

ス PCR を行い、96 箇所 の SNP 部位 を切り出す反応を行った。マルチプレックス PCR 以降の反応操作は上述と同様に行った。

研究倫理面への配慮

本研究は、すでにヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認を得た疾患関連遺伝子多型解析研究に含まれる。また本研究は技術開発研究であり、技術の評価に用いるヒトゲノム試料は、全て公的財団（ヒューマンサイエンス財団）より得た連結不可能匿名化済み試料である。

C. 研究結果

DigiTag2 法を用い、96 箇所 の SNP を対象としたマルチプレックス SNP タイピングを 48 検体について行った。その結果、まずターゲット調製ステップすなわちマルチプレックス PCR 増幅に失敗したものが 96 箇所 の SNP 中 3 箇所見られた。また残り 93 箇所 の SNP 中に遺伝子型クラスター分離の悪かったものが 2 箇所見られた。さらに、これらを除く 91 箇所 の SNP においてコール率は 99.9%以上に達し、ダイレクトシーケンシングにより決定された遺伝子型との一致率は 100%となり、2 回の独立した実験から得られた再現性は R 二乗値で 0.98 であった。すなわち、DigiTag2 法は 9 割を越える高い成功率（conversion rate）を達成し、高い精度と再現性を持つ有用な SNP タイピング技術であることがわかった。

また、48 検体の WGA 産物を試料として、以後のステップには変更を加えず SNP タイピングを行ったところ、ゲノム DNA を試料とした場合と比較してほとんど相違ないか、若干クラスター分離が劣る傾向を認

めたが、実用上は大きな問題とはならないものと考えられた。

D. 考察

DigiTag2 法は、各 SNP の遺伝子型を ED および D1 の組み合わせに変換するエンコードのステップの前に、解析対象となる SNP を含む断片をマルチプレックス PCR により増幅する。解析対象断片だけを切り出して増幅するため、他のゲノム領域に相同性の高い領域が存在する場合でも正確なタイピングを行うことが可能となる。また、エンコードステップではミスマッチを導入したプローブを使用することにより、高い成功率で遺伝子型クラスターを分離できることが確認された。さらに物理・化学的性質が一樣となるように設計された ED および D1 を使用することにより、SNP タイピングを正確にかつ高い再現性で行えることが明らかとなった。

一方、マルチプレックス PCR の段階で十分な増幅が得られなかった 3 箇所 の SNP については、シグナル強度が弱すぎて解析不能となっていた。これらはプライマーを変えて単独に PCR を行っても増幅産物が得られなかったことから、PCR を阻害する何らかの要因（ゲノム DNA の二次構造など）あるいはデータベース登録配列の誤りが存在している可能性がある。

DigiTag2 法は、解析対象 SNP に対して自由に ED および D1 を割り当てられることから、エンコード反応以降は共通の試薬、DNA マイクロアレイ、および実験条件で解析を行うことができる。また、WGA 産物を試料とした SNP タイピングも可能であることから、わずかな量のゲノム DNA から

でも解析を行うことができる。これらの特徴は本手法が安価な遺伝情報解析のプラットフォームとなることを示している。現在、薬剤応答性遺伝子多型解析キットの作成に向けて、候補 SNP を選出し、特異的プローブ、プライマーの設計まで終えている。

E. 結論

前年度に開発した SNP タイピング技術をさらに改良し、簡便化、低コスト化を実現した DigiTag2 法を確立した。この技術により、高い成功率、コール率、精度、再現性を達成した。同一のマイクロアレイを用いて異なる SNP セットをタイピングできる柔軟性と経済性を利用して、薬剤応答性遺伝子群の多型解析キットを作成できると考えられ、現在そのプロトタイプを作成を開始している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

2. 論文発表

- 1) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K: Further development of multiplex SNP typing method, DigiTag2 assay. Anal. Biochem. 2007 [Epub ahead of print]
- 2) 徳永勝士： 遺伝子・ゲノム多型解析法の進展。「臨床ゲノム科学入門」永井良三（監）徳永勝士、山崎力、大木秀一（編）、杏林図書、208-220、2007.

3. 学会発表

- 1) Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A,

and Tokunaga K: DigiTag2 assay for multiplex SNP typing. 56th Annual Meeting, The American Society of Human Genetics. P.227, 2006

- 2) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士： DigiTag2 法を用いたマルチプレックス SNP タイピング. 日本人類遺伝学会第 51 回大会, P.141, 2006
- 3) 西田奈央、田邊哲也、高須美和、陶山明、徳永勝士： DigiTag2 法によるマルチプレックス SNP タイピング. 日本 DNA 多型学会第 15 回学術集会, P.55, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
杉山雄一、 前田和哉	第2章「前臨床から 臨床試験へのブリ ッジング」	杉山雄一・ 津谷喜一郎	臨床薬理に基 づく医薬品開 発戦略	廣川書店	東京	2006	15-36
徳永勝士	遺伝子・ゲノム多型 解析法の進展.	永井良三（ 監）徳永勝 士、山崎力 、大木秀一 （編）	臨床ゲノム科 学入門	杏林図書	東京	2007	208-220

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirano, M., Maeda , K., Shitara, Y. a nd Sugiyama, Y	Drug-drug interaction bet ween pitavastatin and va rious drugs via OATP1B 1.	Drug Metab D ispos	34	1229-36	2006
Ishiguro, N., Maed a, K., Kishimoto, W., Saito, A., Har ada, A., Ebner, T., Roth, W., Igarash i, T. and Sugiyam a, Y.	Predominant contribution of OATP1B3 to the he patic uptake of telmisarta n, an angiotensin II rece ptor antagonist, in huma ns.	Drug Metab D ispos	34	1109-15	2006
Mita, S., Suzuki, H., Akita, H., Hay ashi, H., Onuki, R ., Hofmann, A.F. and Sugiyama, Y.	Inhibition of bile acid tr ansport across Na ⁺ /tauro cholate cotransporting po lypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB11)-coexpressing L LC-PK1 cells by cholest asis-inducing drugs	Drug Metab D ispos	34	1575-81	2006
Yamashiro, W., M aeda, K., Hirouchi, M., Adachi, Y., Hu, Z. and Sugiya ma, Y	Involvement of transporte rs in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective ant agonist of the antiotensin II AT1-receptor, in hu mans.	Drug Metab D ispos	34	1247-54	2006

Kikuchi R., Kusuhara H., Hattori N., Shiota K., Kim I., Gonzalez F.J. and Sugiyama Y	Regulation of the Expression of Human Organic Anion Transporter 3 by Hepatocyte Nuclear Factor 1 α /beta and DNA Methylation.	Mol Pharmacol	70	887-96	2006
Enokizono J., Kusuhara H. and Sugiyama Y.	Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the biliary excretion and intestinal efflux of troglitazone sulfate, the major metabolite of troglitazone with a cholestatic effect.	Drug Metab Dispos.	35	209-14	2007
Shitara, Y., Horie, T. and Sugiyama, Y	Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution.	Eur J Pharm Sci	27	425-446	2006
Shitara, Y. and Sugiyama, Y.	Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions	Pharmacol Ther	112	71-105	2006
Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Jeiri I.	Human organic anion transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin	J Hum Genet	52	117-22	2007
Takane H, Miyama M, Burioka N, Shigemasa C, Shimizu E, Otsubo K, Jeiri I	Pharmacogenetic determinants of variability in lipid-lowering response to pravastatin therapy	J Hum Genet	51	822-6	2006
Jeiri I, Takane H, Hirota T, Otsubo K, Higuchi S.	Genetic polymorphisms of drug transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy	Expert Opin Drug Metab Toxicol	2	651-74	2006
Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, and Tokunaga K	Further development of multiplex SNP typing method, DigiTag2 assay.	Anal. Biochem.		In press	2007

IV. 研究成果の刊行物・別刷

2

前臨床から臨床試験 へのブリッジング

杉山 雄一 (東京大学大学院薬学系研究科医薬品評価科学講座/
分子薬物動態学教室教授)

前田 和哉 (東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室助手)

