

機関番号： 12501

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21790142

研究課題名(和文) 薬物間相互作用の機序としてのトランスポーター機能低下メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of long-lasting inhibition of transporters as a mechanism of transporter-related drug-drug interactions

研究代表者 設楽 悦久 (SHITARA YOSHIHISA)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：00306656

研究成果の概要(和文)：薬物の肝取り込みトランスポーターに關与するトランスポーターの阻害によって生じる薬物間相互作用は、現在までに多くの臨床例が報告され、注目されている。我々は、これまでにシクロスポリンによって OATP ファミリーに属する肝取り込みトランスポーターが阻害を受け、薬物間相互作用を引き起こす可能性があることを示してきた。また、ラットにおいては、シクロスポリンによる肝取り込み阻害が持続的であることを示してきた。本研究では、シクロスポリンによるヒト OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害効果について検討を行い、同様に持続的阻害を引き起こすことを示した。このことによって臨床で重大な相互作用を引き起こしたものと考えることができる。シクロスポリンによる OATP1B1 に対する影響についてさらに検討した結果、トランスポーターの膜表面での発現量に対して影響を与えないことがわかった。また、OATP1B1 を片側にのみ発現する極性細胞の MDCKII-OATP1B1 細胞を用いて、OATP1B1 発現部位 (basal 側) および非発現部位 (apical 側) にシクロスポリンを曝露した実験の結果では、いずれにおいても OATP1B1 機能の持続的低下が認められたことから、シクロスポリンによる阻害は OATP1B1 に対する直接的な曝露を必要とせず、むしろ細胞内に存在することによって阻害が引き起こされることが示された。すなわち、シクロスポリンは肝臓内に蓄積することで OATP1B1 の持続的な阻害を引き起こすことが示された。また、ラットを用いて消化管 Oatp に対する影響についても検討を行った。この結果から、シクロスポリンは肝臓だけでなく消化管 Oatp もまた持続的に阻害することが示された。

研究成果の概要(英文)：Hepatic uptake transporters as well as drug metabolizing enzymes play an important role in elimination of drugs via liver. Among the hepatic transporters, organic anion transporting polypeptides (OATPs/Oatps) are key factors as a determinant of the elimination rates of a number of therapeutic reagents via liver. Thus,, inhibition of hepatic uptake transporters may cause clinically relevant drug-drug interactions (DDIs). We showed that cyclosporine A (CsA) causes a clinically relevant DDI by inhibition of OATPs. In rats, CsA causes a long-lasting inhibition of Oatps. In the present study, we examined the effect of CsA on human OATP1B1 and OATP1B3. CsA has a long-lasting inhibitory effect on the OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake, with a more potent effect on OATP1B1. However, it caused neither a reduction in the expression level of OATP1B1 nor its altered localization. By using polarized MDCK II cells expressing OATP1B1, it was shown that CsA in the cells caused a long-lasting inhibition of OATP1B1, but its exposure is not required. Thus, also in the clinically relevant DDIs, CsA in the liver may cause a long-lasting inhibition. We also examined the effect of CsA on the intestinal Oatps by using fexofenadine as a model compound in rats. Although CsA increased the intestinal absorption of fexofenadine by inhibiting its intestinal efflux mediated by P-glycoprotein 3 hours after oral administration of CsA, it reduced the intestinal absorption of this drug possibly caused by the inhibition of Oatp-mediated absorption 1 day after the oral administration. Thus, CsA causes a long-lasting inhibition of intestinal Oatps, too.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

我々は、薬物トランスポーターを介した取り込み過程で臨床で報告されている薬物間相互作用が引き起こされたことを示してきた。肝取り込みトランスポーター阻害によって引き起こされる薬物間相互作用は、我々が報告して以来、国内外の製薬企業や医薬品の規制当局からも注目されている。実際に、新規に市販される医薬品については、その医薬品添付文書への記載がなされることもある。その中でも、シクロスポリン (CsA) は多くの薬物と重大なトランスポーターレベルでの薬物間相互作用を引き起こすことが報告されている。CsA による薬物間相互作用は、その血中濃度から予測されるのに比べて、程度が大きいと考えられる。そこで、CsA によるトランスポーター阻害に関しては新規な機序によるものだと考え、機序解明を目的とした検討を行い、ラットにおいては、CsA が持続的阻害を引き起こすことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

