

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）） 総括研究報告書

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

研究代表者 降幡 知巳

研究要旨

新薬の登場により肝炎の治療奏効率は近年飛躍的に向上している。しかし、未だ残り数十%の患者では十分な治療効果が得られず、またその要因は明らかとなっていない。本研究事業では、難治性肝炎の奏効率を向上させるため、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体（トランスポーター）の機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じ、平成25年度は肝取り込み輸送体を軸に、個別化治療発展に貢献しうる肝炎治療薬の肝内濃度規定因子の解明、肝取り込み輸送体薬理ゲノム学的解析の基盤となる遺伝子構造解析、治療効果や副作用発現と関連する肝炎治療薬の薬物間相互作用プロファイルの解明、肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明をおこなった。本報告書では、各項目の担当研究者より主に得られた成果について報告する。

研究分担者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究院
教授 千葉 寛

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
臨床医学研究所
教授 坪田 昭人

A . 研究目的

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込みトランスポーターの機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じて平成25年度は（1）肝炎治療薬の肝内濃度規定因子の解明、（2）肝取り込み輸送体薬理ゲノム学的解析のための基盤となる遺伝子構造解析、（3）治療効果や副作用発現と関連する肝炎治療薬の薬物間相互作用プロファイル解明、（4）肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と治療応答性の特徴解明をおこなった。上記のうち降幡が担当した（3）に該当する項目について、主な研究成果が得られたのでここに報告する。

慢性C型肝炎患者はしばしば他の薬剤を併用することがあることから、直接作用型C型肝炎治療薬（direct-acting antiviral agent, DAA）は併用薬との薬物間相互作用（drug-drug interaction,

DDI）に十分注意する必要があると考えられている。近年ではDAAによる有機アニオントランスポーター（organic anion transporting polypeptide, OATP）の機能阻害を介したDDIも着目されている。

OATP1B1および1B3は肝臓特異的に発現する薬物取り込みトランスポーターである。OATP1Bは内因性物質に加え幅広い薬物を基質とし、その体内動態を規定する因子として働くことが知られている。したがって、OATP1B機能阻害効果を有する薬物は、OATP1Bによる肝取り込みを主要消失経路とする薬物との間にDDIを生じる可能性が高いと考えられている。

そこで、本研究では第二世代DAAであるシメプレビル（SMV）、アスナプレビル（ASV）、ダクラタスビル（DCV）およびソフォスブビル（SFV）のOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスクを明らかにするため、これら薬剤のOATP1B機能阻害プロファイルを明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

試薬

テラプレビル（TLV）はShanghai Biochempartner（Shanghai, China）より購入した。SMV、ASV、DCVおよびSFVはそれぞれChemScene LLC（Monmouth Junction, NJ, USA）、AdooQ BioScience LLC（Irvine,

CA, USA)、ChemScene LLCおよびMedchemexpress LLC (Princeton, NJ, USA) より購入した。OATP1B機能阻害剤である rifampicin (RIF)、Bromosulphophthalein (BSP) およびCsAはそれぞれ和光純薬工業 (大阪)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) および東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。すべてのDAAIはdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

OATP1B complimentary DNA (cDNA) クローニングおよびOATP1B発現用プラスミドベクターの作製

OATP1B1発現用プラスミド (OATP1B1/pcDNA3.1 Zeo) は当研究室で以前に作製したものをを用いた。OATP1B3発現用プラスミド (OATP1B3/pcDNA3.1 Neo) についても当研究室で以前に作製したものをを用いた。OATP1B1発現ベクターにはpcDNA3.1(-) (Zeo または Neo)vector(Life technologies, Carlsbad, CA, USA) をそれぞれ用いた。

OATP1B1またはOATP1B3安定発現Human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞の樹立および細胞培養

ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞はHUMAN SCIENCE (東京) より入手し、Dulbecco 's modified Eagle 's medium (*In vitro*gen, Carlsbad, CA, USA) に、10% (v/v) 非働化fetal bovine serumおよび50 units/mL penicillin - 50 µg/mL streptomycinを加えた培地で培養した。