はじめに

近年、リード化合物の発見およびリード化合物の最適化のための combinatorial chemistry (CC) と high throughput screening (HTS) の手法の急速な発展により、新薬創製のプロセスが大きく変化している。基礎薬科学の発展を支柱として、21世紀の創薬は、最初に分子標的を決め、それによくフィットする薬をできるだけ短時間で選択し開発するという、より strategic なものになっていくことは間違いない。また、薬物の反応性(効果, 副作用)と患者の遺伝的背景の関連性が解明され始めているが、その関連が明確にされたものは、まだごく一部にすぎない。薬理遺伝学試験が臨床試験に与える大きな影響の一つとしては、他の章に詳細に述べられているように、上市薬剤の国際的承認のスピードアップがあげられる。人種による遺伝子変異の頻度差を考慮して、薬剤が遺伝子変異による機能・発現変化を受けにくい酵素により代謝、輸送されることを示した、酵素・トランスポーターのマッピングデータは、各集団における試験規模を縮小する合理的な理由になる。これら遺伝子多型に関する情報の必要性は、代謝酵素・トランスポーターのみならず、さらには薬効、副作用のターゲットになる各種タンパクについてもいえることであり、これら情報が十分に集まれば、医薬品開発に必要な膨大な動物実験と、繰り返し行われる臨床試験の規模・数を大幅に減らすことができるようになるものと期待される。このような背景の下、ヒトにおける薬剤反応性(薬効, 副作用)の予測は、医薬品開発の迅速化と効率の上昇にとって不可欠の事柄である。この予測を可能にするためには、薬物の血中濃度推移の予測、ターゲット部位における濃度推移、暴露量の予測が必要になることは論を待たない(図 2-1)。本章においては、ヒト組織、遺伝子発現系を用いて代謝酵素活性、トランスポート活性を測定することにより、動態特性の至適化、副作用の軽減が可能になった実例を我々の研究を中心に紹介しながら、前臨床試験と臨床試験のブリッジングの方法について議論したい。

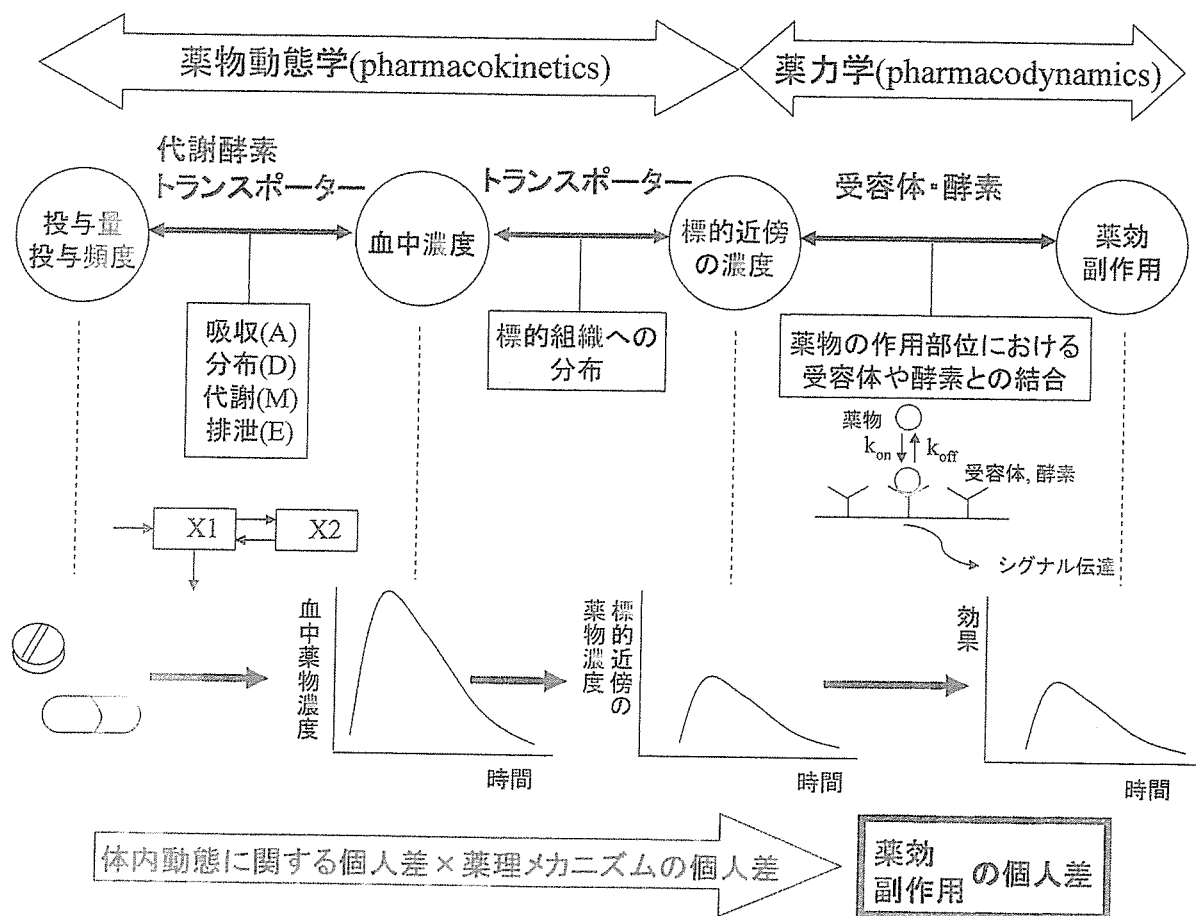


図 2-1 薬物の効果・副作用の個人差を決定付ける要因

(文献 11) より改変して引用

薬物動態領域においては、近年の進歩により、吸収 (A)、分布 (D)、代謝 (M)、排泄 (E) の個々の特性のスクリーニング系が確立されつつある。今後必要とされることは、これら複数の動態特性の情報から薬効・副作用組織における薬物暴露を予測する方法論、さらには、これら薬物動態の情報を、薬効・副作用分子をターゲットに行った薬理スクリーニングの情報と統合するための方法論の開発である。例えば、ADME の各特性をそれぞれのスクリーニング系で測定し、既に測定されている薬効・副作用分子に対するスクリーニングから得られた特性値の情報と合わせて、臨床試験にあげる候補品を選択する時に、すべての特性値において最も優れた化合物はほとんど考えられないため、何らかの選択法が必要となるが、残念ながら現状は、この選択の過程が非科学的であるといわざるを得ない。最優先されるべき薬を科学的に選択するには、pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) モデルをもとに、定量的な考察をすることが不可欠となる^{1, 2)} (図 2-2)。こうした方法論に将来、化合物の化学構造から ADME の個々の特性を予測する *in silico* (virtual) screening の手法が連結されるものと予想している。膨大な数の化合物ライブラリーの中から HTS の手法で薬効・動態特性の優れた化合物を選んできた過程は、欧米の Big Pharma にとっても、経済的に楽なことではなく、*in silico* screening の手法を併用しながら、明らかに動態特性が悪いと予測される化合物は、あらかじめライブラリーの中から除いておく、いわゆる “Value-added library” の充実が期待される³⁾。このように精選されたライブラ

現状分析: 個々の段階では動態特性を評価する方法論の急速な進歩がある。

- * 消化管吸収: Caco-2細胞 + トランスポーターおよびCYP3A4発現系
- * 代謝: ヒト肝ミクロソーム、ヒト肝細胞 (Cryopreserved、Fresh)、代謝酵素発現系
- * 輸送 (肝、腎でのクリアランスに関わるもの):
ヒト肝、腎組織の利用
ヒトトランスポーター発現系の利用 (double transfectant)
—— どの程度の種類が必要か?
—— 特異的阻害剤の探索
- * トランスポーターのSNPsの探索: 探索段階で個人差を避ける
- * 相互作用の回避の為の方法論: 探索段階 (HTS)

動態情報を薬効特性、毒性特性のHTSデータと統合化させ半定量化する為の方法論の確立の必要性 (QIDSM)

図 2-2 動態特性の評価法の進歩とこれからの方向性

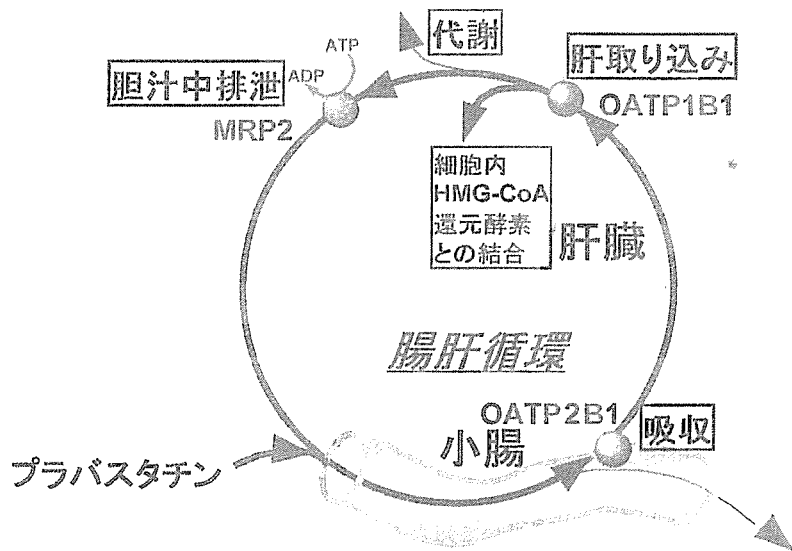


図 2-3 プラバスタチンの腸肝循環に関わるトランスポーター群

リーの中から、精度のよい動態スクリーニング法で、真に動態特性の優れた化合物を選択してることが必要とされる。私がよく出す例として、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるプラバスタチンがある。本薬剤は、肝臓でのコレステロール合成阻害活性が薬効に関わっている。この薬は、経口投与された後の薬物動態、すなわち消化管吸収、肝臓への取り込み、肝臓から胆汁中への排泄のいずれの過程にもトランスポーターが関与することが明らかになっている。そのため効率のよい腸肝循環が生じており、薬物を標的組織である肝臓にとどめ効果の上昇を狙うとともに、循環血中への出現を最小化し、副作用の軽減を実現している (図 2-3)。このように一つの化合物を複数のトランスポーターに認識させることにより、吸収・分布・排泄のそれぞれの過程において、理想的な動態特性を付与することも可能と考えられる。プラバスタチンのこうした特性は開