CsA によるヒト OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害効果の持続性について検討を行い、その持続的阻害の機序を解明することを目的とする。また、OATP/Oatp を介した消化管吸収過程についても、注目されつつあるので、CsA による消化管吸収に対する影響についても検討を行った。CsA 以外に fibrate 系高脂血症治療薬による OATP/Oatp 阻害もまた報告されているため、fibrate 系高脂血症治療薬によるトランスポーターに対する影響についても検討を行った。

3. 研究の方法

ヒト OATP1B1 および OATP1B3 に対する影響では、それぞれのトランスポーターを発現させた HEK293T および MDCK 細胞またはヒト肝細胞を用いた。消化管吸収に対する影響では、

ラットを用い、fexofenadine の体内動態に対する影響を検討した。また、fibrate による影響では、ラットに clofibrate を投与し、膜上のコレステロール量と遊離肝細胞での輸送活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害効果: OATP1B1 および OATP1B3 発現 HEK293T 細胞に CsA を添加し、除去した後で、取り込み実験をしたところ、取り込み機能の低下が認められた。したがって、CsA による持続的阻害効果が認められた。持続的阻害は、CsA を除去してから 18 時間後においても観察された。この阻害効果には、濃度依存性および曝露時間依存性が見られた。一方で、tacrolimus によっては同様の効果が見られなかった。

(2) CsA による OATP1B1 の発現量および細胞内局在に対する影響: OATP1B1 発現 HEK293 細胞に CsA を添加し、除去した後で OATP1B1 の発現量を解析したところ、CsA 処理による変化は見られなかった。また、免疫染色の手法により OATP1B1 の細胞内局在についても検討を行ったが、CsA 処理による顕著な変化は見られなかった。

(3) OATP1B1 発現 MDCK 細胞における検討: OATP1B1 発現 MDCK 細胞では、細胞の basal 側のみにトランスポーターを発現する。そこで、CsA を basal 側または apical 側のいずれか一方のみに添加し、影響を検討した。Basal 側または apical 側に添加した CsA は添加後 20 分間では、反対側にほとんど移行しないことを確認した。一方で、細胞内には取り込まれ、apical および basal 側のどちらに添加しても、細胞内蓄積量はほぼ同程度であることを確認した。CsA 添加後に OATP1B1 の機能を評価したところ、OATP 発現部位である baas1

側に CsA を添加した場合だけでなく、apical 側に添加した場合においても、機能低下が認められた。このことから、CsA による OATP1B1 の持続的阻害には、トランスポーターが CsA に曝露されることではなく、細胞内または膜上に CsA が存在することが重要な意味を持つことが示唆された。

(4) ヒト肝細胞を用いた検討：OATP1B1 の機能を評価するために、ヒト肝細胞における estrone 3-sulfate の取り込みを観察し、CsA による影響を検討した。この結果、ヒト肝細胞においても CsA による持続的な阻害効果が観察された。

(5) CsA による消化管型 Oatp に対する影響：ラットに CsA を経口投与したときの、静脈内投与または経口投与した fexofenadine (FEX) の体内動態に対する影響を検討した。FEX を静脈内投与した時には、CsA 投与 3 時間後および 1 日後のいずれにおいても、FEX 血中濃度の上昇が認められた。これは、FEX の消失に関わる肝臓トランスポーターが競合的および持続的両方の機序によって阻害されたためと考えられる。一方、FEX を経口投与したときには、CsA 投与 3 時間度においては、血中濃度が顕著に上昇したのに対して、1 日後ではほとんど変化が認められなかった。投与 3 時間後においては、肝臓トランスポーターの阻害による消失低下と、消化管 P-gp の阻害による汲み出し低下によって、血中濃度が上昇したものと思われる。一方、投与 1 日後においては、肝臓トランスポーターの持続的阻害と消化管 Oatp の阻害によって、見かけ上、血中濃度の変化がなかったためであると思われる。したがって、CsA は肝臓 OATP/Oatp だけでなく、消化管吸収に関与する Oatp もまた持続的に阻害することが明らかとなった。