OATP1B1安定発現HEK293細胞 (OATP1B1/HEK293) および空ベクター導入HEK293細胞 (Mock Zeo/HEK293) は既報にしたがって樹立した。また、OATP1B3安定発現HEK293細胞 (OATP1B3/HEK293) および空ベクター導入HEK293細胞 (Mock Neo/HEK293) は、OATP1B3/pcDNA3.1 (-) Neoまたは pcDNA 3.1 (-) Neo vector を reverse transfection法により HEK293細胞に導入し、G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) で薬剤選択をおこなうことにより樹立した。また、細胞単一化はコロニーフォーメーション法によりおこなった。樹立したOATP1B1/HEK293およびMock Zeo/HEK293は上記培養培地にZeocin (*In vitro*gen, San Diego, CA, USA) を 300 µg/mLの濃度で添加して培養し、OATP1B3/HEK293 および Mock Neo/HEK293 は G418 disulfate salt (Sigma-Aldrich) を 400 µg/mLの濃度で添加して培養した。上記細胞は全て5% CO₂ / 95% airを気相とした37 °CのCO₂インキュベーターで培養した。

Total RNA抽出およびcDNA合成

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293 および Mock (ZeoまたはNeo)/HEK293のtotal RNA抽出はISOGEN with spin column (Nippon Gene, 東京) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。Total RNA中のゲノムDNAの混入の有無は、human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプロモーター領域を検出するプライマーを用いたPCR反応により確認した。ゲノムDNAの混入が認められた場合にはDNaseI処理により除去した。cDNA合成はtotal RNA (1.0 µg) を鋳型とし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてプロトコールにしたがいおこなった。

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記で調製したcDNAをテンプレートとし、PCR反応によりOATP1B1/HEK293におけるOATP1B1 mRNA、OATP1B3/HEK293におけるOATP1B3 mRNA、および両細胞におけるGAPDH mRNAの発現を解析した。

OATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293における基質取り込み活性解析

作製したOATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293における基質取り込み活性は既報の方法をもとに解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293または Mock/HEK293 を collagen type-I (Sigma-Aldrich) でコートした24-well plateにそれぞれ4.0 × 10⁵ cells/mLで播種し、24時間後に sodium butyrate (Sigma-Aldrich) を最終濃度10 mMで曝露し、その24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayにおけるOATP1B1の基質溶液としてNa⁺-plus Krebs-Hesselei buffer (Na⁺-KHB) に [³H]estradiol-17 β-glucuronide (E₂G) (1850 GBq/mmol) (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA) および非標識 E₂G (Sigma-Aldrich) を溶解し、既報にしたがい最終基質濃度0.1 µM、最終放射線濃度0.10 µCi/mLとした。OATP1B3の基質溶液としてNa⁺-plus KHBに [³H]cholecystokinin-octapeptide sulfated (CCK-8) (2960 GBq/mmol) (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA) および非標識CCK-8 (株式会社ペプチド研究所, 大阪) を溶解し、既報にしたがい最終基質濃度0.01 µM、最終放射線濃度0.25 µCi/mLとした。阻害実験では、OATP1B1またはOATP1B3に対する典型的阻害剤として、RIFまたはBSPをそれぞれ最終阻害剤濃度10 µMまたは100 µMとなるように加えた。

Transport assayでは、細胞を37 °CのNa⁺-plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200 μL/wellを加えて37 °Cで取り込み反応を開始した。E₂GおよびCCK-8の取り込み時間はそれぞれ予備検討において基質取り込み活性に線形性が認められた3分間および5分間とした。その後、細胞を氷冷したNa⁺-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% sodium dodecyl sulfateを加え細胞溶解液とした。細胞溶液中の放射活性は液体シンチレーションカウンター(LSC-6100, Aloka, 東京)にて測定した。また、タンパク質濃度はPierce® BCATM Protein Assay Kit (タカラバイオ、滋賀)を用いて測定した。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は式[1]を用いて算出した。

式[1]

$$[\text{取り込み活性 (pmol/ mg protein/ min)}] = \frac{[\text{放射能 (dpm)}] / [\text{基質溶液放射能 (dpm/nmol)}] \times [\text{採取量 (mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] \times [1000 \text{ (pmol/nmol)}] / [\text{タンパク濃度 (mg protein/mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] / [\text{取り込み時間 (min)}]}$$

DAAの共存下OATP1B機能阻害活性解析

Transport assayの阻害剤にはTLV (0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 20および100 μM)、SMV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0および10 μM)、ASV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 0.6, 1.0, 4.0および10 μM)、DCV (0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 40および100 μM) およびSFV (1.0, 2.0, 4.0, 10, 20, 40または100 μM)を用いた。コントロールとしてDAAの溶媒であるDMSOを最終濃度0.1%で細胞に曝露した。また、DAAのOATP1B1およびOATP1B3に対する50%阻害濃度 (IC₅₀, μM) は式[2]を用いて算出した。