発後に明らかにされたものであるが、今後は探索段階から strategic に優れた動態特性をもつ薬の創製を目指すことが望まれる。そのことによりブロックバスターを世に出すことも夢ではないと考えている。

2-1

創薬の探索過程における薬物動態研究

2-1-1 *in vitro* 実験からヒト *in vivo* 薬物動態の予測とその妥当性評価

薬物代謝の領域においては、代謝安定性の試験法、相互作用の試験法ともにほぼ確立してきたといえる⁴⁾。一方で、近年、トランスポーター研究の急速な進展に伴い、薬効・副作用を規定する要因としてのトランスポーターの重要性が認識されており、薬理学の教科書“Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics”の第11版から、トランスポーターに関する独立した1章が新たに設けられた⁵⁾。しかしながら、吸収特性、肝臓・腎臓・脳への移行特性のスクリーニングについては、未だ十分ではない。例えば、吸収特性の評価スクリーニング系として汎用されているCaco-2細胞は、トランスポーターを介した吸収の評価には十分ではなく、今後種々の工夫が必要である。凍結ヒト肝細胞、ヒト腎スライス、また各種トランスポーターの発現系を用いたヒトにおける薬物動態の予測法を確立させていくためには、*in vitro* 実験から得られた予測値が、ヒト *in vivo* の特性値と近いことを validate することが必要になるが、この validation が最も困難であると感じている。ヒト肝における薬物代謝能力については、各種 cytochrome P450 (CYP) enzyme に対する適切な probe drug を用いて血中、尿中における親化合物、代謝物を測定し、pharmacokinetic 解析を行うことで、肝代謝能力を推定することが可能である。事実、適切な probe drug を混ぜたいわゆるカクテルをヒトに投与した後に、それらを分離定量して CYP の 5～7 種類の isoform の活性を同時に評価する方法が既に確立されている^{6～8)}。

ヒト CYP により代謝を受ける化合物について、*in vitro* (細胞、オルガネラ) で代謝初速度を測定し、適切な数学モデルを用いて *in vivo* における代謝クリアランスを予測することに成功している。例えば、YM796 をラット・イヌ・ヒトに投与すると、ラットにおいてのみ、肝初回通過代謝に起因する非線形動態が観察される。そこで、*in vitro* 実験から得られた飽和性のパラメータを用いて、非線形代謝を考慮した dispersion model に基づいたシミュレーションを行ったところ、すべての動物種において投与量依存的な AUC の変化を予測することに成功した⁹⁾ (図 2-4)。

薬物代謝における薬物間相互作用についても、*in vitro* 試験で得られるパラメータをもとに数学モデルに基づいて *in vivo* での相互作用を定量的に予測することが可能になっている。例えば、単純な競合・非競合阻害の場合には、図 2-5 に示す式から、阻害剤併用時の AUC の上昇率を計算することが可能である。この計算の際に、蛋白非結合型の循環血中薬物濃度の見積もりが問題となるが、これについては数学モデルによる考察より、false negative を避けるための最大濃度

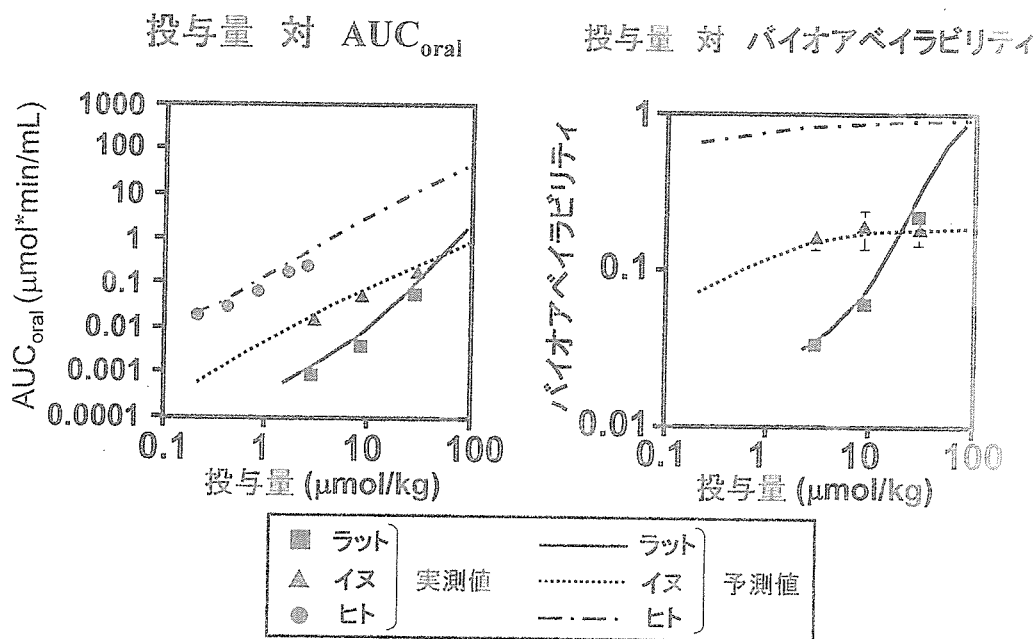


図 2-4 ラット，イヌ，ヒトにおける YM796 の *in vitro* 代謝実験データからの AUC_{oral} およびバイオアベイラビリティの予測
 プロットは，*in vivo* において得られた実測値，線は，*in vitro* 実験の結果から，代謝飽和を考慮した dispersion model に従い予測された値を示す。
 (文献 9) より改変して引用)

競合阻害

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{I_u}{K_i}\right) + S}$$

非競合阻害

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{\left(1 + \frac{I_u}{K_i}\right) (K_m + S)}$$

$$R \equiv \frac{AUC(\text{inhibitor})}{AUC(\text{control})} = 1 + \frac{I_u}{K_i}$$

K_i : 阻害定数
 I_u : 酵素近傍の阻害剤の非結合同型濃度

平成 13 年 6 月 4 日医薬審発第 813 号
 薬物相互作用の検討法について

$$I_{in, max, u} = I_{max, u} + \frac{f_u \cdot F_a \cdot k_a \cdot Dose}{Q_h}$$

$I_{max, u}$: 非結合同型循環血中最高濃度
 $I_{in, max, u}$: 非結合同型肝臓入り口の血中最高濃度

図 2-5 薬物間相互作用の予測法

の見積もり法について提唱しており，その計算法は厚生労働省のガイドラインにも採用されている^{10, 11)} (図 2-5)．また，薬害事件として社会問題にまでなったソリブジンと 5-fluorouracil (5-FU) との相互作用は，ソリブジンの代謝物である (E)-5-(2-bromovinyl) uracil (BVU) が，5-FU の代謝律速酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) で代謝された後に，不可