(6) Clofibrate による肝臓トランスポーターへの影響：Gemfibrozil による OATP 阻害が報告されていることを受け、fibrate 系高脂血症治療薬によるトランスポーター活性に対する影響を検討した。ラットにおいては、gemfibrozil に比べて、clofibrate の方が高い薬理活性を有しているため、この薬剤を用いた。Clofibrate を投与したラットにおいては、肝細胞膜における cholesterol 含量の低下が認められた。このラットから調製した遊離肝細胞で Oatp 基質の取り込みを観察したところ、有意な低下が認められた。このとき、Oatp1a1 の発現量を解析したところ、clofibrate 投与ラットにおいて、発現量の低下が認められた。したがって、clofibrate 投与ラットにおける Oatp 機能の低下はトランスポーター発現量の低下によるものである

ことが示された。一方、taurocholate の取り込みについても同様に確認したところ、clofibrate 投与ラットにおいて上昇が認められた。ヒト Ntcp 発現細胞においては、膜 cholesterol 低下によるトランスポーターの raft:non-raft 間での移行による機能上昇が報告されている。したがって、ラットにおける cholesterol 投与による Ntcp 機能の亢進は、トランスポーターの raft:non-raft 間での移行によって生じている可能性が考えられる。現在、in vivo での機能変化についても解析しているところである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshihisa Shitara: Clinicacl Importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. Drug Metab. Pharmacokinet. *in press*

[学会発表] (計 6 件)

鈴木敬、設楽悦久、堀江利治: Fexofenadine と cyclosporin A の消化管吸収過程で生じるトランスポーターを介した薬物間相互作用, 日本薬学会第 131 年会 (静岡県コンベンションアーツセンター、静岡) 2011. 3. 30

Yoshihisa Shitara, Kumiko Takeuchi, Satomi Wada, Yoshiko Nagamatsu, Yuichi Sugiyama, Toshiharu Horie: Long-lasting inhibition of human organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 by cyclosporin A, Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress /AAPS annual meeting and exposition (Morial Convention Center, New Orleans, LA, USA) 2010. 11. 16

竹内久美子、設楽悦久、永松佳子、和田怜美、杉山雄一、堀江利治: シクロスポリンによる肝トランスポーター OATP の阻害機序の解析, 第 54 回日本薬学会関東支部大会 (東京薬科大学、東京) 2010. 10. 2

和田怜美、設楽悦久、堀江利治: ラットにおける clofibrate 投与による有機アニオントランスポーター Oatp の活性変動の機序解析, 日本薬学会第 130 年会 (岡山コンベンションセンター、岡山) 2010. 3. 28

設楽悦久、竹内久美子、和田怜美、永松佳子、杉山雄一、堀江利治: Comparative inhibitory effect of cyclosporine A and tacrolimus on the OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake, 日本薬物動態学

会第 24 年会（国立京都国際会館、京都）2009. 11. 27

設楽悦久、竹内久美子、和田怜美、永松佳子、杉山雄一、堀江利治：シクロスポリンによる OATP1B1 および OATP1B3 の持続的阻害，第 3 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム（九州大学病院地区コラボレーション、福岡）2009. 11. 14

〔図書〕（計 1 件）

設楽悦久：薬物トランスポーター 活用ライブラリー（乾賢一 編集）第 3 章 2-(3) スタチン系高脂血症治療薬の薬物間相互作用に関わるトランスポーター pp. 172 - 174（羊土社、2010）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 設楽悦久  
(SHITARA YOSHIHISA)

研究者番号：00306656

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：