式[2]

$$[\text{取り込み活性(\%)}] = [100 / (1 + I / IC_{50})]$$

ここで、取り込み活性値はそれぞれについてOATP1Bを介した基質取り込み活性値からMock/HEK293における基質取り込み活性値を減じた後、コントロールの基質取り込み活性値に対する相対値(%)を算出することにより得た。また、I (μM) はDAAの濃度を示す。

DAAの持続的OATP1B機能阻害活性解析 (濃度依存性解析)

DAA前処理による持続的OATP1B機能阻害活性の濃度依存性は既報の方法をもとに解析した。DAA

(0.1, 1.0または10 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37 °Cで培養した後、37 °CのNa⁺-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性はコントロールの取り込み活性の相対値(%)とした。本解析では持続的OATP1B機能阻害効果が認められているCsAを参照化合物として用いた。

DAAの持続的OATP1B機能阻害活性解析 (時間依存性解析)

DAA前処理による持続的OATP1B機能阻害活性の時間依存性は既報の方法をもとに解析した。DAA (1.0 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37 °Cで培養し、3に示す抗生物質不含の培養培地で一度リンスした後、再び同培養培地にて37 °Cで培養した。一定時間 (0, 1または3時間) 培養後、37 °CのNa⁺-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にて6-1と同様の方法でtransport assayをおこなった。取り込み活性値は各時間におけるコントロールの取り込み活性の相対値(%)とした。本解析では持続的OATP1B機能阻害効果が認められているCsA (1.0 μM) を参照化合物として用いた。

DAAの持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害効果に及ぼす影響の解析

DAAの持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害作用に及ぼす影響は、既報の方法をもとに解析した。DAA (0.1, 0.4または1.0 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa⁺-KHBで細胞を30分間、37 °Cで培養した後、37 °CのNa⁺-KHBで二回リンスし、DAA (0.1, 0.4 または1.0 μM) の存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性(%)はコントロールの取り込み活性の相対値とした。

R値の算出

OATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスク指標であるR値は既報にしたがい、式[3]により算出した。

式[3]

$$R = 1 + [(f_u \times I_{in,max}) / IC_{50}]$$

ここで、f_uは阻害剤のタンパク非結合分率を、I_{in,max} (μM) は肝細胞近傍における推定阻害剤最大濃度を示しており、既報にしたがい、式[4]より算出した。また、IC₅₀ (μM) は式[2]より算出した値を用

いた。

式[4]

$$I_{in,max} = I_{max} + [(F_a \times Dose \times K_a) / Q_h]$$

ここで、 I_{max} (μM) は阻害剤の最大血中濃度を、 F_a は消化管吸収率を、 $Dose$ (nmol) は臨床投与量をモル換算したものを、 K_a (min^{-1}) は最小胃内容排出時間を、 Q_h (mL/min) は肝血流量をそれぞれ示す。既報と同様に、 F_a は1、 K_a は 0.03 min^{-1} 、 Q_h は $1500 \text{ mL}/\text{min}$ とした。

統計解析

二群間における平均値の差の検定はStudent's t-testによりおこなった。統計計算にはExcel統計ソフトStatcel第3版(東京)を使用した。

倫理面への配慮

本研究におけるヒト由来試料の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

OATP1B mRNA発現解析

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293 または Mock/HEK293より調製したcDNAを用いて、OATP1B1、OATP1B3およびGAPDH mRNA発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP1B1/HEK293においてOATP1B1 mRNA発現が、OATP1B3/HEK293においてOATP1B3 mRNA発現がそれぞれ認められた。また、Mock/HEK293においてはOATP1B1およびOATP1B3 mRNA発現は認められなかった。いずれの細胞においてもGAPDH mRNA発現が認められた。

OATP1Bを介した基質取り込み活性解析

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293またはMock/HEK293におけるOATP1Bを介した基質取り込み活性を、OATP1B1、OATP1B3のそれぞれの典型的基質であるE2G ($0.1 \mu\text{M}$)、CCK-8 ($0.01 \mu\text{M}$) を用いて解析した。その結果、OATP1B1/HEK293およびMock Zeo/HEK293におけるE2G取り込み活性値はそれぞれ、 2.8 ± 0.48 、 $0.16 \pm 0.04 \text{ pmol}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、このOATP1B1を介したE2G取り込み活性は $10 \mu\text{M}$ RIFの存在下で完全に消失した。また、OATP1B3/HEK293およびMock Neo/HEK293におけるCCK-8取り込み活性値はそれぞれ、 56.9 ± 8.0 、 6.5

