieiri I. Quantitative population pharmacokinetic analysis of pravastatin using an enterohepatic circulation model combined with pharmacogenomic Information on SLCO1B1 and ABCC2 polymorphisms. *J Clin Pharmacol*. 2009; 49(11):1309-17.
  38. Jäger W, Winter O, Halper B, Salamon A, Sartori M, Gajdzik L, *et al*. Modulation of liver canalicular transport processes by the tyrosine-kinase inhibitor genistein: implications of genistein metabolism in the rat. *Hepatology*. 1997; 26(6):1467-76.
  39. Shimamura H, Suzuki H, Hanano M, Suzuki A, Tagaya O, Horie T, *et al*. Multiple systems for the biliary excretion of organic anions in rats: liquiritigenin conjugates as model compounds. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 271(1):370-8.
  40. Akao T, Sato K, Hanada M. Hepatic contribution to a marked increase in the plasma concentration of baicalin after oral administration of its aglycone, baicalein, in multidrug resistance-associated protein 2-deficient rat. *Biol Pharm Bull*. 2009; 32(12):2079-82.
  41. Kitamura Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Functional characterization of multidrug resistance-associated protein 3 (mrp3/abcc3) in the basolateral efflux of glucuronide conjugates in the mouse small intestine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 332(2):659-66.
  42. Adachi Y, Suzuki H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Role of breast cancer resistance protein

- (Bcrp1/Abcg2) in the extrusion of glucuronide and sulfate conjugates from enterocytes to intestinal lumen. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(3):923-8.
43. Chen J, Lin H, Hu M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 55(2):159-69.
  44. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, Shockcor JP, *et al.* Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem.* 2008; 80(1):115-22.
  45. Yonezawa A, Inui K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Br J Pharmacol.* 2011;164(7):1817-25
  46. Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, Omote H. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):1107-18.
  47. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(2):359-71.
  48. Damme K, Nies AT, Schaeffeler E, Schwab M. Mammalian MATE (SLC47A) transport proteins: impact on efflux of endogenous substrates and xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 2011;43(4):499-523.
  49. Tsuda M, Terada T, Mizuno T, Katsura T, Shimakura J, Inui K. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (Mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol Pharmacol.* 2009;75(6):1280-6.
  50. Kajiwara M, Masuda S, Watanabe S, Terada T, Katsura T, Inui K. Renal tubular secretion of varenicline by multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. *Drug Metab*

- Pharmacokinet. 2012;27(6):563-9.
51. Nakamura T, Yonezawa A, Hashimoto S, Katsura T, Inui K. Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(11):1762-7.
  52. Li Q, Peng X, Yang H, Wang H, Shu Y. Deficiency of multidrug and toxin extrusion 1 enhances renal accumulation of paraquat and deteriorates kidney injury in mice. *Mol Pharm.* 2011;8(6):2476-83.
  53. Matsushima S, Maeda K, Inoue K, Ohta KY, Yuasa H, Kondo T, *et al.* The inhibition of human multidrug and toxin extrusion 1 is involved in the drug-drug interaction caused by cimetidine. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):555-9.
  54. Tsuda M, Terada T, Ueba M, Sato T, Masuda S, Katsura T, *et al.* Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329(1):185-91.
  55. Ito S, Kusuhara H, Kuroiwa Y, Wu C, Moriyama Y, Inoue K, *et al.* Potent and specific inhibition of mMate1-mediated efflux of type I organic cations in the liver and kidney by pyrimethamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(1):341-50.
  56. Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, Toyoshima J, Inoue K, Yuasa H, *et al.* Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(2):393-403.
  57. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, *et al.* HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 2009; **37**:D603-10.
  58. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(1):27-30.
  59. Finglas PM. Thiamin. *Int J Vitam Nutr Res.*1993;63(4):270-4.

60. Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):455-73.
61. Moyer JD, Malinowski N, Ayers O. Salvage of circulating pyrimidine nucleosides by tissues of the mouse. *J Biol Chem.* 1985;260(5):2812-8.
62. Lynch PL, Young IS. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2000;881(1-2):267-84.
63. Bain MA, Milne RW, Evans AM. Disposition and metabolite kinetics of oral L-carnitine in humans. *J Clin Pharmacol.* 2006;46(10):1163-70.
64. Cao Y, Wang YX, Liu CJ, Wang LX, Han ZW, Wang CB. Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers. *Clin Invest Med.* 2009;32(1):E13-9.
65. Hale JT, Bigelow JC, Mathews LA, McCormack JJ. Analytical and pharmacokinetic studies with 5-chloro-2'-deoxycytidine. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(10):1493-502.
66. Gastaldi G, Cova E, Verri A, Laforenza U, Faelli A, Rindi G. Transport of thiamin in rat renal brush border membrane vesicles. *Kidney Int.* 2000;57(5):2043-54.
67. Watanabe S, Tsuda M, Terada T, Katsura T, Inui K. Reduced renal clearance of a zwitterionic substrate cephalexin in MATE1-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010, 334(2):651-6.
68. Ashokkumar B, Vaziri ND, Said HM. Thiamin uptake by the human-derived renal epithelial (HEK-293) cells: cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(4):F796-805.
69. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, *et al.* Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet.* 1999;21(1):91-4.
70. Elwi AN, Damaraju VL, Baldwin SA, Young JD, Sawyer MB, Cass CE. Renal

- nucleoside transporters: physiological and clinical implications. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(6):844-58.
71. Weber W, Nitz M, Looby M. Nonlinear kinetics of the thiamine cation in humans: saturation of nonrenal clearance and tubular reabsorption. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1990;18(6):501-23.
  72. Dutta B, Huang W, Molero M, Kekuda R, Leibach FH, Devoe LD, *et al.* Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31925-9.
  73. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(11):941-67.
  74. Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;(201):105-67.
  75. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(1):2-9.
  76. Bleasby K, Castle JC, Roberts CJ, Cheng C, Bailey WJ, Sina JF, *et al.* Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica.* 2006;36(10-11):963-88.
  77. Said HM, Balamurugan K, Subramanian VS, Marchant JS. Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(3):G491-8.
  78. Zhao R, Goldman ID. Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Aspects Med.* 2013;4(2-3):373-85.
  79. Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, *et al.*

- High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia*. 2007;50(10):2164-70.
80. Larkin JR, Zhang F, Godfrey L, Molostvov G, Zehnder D, Rabbani N, *et al*. Glucose-induced down regulation of thiamine transporters in the kidney proximal tubular epithelium produces thiamine insufficiency in diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e53175.
  81. Spector R, Johanson CE. Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *J Neurochem*. 2007;103(2):425-38.
  82. Diaz GA, Banikazemi M, Oishi K, Desnick RJ, Gelb BD. Mutations in a new gene encoding a thiamine transporter cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome. *Nat Genet*. 1999;22(3):309-12.
  83. Fleming JC, Tartaglino E, Steinkamp MP, Schorderet DF, Cohen N, Neufeld EJ. The gene mutated in thiamine-responsive anaemia with diabetes and deafness (TRMA) encodes a functional thiamine transporter. *Nat Genet*. 1999;22(3):305-8.
  84. Oishi K, Hofmann S, Diaz GA, Brown T, Manwani D, Ng L, *et al*. Targeted disruption of *Slc19a2*, the gene encoding the high-affinity thiamin transporter *Thtr-1*, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. *Hum Mol Genet*. 2002;11(23):2951-60.
  85. Zeng WQ, Al-Yamani E, Acierno JS Jr, Slaugenhaupt S, Gillis T, MacDonald ME, *et al*. Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in *SLC19A3*. *Am J Hum Genet*. 2005;77(1):16-26.
  86. Reidling JC, Lambrecht N, Kassir M, Said HM. Impaired intestinal vitamin B1 (thiamin) uptake in thiamin transporter-2-deficient mice. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1802-9.
  87. Yoshioka K. Some properties of the thiamine uptake system in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1984;778(1):201-9.
  88. Bettendorff L, Wins P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors.

