

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659071

研究課題名(和文)薬物トランスポーターの*in vivo*機能評価を実現する内因性化合物の網羅的探索研究課題名(英文)Comprehensive analysis of endogenous compounds applicable to *in vivo* evaluation of drugs transporters

研究代表者

楠原 洋之 (Kusuhara, Hiroyuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00302612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：薬物トランスポーターに対して、個体レベルでの機能変動を評価可能な内因性プローブを確立することを目的とし、健常人被験者を対象とした薬物間相互作用試験の臨床検体を利用し、その生体試料中から薬物トランスポーターの機能変動と関連する化合物を探索した。腎有機カチオントランスポーター(MATE)のプローブとして、thiamineを見いだしたほか、腎有機アニオントランスポーター(OAT3)のプローブとして、6 $\beta$ -hydroxycortisolなどを見いだした。これらの腎クリアランスは阻害剤投与により顕著に低下したことから、内因性プローブとして薬物間相互作用の評価に有用である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the endogenous probes that are applicable to *in vivo* evaluation of drug transporter activities in humans. The endogenous probes, the plasma or urinary excretion of which were associated with the transporter activities, were investigated in the biological samples from the healthy subjects who had been enrolled in the drug interaction studies. We could demonstrate that thiamine is a probe renal organic cation transporter (MATE), that 6 $\beta$ -hydroxycortisol is a probe for renal organic anion transporter (OAT3). Their renal clearances were significantly reduced by the administration of inhibitors, showing their usefulness in the evaluation of drug-drug interactions involving these transporters.

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：薬物動態・代謝学

キーワード：薬物動態 トランスポーター 薬物間相互作用 個人間変動 メタボローム 代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

個体レベルの薬剤応答性には、薬効関連因子に加えて、薬効関連因子への曝露を決定する体内動態関連因子も深く関わる。体内動態関連因子には、医薬品の代謝に関わる薬物代謝酵素のほか、その膜透過に関わるトランスポーターが知られている。体内動態関連因子としてのトランスポーター(薬物トランスポーター)の特徴は、1つの分子種が複数の構造の異なる化合物を基質とする多選択性にある。そのため、限られた数のトランスポーターで、多様な化合物の体内動態の決定要因となる。トランスポーターは医薬品の消化管吸収、肝臓や腎臓からの異物排泄、組織移行に関わる複数の分子種が知られており、遺伝的変異や併用薬による機能阻害などその機能変動は必然的に体内動態の個人間変動を生じる。こうした機能変動を個体レベルで評価するため、トランスポーターの特異性の高い薬物の探索が進められてきた。特に、近年アメリカ食品医薬品局(FDA)やヨーロッパ欧州医薬品庁(EMA)、我が国の医薬品医療機器総合機構(PMDA)から、医薬品開発における薬物間相互作用試験のガイダンス・ガイドラインが発表されており、選択的な薬物トランスポーターのプロープ探索は注目を集めている。

薬物トランスポーターは外因性の化合物のみを基質とするだけでなく、内因性の化合物や食品成分およびその代謝物も基質とすることが知られている。一例をあげると、医薬品の腎排泄に働く有機カチオントランスポーター群は、creatine の代謝物である creatinine を基質とする。Creatinine は、その血漿中濃度や腎クリアランスが腎機能の指標として利用される代謝物であるが、腎機能が正常であるにも関わらず、複数の薬物で併用時に血漿中濃度の増加が指摘されてきた。これは後に、有機カチオントランスポーターの機能阻害で説明できることが報告されている。この結果は、必ずしも薬物を投与しなくても、プロープとして投与しなくても、内因性に生成するあるいは食事により必然的に摂取する化合物をモニターすることで、薬物トランスポーターの機能変動を検出することができることを意味している。Creatinine の腎排泄に占める尿細管分泌の寄与率は小さいことから、必然的に薬物トランスポーター機能に伴う変動幅は小さい。よりダイナミックレンジの広い(尿細管分泌の寄与率が高い)代謝物を同定する必要がある。