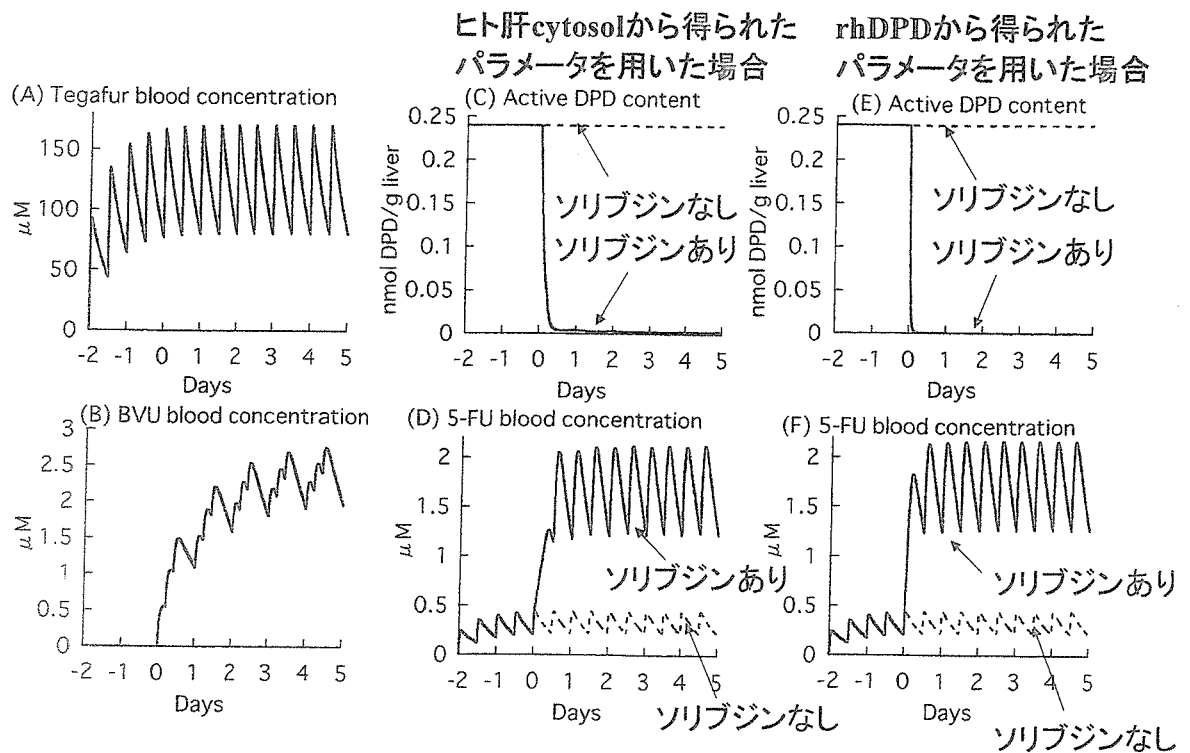


図 2-6 Mechanism-based inhibition のシミュレーション—5-FU vs ソリブジン—

(A) は、テガフルの血中濃度、(B) は、BVU の血中濃度の予測値を示す。

(C, E) は、肝臓内での活性を有する DPD 酵素量を、(D, F) は、5-FU の血中濃度推移を、day 0 でソリブジン投与の有無について示す。(C, D) は、*in vitro* 実験にヒト肝 cytosol を用いた時のパラメータからの予測値、(E, F) は、リコンビナントヒト DPD を用いた時の予測値を示す。(文献 12) より改変して引用)

逆的に DPD に共有結合して不活化する、いわゆる mechanism-based inhibition によるものであることがわかっている。そこで、5-FU, BVU の体内動態を記述する数学モデルを構築し、DPD の発現系を用いた *in vitro* 代謝試験の結果から酵素の分解を考慮したシミュレーションを行い、ソリブジンの併用で DPD が失活し、それに伴って 5-FU の血中濃度が大きく上昇することを予測することに成功した¹²⁾ (図 2-6)。

一方、個々のトランスポーターについて、ヒト *in vivo* での輸送能力を評価する方法は、現時点では確立されていない。例えば、肝におけるトランスポーター能力の評価のためには、まずは適切な probe drug, すなわち、あるトランスポーターにより特異的に輸送され、それが血中動態に影響を与えるような薬物の探索が必須である。後述するように、血中から肝臓へのアニオン性薬物の取り込みに関わるトランスポーター organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (OATP-C/OATP2) の輸送能力がその血中濃度に反映される probe drug として、プラバスタチンを挙げるができる。しかし、容積の小さい標的臓器に存在する脳でのトランスポーターのように血中動態への影響が小さいもの場合には、その薬効を測定するか、あるいは positron emission tomography (PET) などの手法を用いて脳移行を評価するなど、さらなる工夫が必要となる。国外では、既に PET を用いた創薬がスタートしており、今後、国内においても医薬品開発の過程に PET などのイメージング手法をより多く取り入れるべきである。

2-1-2 *in vitro/in vivo* 動物実験を併用した、より精度の高いヒト *in vivo* 動態予測

代謝酵素・トランスポーターには、その種類や発現量において大きな種差がみられるケースがある。その際に、*in vivo* 動物実験の結果から直接ヒト *in vivo* の薬物動態へ外挿することには無理がある。一方で、上記で議論したように、ヒト *in vivo* における予測結果の validation は、得られるパラメータに限界があり、特にトランスポーターについては未だ困難な現状がある。これらの問題を克服する手段として最適な方法は、単なる動物からヒトへの外挿、*in vitro* から *in vivo* への外挿ではなく、その両者を組み合わせることにより、ヒト *in vivo* への外挿効率を上昇させることである (図 2-7)。すなわち、複数の実験動物 (例えば、ラットとサル) を用い、*in vitro*, *in vivo* の動態試験を行い、両者を適切な数学モデルで連結する。このことで、それぞれの動物種におけるモデルの妥当性を検証したあとに、同一 (同系列) の化合物を用いて、ヒト組織、発現系などを用いた *in vitro* 試験を行い、同様の数学モデルによりヒト *in vivo* での薬物動態を予測するというアプローチである (図 2-7)。この場合、既に同系列のもので、ヒトでの *in vivo* データのあるものをコントロール化合物として入れておけば、予測精度がさらに上昇することが期待される。この考え方は対象が代謝酵素であれ、トランスポーターであれ、同一である。

ここで一例を挙げる。H₂-blocker であるファモチジンはプロベネシドとの併用により血中濃度の上昇が臨床で観察されており、そのメカニズムは腎分泌過程の阻害であることが知られている。しかしながら、この相互作用はラットでは再現することができない (図 2-8)。また、ヒトにおけるこの相互作用は、同系統薬であるシメチジンではほとんど生じない。この相互作用のメカニズムを解明するために、ヒト・ラット・サルの各種トランスポーターの発現系での輸送実験、*in vivo* 動物実験を行い、ファモチジンは、ヒト腎臓では organic anion transporter (OAT) 3 により認識されて尿細管分泌を受け、その輸送をプロベネシドが阻害すること、一方、シメチジンにおいては、主に organic cation transporter (OCT) 2 により認識され分泌されるために、プロ

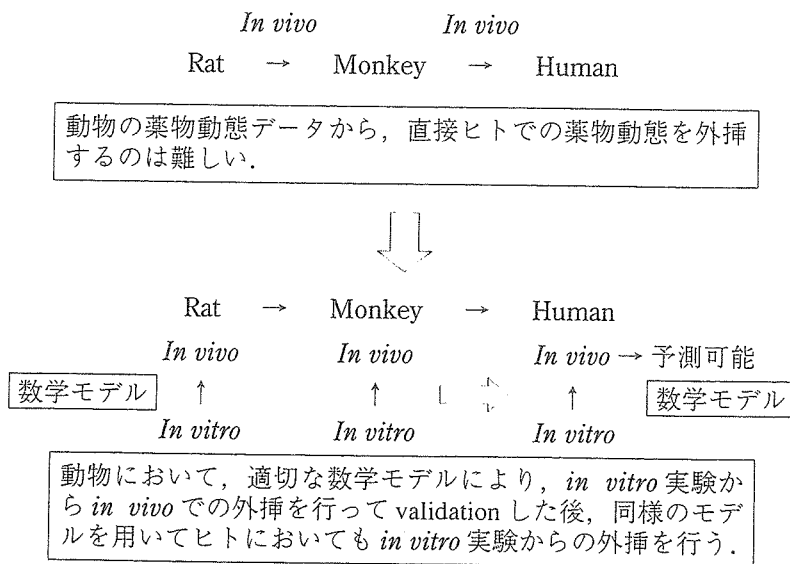
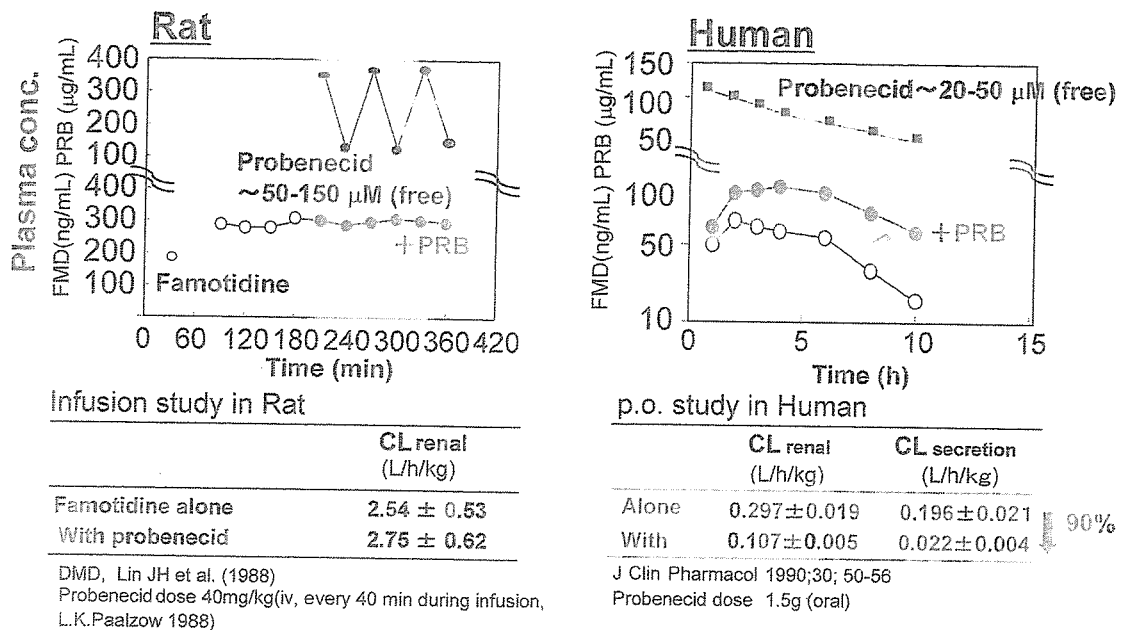