$\pm 1.1 \text{ fmol}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、このOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性は $100 \mu\text{M}$ BSPの存在下で完全に消失した。したがって、OATP1B1/HEK293およびOATP1B3/HEK293はともにMock/HEK293と比較して高い基質取り込み活性を有していることが明らかとなった。

DAAの共存下OATP1B機能阻害プロファイル解析

OATP1B1を介したE2G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV (0.01 - $100 \mu\text{M}$)の影響をtransport assayにより解析した。その結果、TLV、SMV、ASV、DCVおよびSFVのOATP1B1に対する IC_{50} 値 (μM) はそれぞれ 1.36 ± 0.58 、 0.30 ± 0.06 、 0.79 ± 0.21 、 1.50 ± 0.33 および 16.5 ± 7.6 であり、OATP1B3に対する IC_{50} 値 (μM) はそれぞれ 9.69 ± 3.10 、 0.22 ± 0.07 、 0.46 ± 0.11 、 3.27 ± 0.57 および 61.9 ± 31.6 であった。

I_{max}/IC_{50} 値およびR値の算出

DAAのOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIリスクを解析するため、ITCのdecision treeにしたがい、 I_{max}/IC_{50} 値およびR値を算出した。その結果、OATP1B1およびOATP1B3に対する I_{max}/IC_{50} 値は、TLVでは 4.04 および 0.57 、SMVでは 19.5 および 26.6 、ASVでは 0.85 および 1.46 、DCVでは 1.55 および 0.71 、SFVでは 0.07 および 0.02 であった。さらに、R値の算出が推奨される $I_{max}/IC_{50} > 0.1$ であったTLV、SMV、ASVおよびDCVについてOATP1B1および1B3に対するR値を算出したところ、TLVおよびSMVでは 1.25 以上(それぞれ 8.50 および 2.05 、 1.33 および 1.44)であったが、ASVでは 1.08 および 1.13 、DCVでは 1.03 および 1.01 であった。

DAAの持続的OATP1B機能阻害効果の解析 (濃度依存性解析)

DAAの持続的OATP1B機能阻害プロファイルを明らかとするため、OATP1B1を介したE2G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV (0.1 、 1.0 および $10 \mu\text{M}$) 前処理の影響をtransport assayにより解析した。その結果、DAsの持続的OATP1B機能阻害効果には以下の濃度依存性が認められた。

SMV前処理後のOATP1B1を介したE2G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 99.4 ± 20.8 、 38.2 ± 13.1 、 $21.1 \pm 12.0\%$ 、OATP1B3を介したCCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 72.3 ± 8.42 、 12.6 ± 5.29 、 $7.78 \pm 1.79\%$ であり、両分子種に対し

て大きな持続的機能阻害効果が認められた。ASV前処理後のOATP1B1の活性値はそれぞれコントロールの 74.6 ± 9.47 、 58.6 ± 2.39 、 $35.5 \pm 14.7\%$ であり、全ての濃度でOATP1B1に対する持続的機能阻害効果が認められたが、OATP1B3の活性値は10 μM においてのみコントロールの $36.1 \pm 6.09\%$ と持続的機能阻害効果が認められた。また、DCV前処理後のOATP1B1およびOATP1B3の活性値は10 μM においてのみ $36.1 \pm 6.09\%$ 、 $35.3 \pm 10.5\%$ と持続的機能阻害効果が認められた。一方、TLVおよびSFV ではないずれのOATP1B分子種においても顕著な持続的機能阻害効果は認められなかった。また、CsA (0.1, 1.0または10 μM) においては既報と同様にOATP1B1およびOATP1B3に対する強い持続的機能阻害効果が認められた。

DAAの持続的OATP1B機能阻害効果の解析 (時間依存性解析)