近年の分析技術の発達により、質量分析装置の精密さならびに定量性は大きく向上しており、生体試料中の多成分を網羅的に解析することが可能となり、メタボローム解析と呼ばれている。本分析手法を用いることで、薬物トランスポーターの機能変動と関連した内因性化合物を網羅的に探索することが可能となる。

## 2. 研究の目的

個体レベルでの薬物トランスポーター機能の評価は、外因性にプロープ薬を投与することで行われてきた。すでに薬剤が投与された検体の二次利用、患者など外部からプロープ投与とその体内動態評価が困難な際にも、薬物トランスポーターの機能変動を検出することを目的として、薬物トランスポーターについて、個体レベルでの機能評価に利用できる内因性基質を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

腎クリアランスとして、異物排泄能力の変動を定量的に評価可能な腎薬物トランスポーターを解析の中心とした。健常人被験者において実施した薬物トランスポーターを標的とした薬物間相互作用試験の血液・尿検体を用いて、LC-MS を用いてメタボローム解析を実施した。尚、検体の利用にあたっては、臨床試験実施施設ならびに東京大学薬学部の倫理委員会の承認を得た。

阻害剤投与群・非投与群で強度の異なるピークを選別し、個体間変動や変動の大きさを考慮して、絞り込みを行った。さらに、精密質量(m/z)から推定される化学式およびフラグメントパターンに合致する化合物をデータベース上にて検索することで、候補化合物の推定を行った。標品との保持時間、m/z ならびにフラグメントパターンの比較から、化合物の同定を行った。

プロープとしての妥当性を示すため、必要に応じて、実験動物での試験、薬物トランスポーターの過剰発現細胞を用いた in vitro 試験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1)腎有機カチオントランスポーター(MATE)の基質探索

前述の通り、MATE は腎カチオン性薬物の排出に働くトランスポーターであり、その機能阻害は腎臓中への薬物の蓄積を招く。薬物速度論に基づく、こうした排出輸送過程における機能低下は血漿中濃度よりも組織中濃度に与える影響の方が大きいことが予想され、プラチナ製剤など腎障害性を持つ薬物の場合、血漿中濃度の変動から推測される以上に強い障害が生じる可能性が懸念される。

健常人において、典型的 MATE 基質薬物である metformin と強力な MATE 阻害剤である pyrimethamine との相互作用試験の検体を用いて、MATE の内因性基質を探索した。ヒト尿中に 2000 のピークが検出された。このうち、pyrimethamine 投与により2倍以上濃度の異なる、複数の被験者由来のサンプルで低下が認められる、プロダクトイオンを検出するための十分なピーク強度が得られる、等の条件で絞り込みを行った。その結果、

N-methylnicotinamide、deoxycytidine、carnitine およびアシルカルニチン ( propionylcarnitine、acetylcarnitine )、thiamine では尿中濃度の変動が認められた。同定には至らなかった化合物も5つ検出された。

さらに血漿中濃度および尿中排泄量の時間推移を測定した。thiamine では pyrimethamine 投与後期(8時間以後)に血漿中濃度の低下が認められ、一方、尿中排泄量は投与 1-7 時間後には大きく低下していた。Carnitine および acetylcarnitine でも同様の傾向が認められた。腎クリアランスとして評価した場合、80%以上の低下が認められた。本試験における metformin の腎クリアランスの減少が30%程度に留まることを考えると、内因性化合物の方がより検出感度の高いプローブと言える。

Thiamine や carnitine は尿中から再吸収されることが知られている。事実、腎クリアランスは糸球体ろ過速度(GFR)を下回っている。pyrimethamine 投与により尿細管分泌が完全に阻害されると仮定した場合、通常の thiamine および carnitine とともに分泌を受けるものと推定される。事実、過剰量の thiamine 投与時には、再吸収の飽和に伴い、分泌が顕著になることが知られている。

従来から、腎有機カチオントランスポーターの内因性プローブとして利用されてきた N-methylnicotinamide に加えて、新たに thiamine を内因性 MATE プローブとして同定することができた。