図 2-7 動物実験、*in vitro* 実験の結果をヒト *in vivo* での予測につなげる戦略



ファモチジンとプロベネシドの相互作用に顕著な種差
ヒトでは腎クリアランスが低下したが、ラットでは変化なし

図 2-8 薬物間相互作用の種差：ファモチジン vs プロベネシド

プロベネシドの血漿中濃度は、ラットでの実験の方が高いにも関わらず、ヒトではプロベネシドによりファモチジンの血漿中濃度の上昇が見られるが、ラットではまったく見られていない。

ベネシドによる阻害がほとんど生じないことが明らかにされた¹³⁾ (図 2-9)。これら H₂-blocker は、中性の pH では正の電荷をもっているが、*in silico* による分子軌道計算の結果、分子内に負に偏った電荷の局在もみられるため、有機アニオントランスポーターに認識されたものと推測される¹⁴⁾。ラットでは、ファモチジン、シメチジンともに腎排泄に関わる主要なトランスポーターは Oct2 であるため、プロベネシドによる阻害をあまり受けないことが示された¹³⁾ (図 2-9)。また、サルのトランスポーターは、ヒトと同様の特性をもっており、この相互作用をサルでは *in vivo* で再現することができたのみならず、*in vitro* でトランスポーター発現系を用いて得られた阻害定数 (K_i 値) より *in vitro* データを定量的にも予測することができた¹⁵⁾。したがって、この相互作用解析は、サルを用いた *in vitro*, *in vivo* データ、そしてヒトでの *in vitro* データがあれば、ヒト臨床での相互作用を定量的に予測できることが示された良い例である。

2-1-3 肝腎振り分けの制御による薬物動態の最適化

薬物の副作用回避の戦略の一つとして、肝腎振り分けの制御が挙げられる。肝腎に発現するトランスポーターによる薬物の肝臓・腎臓への移行性および肝臓の酵素による代謝は、薬物の全身血中からの消失経路を規定する主要因となる。したがって、ある薬剤が投与される患者群に腎疾患患者の多いことが明らかな場合、腎消失型の薬物を設計することは、患者の病態の程度による体内動態の個人差を生む結果となり、副作用発現の面から使いにくい医薬品となる。トランスポーターをうまく利用することにより、肝臓による代謝・排泄と腎排泄とをほぼ同等に受

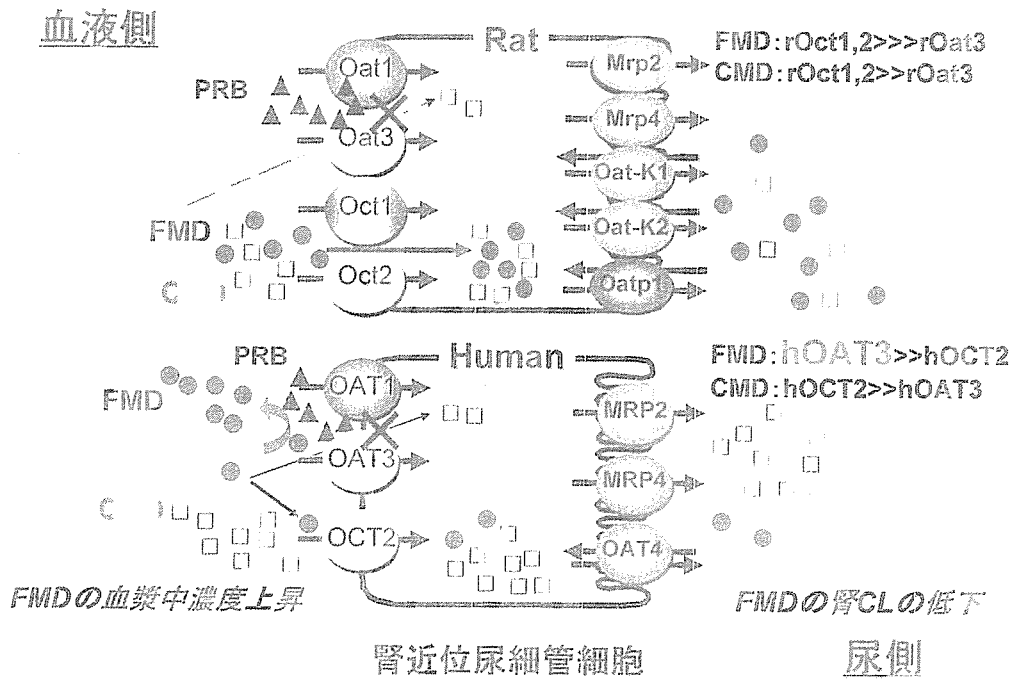


図 2-9 薬物間相互作用の種差を生み出すメカニズム：ファモチジン vs プロベネシド
 CMD：シメチジン，FMD：ファモチジン，PRB：プロベネシド
 PRBは、ヒト OAT3/ラット Oat3 の機能を阻害する。ラットの場合、FMD、CMD はともに Oct2 により腎取り込みされることから、Oat3 の阻害の影響を受けず、相互作用は起こりにくい。一方で、ヒトの場合、CMD の腎取り込みには OCT2 の寄与が大きいですが、FMD は OAT3 の寄与が大きいことから、FMD は PRB による輸送阻害の影響を大きく受け、相互作用が起これらと考えられる。

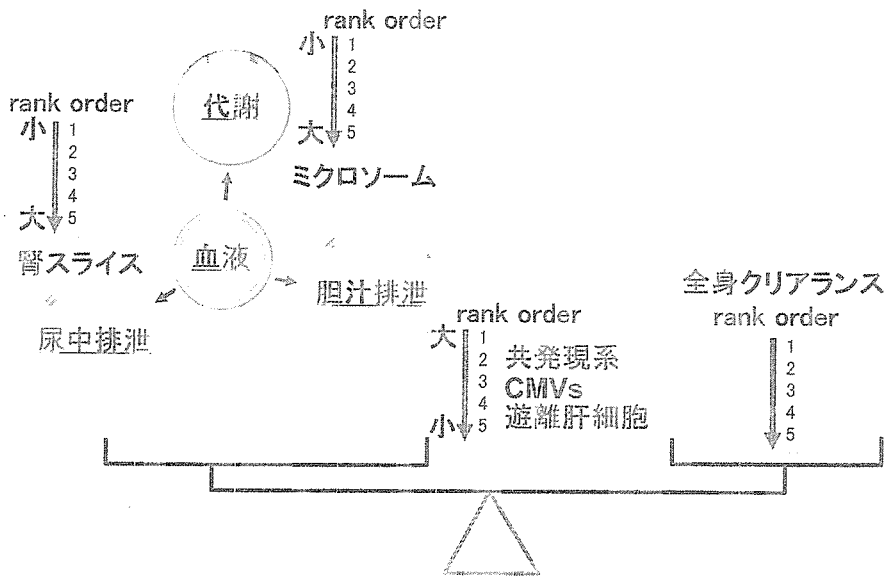


図 2-10 多クリアランス型医薬品の開発のための考え方

ける薬剤を開発することができれば、そのような個体差による変動は比較的小さなものになる(図 2-10)。肝臓や腎臓には、多様なトランスポーターが血管側、管腔側の双方の細胞膜に局在し、薬剤の排泄に働いている^{16, 17)}。このうち肝臓、腎臓どちらかに選択的に高く発現している