- FEBS J. 2009;276(11):2917-25.
89. Zastre JA, Sweet RL, Hanberry BS, Ye S. Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism. *Cancer Metab.* 2013;1(1):16.
  90. Foulon V, Antonenkov VD, Croes K, Waelkens E, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, *et al.* Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during alpha-oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):10039-44.
  91. Wolfe SJ, Brin M, Davidson CS. The effect of thiamine deficiency on human erythrocyte metabolism. *J Clin Invest.* 1958;37(11):1476-84.
  92. Krishna S, Taylor AM, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, ter Kuile F, Tawfiq KM, *et al.* Thiamine deficiency and malaria in adults from southeast Asia. *Lancet.* 1999;353(9152):546-9.
  93. Shamir R. Thiamine-deficient infant formula: what happened and what have we learned? *Ann Nutr Metab.* 2012;60(3):185-7.
  94. Ito N, Ito K, Ikebuchi Y, Kito T, Miyata H, Toyoda Y, *et al.* Organic cation transporter/solute carrier family 22a is involved in drug transfer into milk in mice. *J Pharm Sci.* 2014;103(10):3342-8.
  95. Rindi G, De Giuseppe L, Sciorelli G. Thiamine monophosphate, a normal constituent of rat plasma. *J Nutr.* 1968;94(4):447-54.
  96. Rabbani N, Alam SS, Riaz S, Larkin JR, Akhtar MW, Shafi T, *et al.* High-dose thiamine therapy for patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: a randomised, double-blind placebo-controlled pilot study. *Diabetologia.* 2009;52(2):208-12.
  97. Boulware MJ, Subramanian VS, Said HM, Marchant JS. Polarized expression of members of the solute carrier SLC19A gene family of water-soluble multivitamin transporters: implications for physiological function. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):43-8.

98. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993;10(7):1093-5.
99. Makarchikov AF, Wins P, Janssen E, Wieringa B, Grisar T, Bettendorff L. Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1592(2):117-21.
100. Ferrebee JW, Weissman N, Parker D, Owen PS. Tissue thiamin concentrations and urinary thiamin excretion. *J Clin Invest.* 1942;21(4):401-8.
101. Wang DS, Jonker JW, Kato Y, Kusuhara H, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(2):510-5.
102. Zhao R, Gao F, Goldman ID. Reduced folate carrier transports thiamine monophosphate: an alternative route for thiamine delivery into mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(6):C1512-7.
103. Rindi G, Laforenza U. Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;224(4):246-55.
104. Han TK, Everett RS, Proctor WR, Ng CM, Costales CL, Brouwer KL, Thakker DR. Organic cation transporter 1 (OCT1/mOct1) is localized in the apical membrane of Caco-2 cell monolayers and enterocytes. *Mol Pharmacol.* 2013;84(2):182-9.
105. Lockman PR, Mumper RJ, Allen DD. Evaluation of blood-brain barrier thiamine efflux using the in situ rat brain perfusion method. *J Neurochem.* 2003;86(3):627-34.
106. van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, *et al.* Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol.* 2007;27(4):1247-53.
107. Stuetz W, Carrara VI, McGready R, Lee SJ, Biesalski HK, Nosten FH. Thiamine diphosphate in whole blood, thiamine and thiamine monophosphate in breast-milk in a refugee population. *PLoS One.* 2012;7(6):e36280.

108. Takeuchi A, Motohashi H, Okuda M, Inui K. Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter hOCT1. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2003;18(6):409-12.
109. Choi MK, Song IS. Genetic variants of organic cation transporter 1 (OCT1) and OCT2 significantly reduce lamivudine uptake. *Biopharm Drug Dispos.* 2012;33(3):170-8.
110. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11:395.
111. Piskula MK. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. *J Nutr.* 2000; 130(7):1766-71.
112. Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I, *et al.* Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm Res.* 2004; 21(5):742-8.
113. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, *et al.* Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res.* 2004; 21(10):1895-903.
114. Busch AE, Karbach U, Miska D, Gorboulev V, Akhoundova A, Volk C, *et al.* Human neurons express the polyspecific cation transporter hOCT2, which translocates monoamine neurotransmitters, amantadine, and memantine. *Mol Pharmacol.* 1998;54(2):342-52.
115. Hirano M, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(1):139-46.
116. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent: *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
117. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn.* 1981;4(11):879-85.

118. Yamazaki M, Suzuki H, Hanano M, Tokui T, Komai T, Sugiyama Y. Na(+)-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. *Am J Physiol.* 1993;264(1 Pt 1):G36-44.
119. Jonker JW, Wagenaar E, Van Eijl S, Schinkel AH. Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7902-8.
120. Higgins JW, Bedwell DW, Zamek-Gliszczyński MJ. Ablation of both organic cation transporter (OCT)1 and OCT2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(6):1170-7.
121. Ito N, Ito K, Koshimichi H, Hisaka A, Honma M, Igarashi T, *et al.* Contribution of protein binding, lipid partitioning, and asymmetrical transport to drug transfer into milk in mouse versus human. *Pharm Res.* 2013;30(9):2410-22.
122. Wielders JP, Mink CJ. Quantitative analysis of total thiamine in human blood, milk and cerebrospinal fluid by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1983;277:145-56.