上記において強い持続的OATP1B機能阻害効果が認められたSMVおよびASVについて、持続的OATP1B機能阻害効果の時間依存性を解析した。その結果、SMVおよびASV (1.0 μM) の持続的OATP1B機能阻害効果には以下の時間依存性が認められた。SMVの前処理から0、1または3時間後におけるOATP1B1を介したE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 36.8 ± 5.6 、 69.5 ± 8.2 、 $100.4 \pm 8.4\%$ と、前処理3時間で阻害効果が消失したのに対し、OATP1B3では、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 14.9 ± 5.0 、 26.3 ± 6.7 、 $53.3 \pm 2.4\%$ とOATP1B1に対するよりも長い持続的機能阻害効果が認められた。また、ASVの前処理から0、1または3時間後におけるOATP1B1の活性値はそれぞれコントロールの 37.6 ± 21.0 、 86.1 ± 5.5 、 $98.0 \pm 1.9\%$ とSMVの阻害プロファイルと類似していた。OATP1B3に対しては、5で得られた結果と同様に本濃度では阻害効果は認められず、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 107.0 ± 7.7 、 99.8 ± 14.0 、 $100.7 \pm 13.8\%$ であった。一方で、CsA (1.0 μM) については既報と同様に3時間以上の持続的機能阻害効果が認められた。

DAAの持続的機能阻害効果の共存下OATP1B機能阻害効果への影響解析

SMVおよびASVについて、持続的機能阻害効果が共存下OATP1B機能阻害効果に及ぼす影響を明らかにするため、SMVまたはASV (0.1, 0.4, 1.0 μM) 前処理後の、SMVまたはASV (0.1, 0.4, 1.0 μM) 存在下におけるOATP1B1を介したE₂G、またはOATP1B3を介したCCK-8取り込み活性をtransport assayに

より解析した。その結果、DMSO (0.1%) 前処理後のSMV共存下におけるE₂G取り込み活性値、またはSMV前処理後のSMV共存下におけるE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 89.5 ± 16.1 、 51.0 ± 1.43 、 $22.5 \pm 5.56\%$ 、または 77.2 ± 22.6 、 29.9 ± 9.48 、 $16.7 \pm 3.99\%$ であり、持続的機能阻害効果による共存下機能阻害効果の増強が認められた。SMVのOATP1B3活性に対する影響についても同様であり、CCK-8取り込み活性値はそれぞれコントロールの 47.3 ± 6.12 、 19.0 ± 5.25 、 $16.8 \pm 6.81\%$ 、または 34.9 ± 2.64 、 10.9 ± 2.98 、 $8.87 \pm 3.09\%$ であった。一方で、DMSO (0.1%) 前処理後のASV共存下におけるE₂G取り込み活性値、またはASV前処理後のASV共存下におけるE₂G取り込み活性値はそれぞれコントロールの 79.7 ± 2.71 、 48.6 ± 10.4 、 28.4 ± 156 、または 53.0 ± 11.2 、 31.5 ± 7.40 、 $27.6 \pm 19.9\%$ であり、持続的機能阻害効果による共存下機能阻害効果の増強が認められた。また、上記5の結果と同様に、本濃度ではOATP1B3に対して共存下機能阻害効果を増強させる持続的機能阻害効果を発揮しなかった。

D . 考察

本研究の結果、解析したすべての第二世代DAAは異なるプロファイルで共存下OATP1B機能阻害効果を有することが明らかとなった。これまでに第一世代DAAのTLVおよびBOCについては、*in vitro*における共存下OATP1B機能阻害活性解析と*in vivo*におけるDDI解析がおこなわれている。たとえば、TLVのOATP1B1に対するIC₅₀値および推定R値はそれぞれ 2.15 ± 0.13 μM および5.74であるという報告があり、この値は本研究と概ね一致している。現在、Food and Drug Administration (FDA) およびInternational Transporter Consortium (ITC) はOATP1B機能阻害効果が認められる薬剤について、*in vivo* DDI解析の必要性の有無を判断する基準をR>1.25と設定している。これによると、TLVはOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIを生じる可能性が高いと判断され、実際に*in vivo*においてTLVはATVのAUCを約8倍上昇させることが報告されている。BOCについても、そのOATP1B1に対するR値が1.5であることから*in vivo*におけるOATP1Bを介したDDIが予測されており、実際にBOCによりATVのAUCが約2.3倍上昇することが報告されている。したがって、第二世代DAAのうち、OATP1B1および1B3に対するR値がそれぞれ1.33および1.44であるSMVはOATP1B機能阻害を介した*in vivo* DDIのリスクが高いと考えられる。一方で、共存下OATP1B機能阻害効果が著しく低いSFV、およびR値が1.25を下回るASVおよびDCVはそのようなDDIの可能性は低い