トランスポーターをターゲットとすれば、肝腎振り分けの制御が可能と考えられる (図 2-11). 例えば、血管側に面した (basolateral 側の) 有機アニオンを運ぶ OAT ファミリーのうち OAT1, OAT3 は腎臓に高い発現が認められる. また, OATP ファミリーは主に肝臓に発現している (ヒトでは, OATP1B1/OATP1B3). 一方, 有機カチオンを運ぶ OCT ファミリーでは, OCT1 は肝臓に, OCT2 は腎臓に高い発現が認められる (図 2-11). このようにヒトでの各トランスポーターの個々の臓器における発現レベル, 基質認識性が明らかになれば, 個々のトランスポーターに特異的に認識される分子をデザインすることにより肝腎の選択性を制御することが可能になるであろう. 肝腎選択的な排泄は血管側膜を介した取り込みのみでなく, 管腔側膜を介した排泄トランスポーターによっても支配される. この典型的な例が, アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬テモカプリルである. 多くの ACE 阻害薬は主に尿中へ排泄されるが, テモカプリルは, 他の ACE 阻害薬と異なり, その活性体であるテモカプリラートが胆汁排泄を介して糞中にも尿中と同程度に排泄される. このため腎障害患者に投与したときの体内動態の変動が他剤と比較して少なく, 臨床において使いやすい薬となっている (図 2-12). 胆汁排泄が良好に起こる原因と

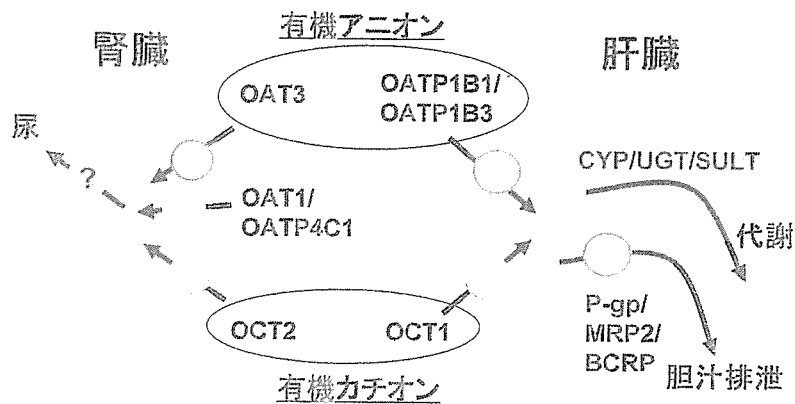


図 2-11 トランスポーターをターゲットとした肝腎振り分けの制御

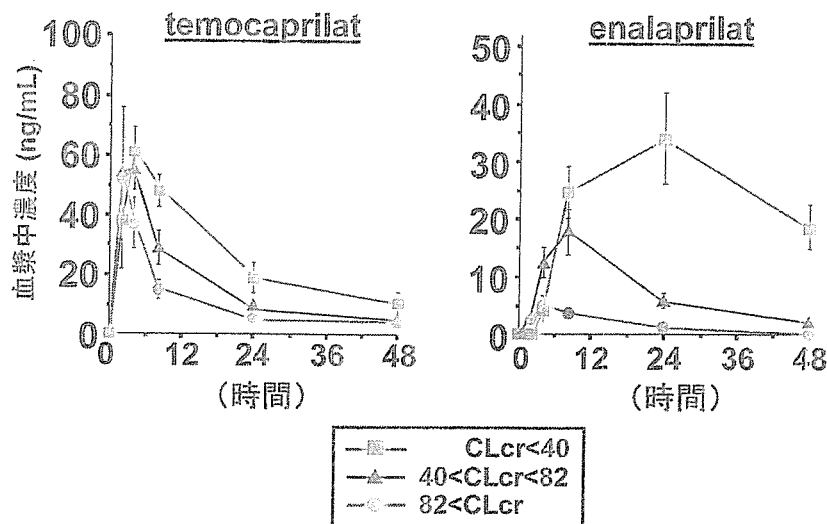


図 2-12 腎機能低下時における 2 種の ACE 阻害薬の活性代謝物 (enalaprilat, temocaprilat) の血中濃度推移の違い

CLcr : クレアチニンクリアランス——腎分泌機能の指標となり, 腎機能のマーカーとして汎用されている.

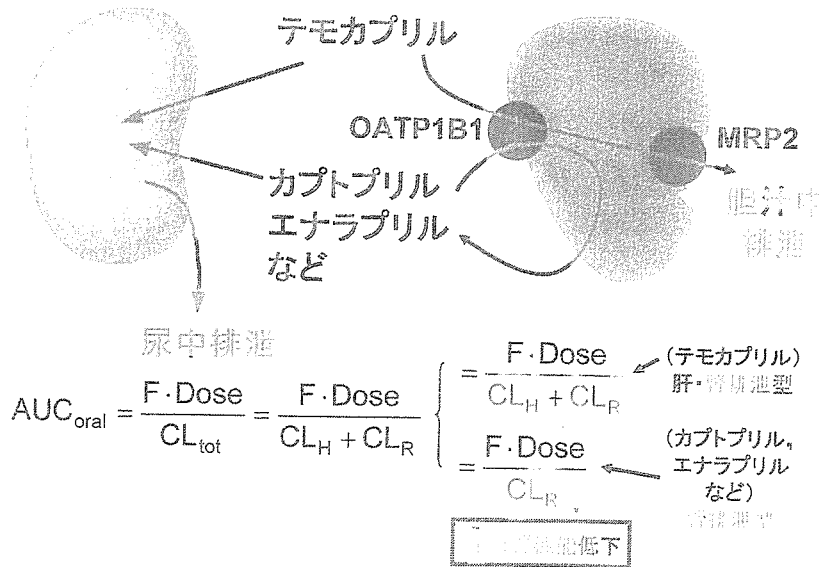


図 2-13 ACE 阻害薬の体内動態の違いを決めるメカニズム

テモカプリルは、肝臓の排泄側トランスポーターである MRP2 に認識されることから胆汁排泄されるが、他の ACE 阻害薬（カプトプリル，エナラプリルなど）は、MRP2 に認識されず、胆汁排泄されにくいことから、主に腎排泄されると考えられる。

して、 multidrug resistance associated protein (MRP) 2 の関与が明らかになっている。MRP2 は胆管側膜において種々有機アニオンを肝臓中から胆汁中へ排泄する¹⁷⁾。他の ACE 阻害薬は MRP2 の基質にならないのに対し、テモカプリルの活性代謝物テモカプリラートは MRP2 の基質になるため、排泄経路が異なると考えられる¹⁸⁾ (図 2-13)。今後、トランスポーターが動態を支配する薬物の実例が増えるにつれて、このような消失経路のバランスに着目する必要性が生じる例も増えてくるものと思われる。

2-1-4 トランスポーターによる経細胞輸送を評価するための新規 *in vitro* 実験系 —ダブルトランスフェクタント—

現在、私の研究室で取り組んでいる課題の一つに、MDCK II 細胞などのような極性を有する細胞株を用いて、血管側からの取り込みに関与するトランスポーター、細胞内からの排泄に関与するトランスポーターをそれぞれ basal 側（生理的には血管側に相当する）、apical 側（管腔側に相当する）の形質膜上に共発現させた細胞（ダブルトランスフェクタント）を多量に作製することがあげられる。こうした細胞を transwell のような多孔性フィルターでできた培養器材にコンフルエントの状態にて培養することで、apical から basal 側、basal から apical 側へのそれぞれの経細胞輸送を測定することができる。この輸送は、生理的には血中空間から胆汁中、尿中への排泄に相当すると考えられる。この目的を進めていくための第 1 ステップとして、最近、有機アニオン性化合物の胆汁排泄能力を評価するために、MDCK II 細胞の basal 側に OATP1B1、apical 側に MRP2 を同時に発現させた、いわゆるダブルトランスフェクタントを作製した¹⁹⁾ (図 2-14)。ラットに対応する Oatp4/Mrp2 ダブルトランスフェクタントも作製しており、ダブルトランスフ

