

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790176

研究課題名(和文)核酸類似薬物の消化管吸収変動機構解析

研究課題名(英文)The mechanisms of the variability in the intestinal absorption of nucleoside drugs

研究代表者

石田 和也 (Ishida, Kazuya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：90550509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：健常成人およびミゾリピンを服用中の腎移植患者におけるミゾリピンの体内動態の個体差には、バイオアベイラビリティ(F)の個体差が関与し、concentrative nucleoside transporter (CNT) 1の遺伝的多型がFの個体差に一部関与していることを明らかにした。さらに、培養細胞等を用いてミゾリピンの吸収に関与するトランスポーターについて評価したところ、CNT1に加え、CNT2、equilibrative nucleoside transporters (ENTs)、および未同定の排出トランスポーターが関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The findings in the present study indicate that the variable bioavailability (F) of mizoribine is one of the factors for the interindividual pharmacokinetic variability of the drug in healthy volunteers and adult and pediatric recipients of renal transplantation, and that the genetic polymorphism of concentrative nucleoside transporter (CNT) 1 is partly involved in the variable F of mizoribine. In addition, the membrane transport of mizoribine in intestinal epithelial cells is mediated by CNT1, CNT2, equilibrative nucleoside transporters (ENTs), and unidentified efflux transporter(s).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：薬物動態 トランスポーター 臨床試験

## 1. 研究開始当初の背景

核酸類似構造を有するミゾリピンの免疫抑制作用は血中濃度と密接に関連するが、経口投与後の薬物血中濃度には極めて大きな個体差が存在する。ミゾリピンは生体内でほとんど代謝を受けず主に腎臓から排泄されるため、患者の腎機能がミゾリピンの体内動態の変動要因と考えられてきた。一方近年、ミゾリピンの累積尿中排泄率にも大きな個体差があることが報告され、消化管吸収の不良が体内動態変動の別要因として認識されつつある。核酸類似薬物の消化管吸収には、小腸上皮細胞の消化管腔側に発現するナトリウム依存性かつ高親和性の核酸トランスポーターである *concentrative nucleoside transporter (CNT)* と、血管側に発現する低親和性で促進拡散型の核酸トランスポーターである *equilibrative nucleoside transporter (ENT)* が関与すると考えられてきた。一方、2007年に ENT が小腸上皮細胞の消化管腔側膜にも発現していることが明らかとなった。そこで申請者は、培養ヒト腸上皮 LS180 細胞を用いて、C 型肝炎治療薬リバビリンの管腔側膜輸送を評価したところ、低濃度域 (1  $\mu\text{M}$ ) での取り込みには CNT が主に関与するが、中高濃度域 ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) での取り込みには ENT が大きく寄与することを明らかにした。さらに、LS180 細胞における 400  $\mu\text{M}$  ミゾリピンの取り込みにも、CNT に加え ENT が大きく寄与することが明らかになったが、ミゾリピンはリバビリンと構造が酷似しているにも拘わらず、ミゾリピンの細胞内取り込み量はリバビリンに比べて小さな値を示した。そこで、両薬物の取り込み速度の違いを明らかにするために、LS180 細胞を用いて定常状態におけるミゾリピンとリバビリンの細胞内/外濃度比 (C/M) 比を比較した。低ナトリウム条件では、濃度勾配に従って輸送する ENT のみがリバビリンとミゾリピンの細胞内取り込みに関与するため、能動的な排出過程が存在しなければ定常状態における C/M 比は 1 に近づくと考えられる。しかし、リバビリンとミゾリピンの C/M 比はそれぞれ約 0.6 と 0.1 であったことから、両薬物は共に LS180 細胞から排出トランスポーターによって能動的に管腔側へ排出されるものの、ミゾリピンの排出活性はリバビリンよりも著しく高いと推定された。

## 2. 研究の目的

本研究では、健常成人を対象とした臨床試験を実施し、バイオアベイラビリティに個体差が存在するか否かを評価するとともに、その個体差に及ぼす吸収・排出トランスポーターの遺伝的多型の影響などを検討する。また、ミゾリピンを服用中の患者の血清中濃度データを非線形混合効果モデル (NONMEM) 法で解析し、バイオアベイラビリティに個体差が存在するか否かを評価する。さらに、トランスポーター発現膜ベシクルなどを用い

てミゾリピンの排出トランスポーターの同定を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 健常成人を対象とした臨床試験：ミゾリピンは生体内でほとんど代謝されず、未変化体として尿中に排泄されることから、累積尿中排泄率を用いてバイオアベイラビリティ (消化管吸収率) を算出することが可能である。本研究では、健常成人男性を対象として、ミゾリピンのバイオアベイラビリティに及ぼす吸収・排出トランスポーターの遺伝的多型の影響を評価した。

(2) ミゾリピンを服用中の患者の血清中濃度データを用いた体内動態解析：ミゾリピンのタンパク結合率は極めて低いことから、バイオアベイラビリティに個体差が存在すれば、経口クリアランス (CL/F) と見かけの分布容積 (V/F) との間に正の相関が認められる。本研究では、治療のためにミゾリピンを服用中の成人および小児腎移植患者の血清中濃度データを NONMEM 法で解析し、CL/F と V/F との間に正の相関が認められるか否かを評価した。