## (2)6 $\beta$ -hydroxycortisol の血漿中濃度・尿中排泄量に与える probenecid の効果

6 $\beta$ -hydroxycortisol (6 $\beta$ -OHF) は cortisol から生成する代謝物であるが、尿細管分泌をうけることを報告している。過剰発現系を用いた in vitro 試験から、OAT3、MATE 基質となることが判明したため、有機アニオントランスポーター阻害剤である probenecid、pyrimethamine 投与検体を用いて、これら阻害剤が6 $\beta$ -OHFの腎クリアランスに与える影響について評価した。

Probenecid 投与により、6 $\beta$ -OHF 血漿中濃度の増加が認められたのに対して、尿中排泄速度は阻害剤投与による影響が認められなかった。Probenecid は低・中・高投与量での試験を実施したが、このうち benzylpenicillin の腎クリアランスの低下が認められた中程度の probenecid 投与検体を利用した。この投与量では、6 $\beta$ -OHF の尿細管分泌を完全に抑制することは出来なかった。これが OAT3 の寄与率を反映したものであるのか、阻害が不十分であったのか、高投与量 probenecid の効果評価などさらなる解析を必要とする。6 $\beta$ -OHF の血漿中濃度の変動ならびに腎クリアランスは、OAT3 の機能変動を検出するためのバイオマーカーとなることが示唆された。また、腎排泄の阻害に伴い血漿中濃度の増加が認められたことから、6 $\beta$ -OHF の主排泄経路は

腎臓であることが示唆された。

Probenecid とは異なり、pyrimethamine 投与による影響は全く認められなかった。この結果は、少なくとも、6 $\beta$ -OHF は in vitro で基質となるものの in vivo プローブとしては適していないことを示している。

## (3)Probenecid 投与により変動する化合物の網羅的探索

6 $\beta$ -OHF の尿中排泄量は変動しなかったことから、probenecid 投与により、尿中濃度が変動する化合物をメタボローム解析により探索した。その結果、精密質量(m/z)が一致する化合物として、胆汁酸硫酸抱合体 (glycochenodeoxycholate) および taurine について、probenecid 投与に伴い尿中排泄量の低下が示唆された。Glycochenodeoxycholate の硫酸抱合体を新たに合成し、標品として用いることで Glycochenodeoxycholate sulfate であることを確認した。Taurine については市販の標品を用いて検証した。Glycochenodeoxycholate sulfate の血漿中濃度の変動は大きくなかったことから、6 $\beta$ -OHF とは異なり、尿中の OAT3 マーカーとなることが期待される。Taurine については、強制発現系で OAT1、OAT3 いずれの基質とも認められなかったことから、probenecid 投与に伴う機能変動が OAT 阻害によるものであることを確認するには至らなかった。

以上、本研究により、腎有機カチオントランスポーターおよびアニオントランスポーターの内因性基質を、メタボローム解析により同定した。それぞれの動態特性に応じて、トランスポーターの機能阻害が血漿中濃度ならびに尿中排泄量に対する影響が異なる。血漿中濃度を複数時点採取すること、また蓄尿し、腎クリアランスを算出することで、腎薬物トランスポーターの機能評価が実施できることを実証した。

## 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2件)

全て査読あり

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. 31:136-147, 2014  
Imamura Y, Tsuruya Y, Damme K, Heer D, Kumagai Y, Maeda K, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Izumi T, Sugiyama Y, Kusuhara H. 6 $\beta$ -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 42:685-694, 2014

研究者番号： 00302612

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

〔学会発表〕(計4件)

楠原洋之、Recent Developments in Drug-Transporter Research. 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2012年10月14日~2012年10月18日、Chicago、USA

加藤幸司ほか Metabolomic analysis of urine specimens after treatment with pyrimethamine, a potent inhibitor of multidrug and toxin extrusion (MATE). 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting. 2012年11月20日~2012年11月22日、東京

楠原洋之、Identification of major substrates of efflux transporters in vivo by metabolomics analysis. Gordon Research Conference Multi-Drug Efflux Systems, 2013年3月17日~2013年3月22日、Ventura、USA

楠原洋之、薬物トランスポーターの発現・機能変動に伴い血漿中濃度・尿中排泄が変動する代謝物の探索、第86回日本生化学会、2013年9月11日~2013年9月13日、横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molpk/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

楠原 洋之 (KUSUHARA HIROYUKI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・教授