エクタントにおける *in vitro* 経細胞輸送クリアランスと *in vivo* 胆汁排泄クリアランスの間には、良好な相関が成り立つことを実証している²⁰⁾。これらの細胞系を用いて *in vitro* で経細胞輸送を評価することにより、ヒトにおける血中から胆汁中への薬物移行の評価をすることが可能であると考えている。さらに現在では、OATP1B1/multidrug resistance (MDR)1, OATP1B1/breast cancer resistance protein (BCRP) ダブルトランスフェクタントも作製し、ヒト肝臓胆管側膜における排出トランスポーターの寄与率を評価するための方法論の構築へ向けて検討を進めている²¹⁾ (図 2-14)。図 2-15 には HMG-CoA 還元酵素阻害薬 pitavastatin の経細胞輸送を観察した実験例を示すが、本薬剤はヒト MRP2, MDR1, BCRP のすべてに認識される。一方で、Bcrp ノックアウトマウスにおいて、pitavastatin の胆汁排泄はほぼ完全に消失することから、マウスでは、Bcrp が最も重要な胆汁排泄トランスポーターであり、寄与には種差があることが示唆される²²⁾。より定量的な評価をするためには、ヒト肝臓における OATP1B1, MDR1/MRP2/BCRP の各発現量と、ダブルトランスフェクタントの相対的な発現量の違いを、数学モデルに基づいて補正することが必要になる (図 2-14)。

今後、創薬におけるトランスポーターのスクリーニング系としては、2ステップの方法を提唱している^{1, 2)}。第1ステップ (未だ候補化合物の数の多い段階) としては、単一遺伝子の発現系を用いて、通常 CYP で行われているのと同様の方法で、基質のなりやすさ、薬物間相互作用の程度を評価する。対象のトランスポーターとしては、20 種類程度を考えている。この第1ステ

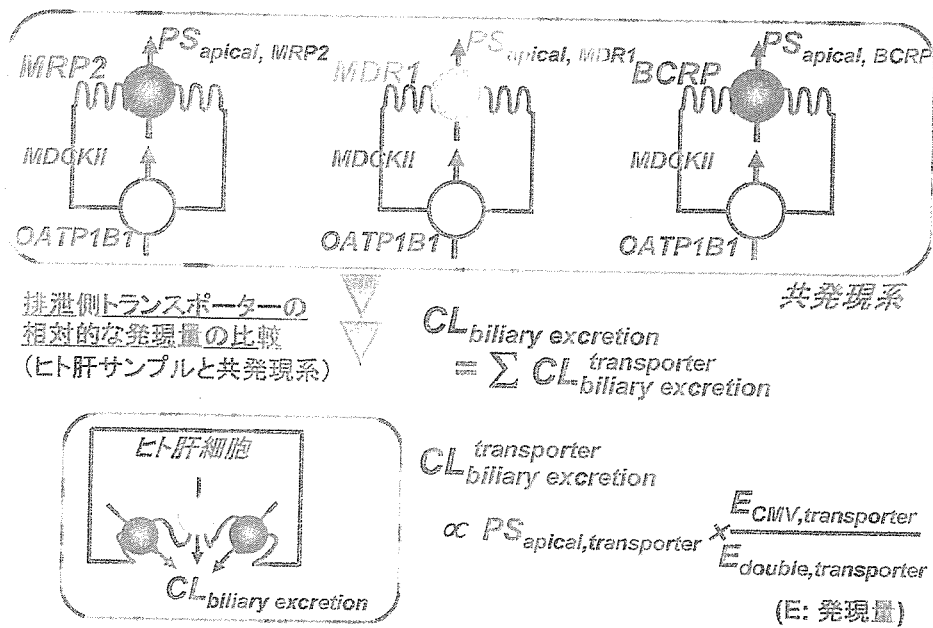


図 2-14 ダブルトランスフェクタントを用いた胆汁排泄に関与するトランスポーターの寄与の定量的な解析

ダブルトランスフェクタントにおける細胞内濃度基準の排出クリアランスと、ダブルトランスフェクタントとヒト肝サンプルとの間の相対的な発現量比を乗じることで、ヒト肝臓における胆汁排泄に関わる各トランスポーターの定量的な寄与を見積もることができると考えられる。

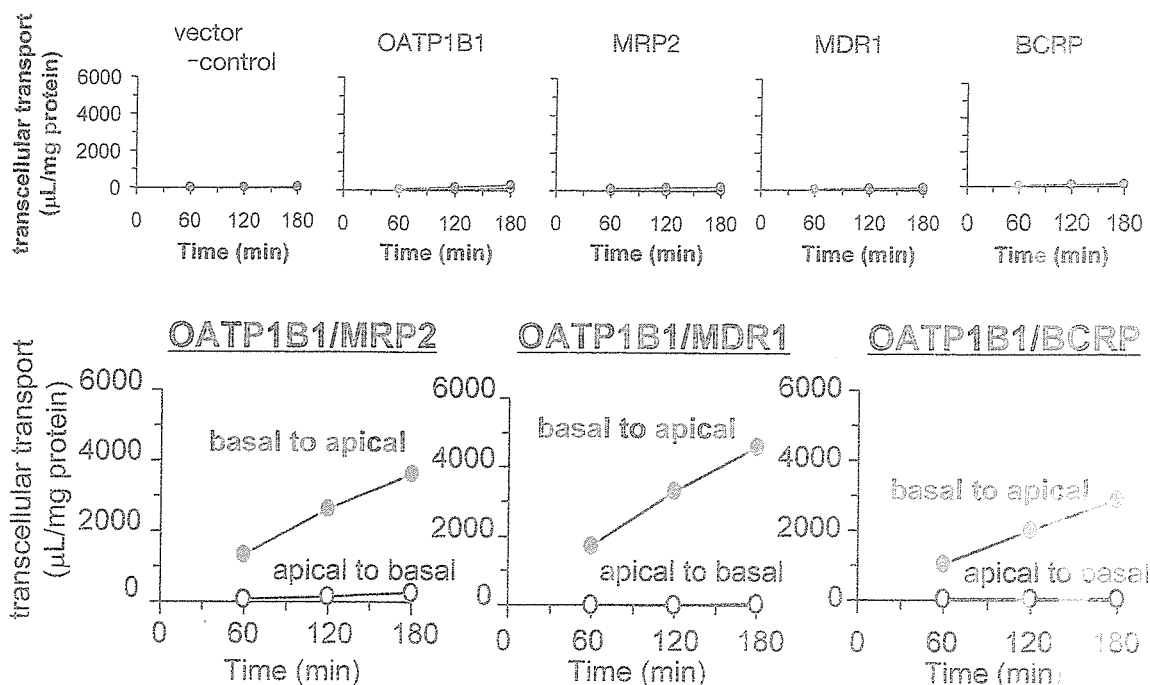


図 2-15 pitavastatin の各種ダブルトランスフェクタントにおける経細胞輸送

ップにおいて、薬物の輸送に関与するトランスポーター個々の寄与率を推定することが必要になるが、そのためにはそれぞれの特異的阻害剤を発見することが必要となる。化合物の数がある程度絞られてきて、数十程度になった段階で、第2ステップとしてダブルトランスフェクタントの利用が有効であろう。今後、15種類程度の組み合わせのダブルトランスフェクタントを作製することにより、肝臓・腎臓・小腸・血液脳関門・血液脳脊髄液関門における有機アニオンおよび有機カチオンの経細胞輸送を評価できる系が確立されるようになることが望まれ、我々の研究室ではこの目的に向けた研究を展開している。

2-2

トランスポーターの関わる薬物間相互作用、遺伝子多型

トランスポーターを介した薬物間相互作用、遺伝子多型の影響は、代謝酵素の場合ほど臨床上問題となっている例が今のところ少ないが、今後ますます増加してくる可能性がある。例えば、P-糖タンパク（消化管吸収（排出）、中枢移行、胆汁・尿中排泄）、OATP1B1（肝取り込み）、MRP2（胆汁排泄）、OAT1・OAT3（腎取り込み）、OCT1（肝取り込み）、OCT2（腎取り込み）、PEPT1（消化管吸収）、BCRP（消化管吸収（排出）、胆汁排泄、中枢移行）などが挙げられる。トランスポーターを介した相互作用は、しばしば血管側膜と管腔側膜の両膜透過過程に関わる2種の異なるトランスポーター上（例えばOATP1B1/MRP2）で同時に生じることがあり解析を複雑にしている。しかし、このような複雑な場合についても、*in vitro* 試験の阻害の程度から、*in vivo* での薬物動態変動を定量的に予測することが可能であることを示している²³⁾。

セリバスタチン (CER) と gemfibrozil および cyclosporin A との相互作用により米国で10名

以上の死亡者が出たことが報告された。現に、CERは相互作用による致死的な副作用のため、市場より撤退を余儀なくされた。いずれの場合においても、併用投与時にCERの血中濃度が大きく上昇することが示されている(図2-16)。この機構について、*in vitro* 発現系を中心にした解析より以下の結果を得ている。すなわち、CERとcyclosporin Aとの相互作用は、OATP1B1を介したCERの肝取り込み過程の阻害であること²⁴⁾(図2-17)、また、gemfibrozilとの相互作用