(3) 培養細胞およびトランスポーター発現ベシクルを用いたミゾリピンの排出トランスポーターの同定：薬物を能動的に細胞外へ排出するトランスポーターとして、 $\Delta$ ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターが知られている。ABC トランスポーターの中で、*multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)* や *breast cancer resistance protein (BCRP)* などが核酸類似構造を有する薬物を輸送することが報告されている。本研究では、これら ABC トランスポーターがミゾリピンの排出に関与しているか否かを評価するために、トランスポーター発現膜ベシクルなどを用いて実験を行った。

## 4. 研究成果

(1) 健常成人を対象とした臨床試験：日本人健常成人男性 30 名を対象として、累積尿中排泄率より算出したバイオアベイラビリティに及ぼすトランスポーターの遺伝的多型の影響を評価したところ、*CNT1 565-A/A* 遺伝子型を有する被験者のバイオアベイラビリティは *CNT1 565-G/G* 遺伝子型を有する被験者よりも有意に低くなった。これらの結果より、健常成人において、ミゾリピンの消化管吸収率の個体差には、*CNT1* の発現/活性変動が一部関与していることが明らかとなった。しかし、ミゾリピンのバイオアベイラビリティの個体差は、*CNT1* の遺伝的多型ではすべて説明できない。そこで、*CNT1 565-G/A* および *565-A/A* 遺伝子型を有する被験者を対象とした臨床試験を追加し、ミゾリピンのバイオアベイラビリティに及ぼす食塩摂取の影響を評価したところ、ミゾリピンの約 10 倍モルに相当する食塩を同時に摂取することによって、ミゾリピンのバイオアベイラビ

リティが有意に上昇した。さらに、CNT1 および CNT2 を過剰発現させた *Madin Darby canine kidney* (MDCK) II 細胞におけるシチジン (CNT1 の典型的な基質) およびイノシン (CNT2 の典型的な基質) の取り込みに及ぼすミゾリビンの影響を評価したところ、ミゾリビンの濃度依存的に取り込みが阻害され、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) はそれぞれ、2.5 mM および 8.8 mM と算出された。CNT1 および CNT2 発現 MDCKII 細胞において、ミゾリビンはナトリウム依存的に取り込まれたことから、ミゾリビンは CNT1 および CNT2 における低親和性の基質であることが明らかとなった。これらの結果より、ミゾリビンの消化管吸収の個体差には、CNT1 の遺伝的多型に加え、食事中に含まれる食塩量の影響を受ける可能性が考えられた。CNT1 の遺伝子変異を持つ被験者においても食塩摂取によってバイオアベイラビリティが有意に上昇したことから、CNT2 もミゾリビンの消化管吸収に少なくとも一部関与していると推定された。しかし、CNT2 を考慮しても、ミゾリビンのバイオアベイラビリティの個体差はすべて説明できず、ENT のような別の核酸トランスポーター、核酸トランスポーター以外の取り込みトランスポーター、あるいは排出トランスポーターが関与しているものと考えられた。

(2) ミゾリビンを服用中の患者の血清中濃度データを用いた体内動態解析：成人腎移植患者のミゾリビンの血清中濃度データを NONMEM 法で解析したところ、ミゾリビンの体内動態は、一次吸収および吸収ラグタイムを仮定した 1-コンパートメントモデルに適合することが明らかとなった。さらに、ミゾリビンの V/F と CL/F との間に強い正の相関が認められたことから、成人腎移植患者において、ミゾリビンの体内動態の個体差には腎機能に加え、バイオアベイラビリティの個体差が関与していることが明らかとなった。さらに、小児腎移植患者の血清中ミゾリビン濃度データを NONMEM 法で解析したところ、成人腎移植患者と同様に、小児腎移植患者におけるミゾリビンの体内動態は一次吸収および吸収ラグタイムを仮定した 1-コンパートメントモデルに適合することが明らかとなった。また、CL/F と V/F との間に強い正の相関が認められたことから、小児患者においてもバイオアベイラビリティの個体差が体内動態の個体差に一部関与していることが明らかとなった。これらの結果より、NONMEM 法を用いて CL/F と V/F との相関を評価することによって、バイオアベイラビリティの個体差が存在するか否かを簡便に評価することが可能であると考えられた。

(3) 培養細胞およびトランスポーター発現ベシクルを用いたミゾリビンの排出トランスポーターの同定：ミゾリビンを輸送する ABC トランスポーターの候補として、MRP4 および BCRP が考えられる。また、申請者の