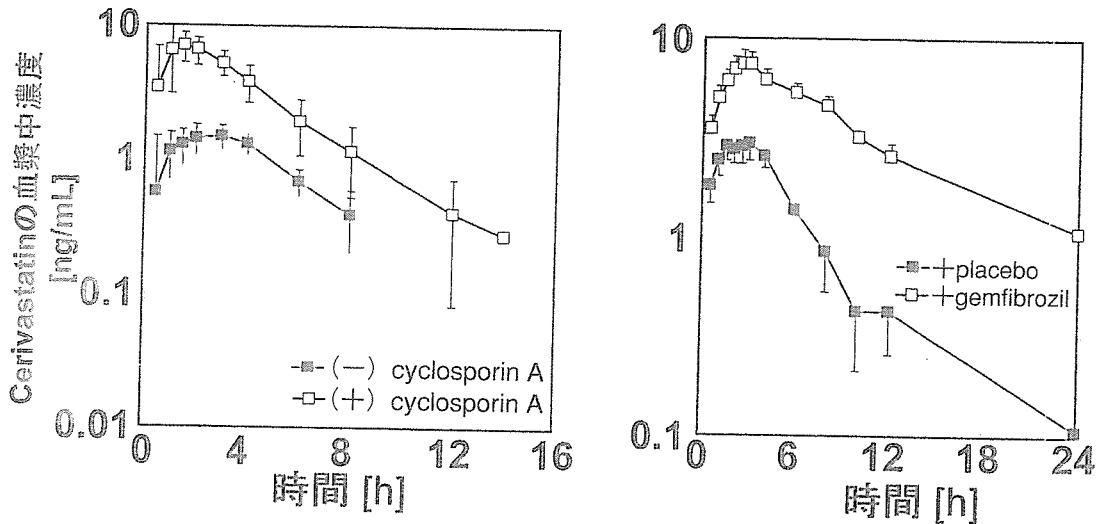


図2-16 cyclosporin A および gemfibrozil と併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度の変化

Mück W et al. (1999) *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 251-61

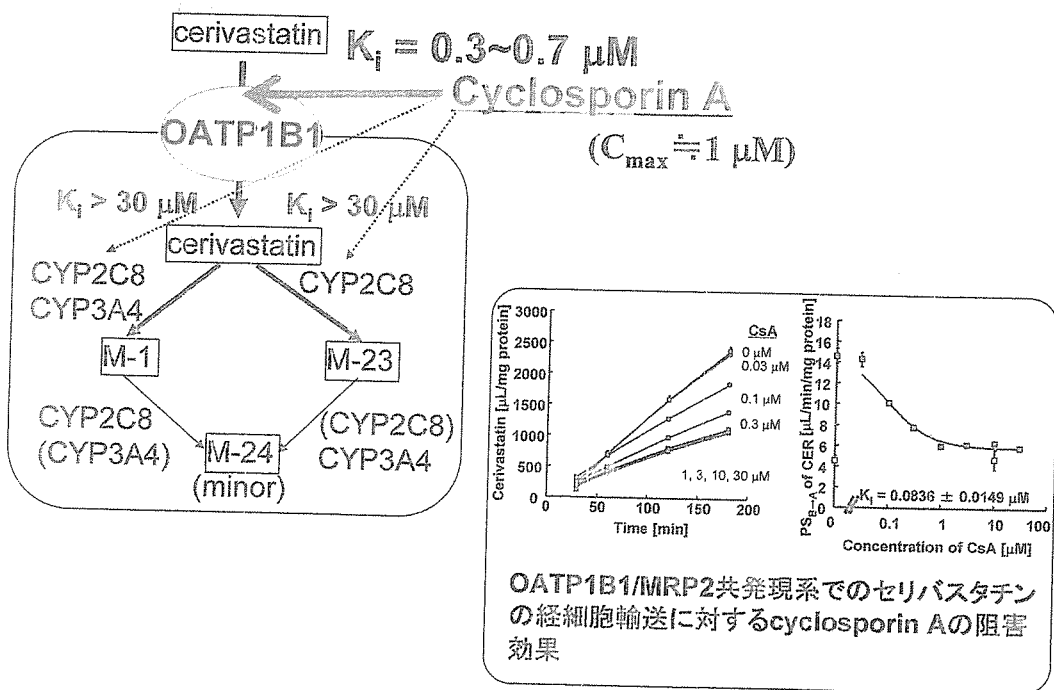


図2-17 cyclosporin A を併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度上昇のメカニズム
左: cyclosporin AはOATP1B1を介したCERの輸送を低濃度で強力に阻害する一方、CYP2C8に対する阻害は弱いことから、OATP1B1によるCERの取り込み阻害が主要な相互作用メカニズムと考えられる。

右: OATP1B1/MRP2ダブルトランスフェクタントを用いたCERの経細胞輸送に対して、cyclosporin Aは濃度依存的に阻害をかける。

用は、そのグルクロン酸抱合体が肝内で濃縮的に存在し、それが CYP2C8 による CER の代謝を阻害することが主要機構であり、肝取り込み過程の阻害も一部関与することを明らかにした²⁵⁾ (図 2-18)。この *in vitro* 発現系を用いて得られた結果は、種々の臨床データを支持するものである。トランスポーターの遺伝子多型解析も非常に急ピッチで進められている。我々の研究室では、

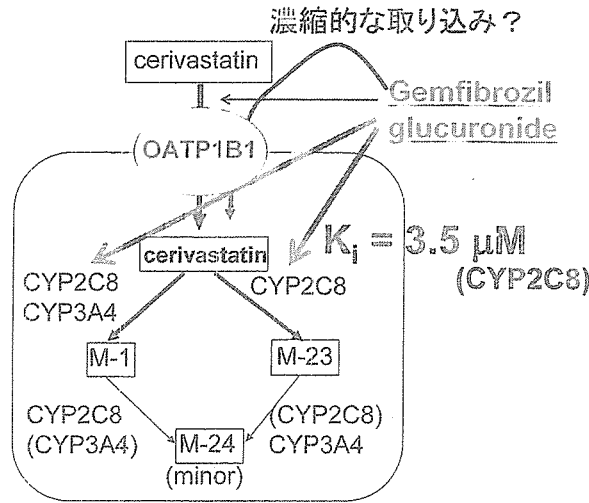
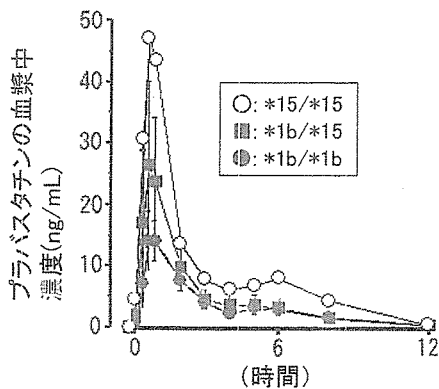


図 2-18 gemfibrozil を併用投与した時のセリバスタチンの血漿中濃度上昇のメカニズム gemfibrozil のグルクロン酸抱合体が、肝臓内で濃縮されることで、CYP2C8 を介した CER の代謝を阻害することが主なメカニズムであり、さらに OATP1B1 を介した取り込みにも一部影響を与えるものと考えられている。

OATP1B1 SNPs のハプロタイプ

OATP1B1 SNP	130	174	アレル頻度 (日本人)
OATP1B1 *1a	N	V	(32.5%)
OATP1B1 *1b	D	V	(45.8%)
OATP1B1 *5	N	A	(0.0%)
OATP1B1 *15	D	A	(15.0%)

プラバスタチン(10 mg)経口投与後の血中濃度に与える OATP1B1*15 の影響



プラバスタチンの薬物速度論パラメータ

OATP1B1 のハプロタイプ	N	腎外クリアランス (L/kg/hr)	-AUC (ng*hr/ml)
*1a/*1a	2	2.22	60.5
*1a/*1b	4	1.45 ± 0.72	47.2 ± 27.4
*1b/*1b	4	2.01 ± 0.42	44.2 ± 6.38
*1b/*15	9	1.11 ± 0.34	62.1 ± 21.8
*15/*15	1	0.28	111.8

図 2-19 OATP1B1 の遺伝子多型のハプロタイプとプラバスタチンの血中濃度との関連 OATP1B1 の遺伝子には、主に 2 か所の高頻度の多型が知られており、日本人の場合、特に両方を併せ持つ *15 アレルが存在する。プラバスタチン経口投与後の血中濃度において、*15 アレル保有者は、*1b 保有者と比較して有意に血中濃度が高い。(文献 26) より改変して引用)