以前の検討において、LS180 細胞におけるミゾリビンの C/M 比がパントプラゾールによって有意に上昇した。パントプラゾールは BCRP に加え、P-糖タンパク質 (P-gp) を阻害することが報告されていることから、MRP4 と BCRP に加え、P-gp がミゾリビンの排出に関与している可能性がある。本研究では、赤血球膜ゴーストおよび ABC トランスポーター発現膜ベシクルを用いて、ATP 依存的なミゾリビンの取り込みを評価した。その結果、赤血球膜ゴーストおよび P-gp、MRP4、および BCRP 発現膜ベシクルにおいて、ミゾリビンは ATP 依存的に取り込まれなかった。赤血球には、BCRP 以外にも MRP1 や MRP5 といった ABC トランスポーターが発現していると報告されている。これらの結果より、ミゾリビンの能動的な排出には P-gp、MRP4、BCRP、および赤血球に発現している ABC トランスポーターの寄与は無い、もしくは極めて小さいと考えられた。今後は、別の ABC トランスポーターや、イオン勾配など利用した二次性能動輸送体がミゾリビンの排出に関与しているかどうかも含めて、検討していく予定である。

#### 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4件)

- (1) Ishida K, Fukao M, Watanabe H, Taguchi M, Miyawaki T, Matsukura H, Uemura O, Zhang Z, Unadkat JD, Hashimoto Y. Effect of salt intake on bioavailability of mizoribine in healthy Japanese males. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 28:75-80 (2013). doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-NT-043, 査読有
- (2) Ishida K, Motoyama O, Shishido S, Tsuzuki K, Hashimoto Y. Population pharmacokinetics of mizoribine in pediatric recipients of renal transplantation. *Clin Exp Nephrol.*, 16:799-804 (2012). doi: 10.1007/s10157-012-0616-4, 査読有
- (3) Ishida K, Okamoto M, Ishibashi M, Hashimoto Y. Population pharmacokinetics of mizoribine in adult recipients of renal transplantation. *Clin Exp Nephrol.*, 15:900-906 (2011). doi: 10.1007/s10157-011-0487-0, 査読有
- (4) Fukao M, Ishida K, Sakamoto T, Taguchi M, Matsukura H, Miyawaki T, Hashimoto Y. Effect of genetic polymorphisms of *SLC28A1*, *ABCG2*, and *ABCC4* on bioavailability of mizoribine in healthy Japanese males. *Drug Metab Pharmacokinet.*, 26:538-543 (2011). doi: 10.2133/dmpk.DMPK-11-NT-040, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

- (1) Ishida K, Horie A, Nishimura M, Taguchi M,

- Fujii N, Nozawa T, Inoue H, Hashimoto Y. Variability of bioavailability and intestinal absorption characteristics of bisoprolol. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2013 Nov 23-24, 仙台
- (2) Ishida K, Fukao M, Takabayashi M, Taguchi M, Itoh H, Hashimoto Y. Variability of bioavailability of mizoribine in healthy males and mechanisms of barrier function for intestinal absorption. 日本薬物動態学会第28回年会, 2013 Oct 9-11, 東京
- (3) Fukao M, Ishida K, Watanabe H, Taguchi M, Miyawaki T, Matsukura H, Uemura O, Zhang Z, Unadkat JD, Hashimoto Y. Improvement of the intestinal absorption of mizoribine by salt intake in healthy Japanese males. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012, Nov 20-22, 東京
- (4) 渡邊ひとみ, 石田和也, 深尾美紀, 田口雅登, 宮脇利男, 松倉裕喜, 上村治, Zhang Z, Unadkat JD, 橋本征也, ミゾリピンの吸収に及ぼすナトリウムの影響, 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012, Nov 18, 富山
- (5) Ishida K, Fukao M, Watanabe H, Taguchi M, Miyawaki T, Matsukura H, Uemura O, Zhang Z, Unadkat JD, Hashimoto Y. Effect of salt intake on bioavailability of mizoribine in healthy Japanese males. 18<sup>th</sup> North American ISSX meeting, 2012, Oct 14-18, Dallas
- (6) Ishida K, Fukao M, Watanabe H, Taguchi M, Matsukura H, Miyawaki T, and Hashimoto Y: Effect of Genetic Polymorphisms of *SLC28A1*, *ABCG2*, and *ABCC4* on Bioavailability of Mizoribine in Healthy Japanese Males. 2011 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting, 2011, Nov 23-27, Washington, D.C.
- (7) Fukao M, Ishida K, Taguchi M, Matsukura H, Miyawaki T, and Hashimoto Y: Effect of genetic polymorphisms of nucleoside and efflux transporters on bioavailability of mizoribine. 日本薬物動態学会第26年会, 2011, Nov 16-18, 広島
- (8) 横田篤, 森川真圭, 石田和也, 田口雅登, 橋本征也. 培養ヒト腸上皮細胞を用いたミゾリピンの消化管吸収機構解析. 日本薬学会北陸支部第123回例会, 2011, Nov 27, 金沢
- (9) 深尾美紀, 渡邊ひとみ, 石田和也, 田口雅登, 橋本征也, 松倉裕喜, 宮脇利男, 健康成人のミゾリピンの消化管吸収に対する遺伝と食塩摂取の影響. 日本薬学会北陸支部第123回例会, 2011, Nov 27, 金沢

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/anzensei/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石田 和也 (ISHIDA, Kazuya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・

### 助教

研究者番号：90550509