と考えられる。

しかしながら、これまでに *in vivo* において SMV は併用する ATV および rosvastatin (RSV) の AUC を 2-3 倍上昇させるという報告があり、この上昇率は SMV の OATP1B に対する R 値から得られる予測値より大きい。また、ASV についても、OATP1B に対する R 値が 1.25 を下回っているにもかかわらず、併用した RSV の AUC を約 1.4 倍上昇させるという臨床報告がある。これらのことから、OATP1B に対する R 値のみを用いた *in vivo* DDI の予測では、SMV および ASV の *in vivo* における DDI リスクを過小評価する傾向があると考えられる。

これまでも OATP1B に対する R 値を用いた *in vivo* DDI の定量的予測に関しては、いくつかの問題点があることが指摘されている。たとえば、CsA は持続的 OATP1B 機能阻害効果により、その共存下 OATP1B 機能阻害効果を増強させることが報告されている。このことから、持続的 OATP1B 機能阻害効果を有する薬剤においては、共存下 OATP1B 阻害活性解析により得られた IC_{50} 値以上の機能阻害が生じていると考えられ、SMV および ASV についてもまた、*in vivo* においては、一般に薬剤は OATP1B による肝取り込み以外にも複数の消失経路を有しており、上述の ATV および RSV に関しても OATP1B による肝取り込みを主消失経路としているものの、CYP3A4 などの代謝酵素や、breast cancer resistance protein などの排泄トランスポーターも、それらの薬物動態に寄与する可能性が考えられている。以上のことから、SMV および ASV の *in vivo* DDI の定量性を向上させるためには、それらの持続的 OATP1B 機能阻害効果を加味した R 値の算出法を確立するとともに、併用薬の薬物動態を規定する諸因子に対する R 値を明らかとし、包括的な *in vivo* DDI 予測をする必要があると考えられる。持続的 OATP1B 機能阻害効果を定量化するためには、その特徴や機序の詳細を明らかとする必要があると考えられる。現在までに、持続的 OATP1B 機能阻害効果を有する薬剤はほとんど同定されていないが、興味深いことに、本研究において解析した DAA はそれぞれ異なるプロファイルで持続的 OATP1B 機能阻害効果を有することが明らかとなった。

たとえば、SMV および ASV は同程度の共存下 OATP1B3 機能阻害効果を有しているものの、SMV と ASV とでは OATP1B3 に対する持続的機能阻害効果のプロファイルが異なる。したがって、少なくとも SMV と ASV は異なる機序で持続的機能阻害効果を示していると考えられる。また、その持続的 OATP1B 機能阻害効果は共存下 OATP1B 機能阻害効果とは関連しないことから、DAA の有する持続的 OATP1B1 機能阻害効果の強度は共存下 OATP1B1 機能阻害効果の強度からは判断できないといえる。このことは、

強力な共存下 OATP1B1 機能阻害効果を有している rifampicin が持続的 OATP1B1 機能阻害効果を示さない一方で、比較的弱い OATP1B1 阻害剤である saquinavir (SQV) および ritonavir が持続的 OATP1B1 機能阻害効果を有しているという報告とも一致している。

これまで持続的 OATP1B 機能阻害効果の詳細な機序については明らかとなっていないが、CsA についてはその前処理から約 18 時間にわたって CsA およびその代謝物が細胞内に蓄積していることが明らかとなっており、持続的 OATP1B 機能阻害は細胞内に蓄積した CsA (およびその代謝物) に起因している可能性が指摘されている。SMV および ASV についても、その持続的 OATP1B 機能阻害効果が細胞内蓄積により規定されている可能性が考えられ、また、その蓄積性の差異が異なるプロファイルを生じる原因である可能性がある。また、これまでに CsA および SQV については持続的 OATP1B1 機能阻害効果の速度論的解析が行われており、CsA による持続的 OATP1B 機能阻害効果が競合阻害様式である一方で、SQV については非競合阻害様式であることが明らかとなっている。このことから、持続的 OATP1B1 機能阻害効果にはいくつかの阻害様式が存在すると考えられる。以上より、今後は SMV および ASV の細胞内蓄積解析や速度論的解析をおこなうことで持続的 OATP1B 機能阻害の差異の特徴や機序が明らかになる可能性があると考えられる。

E . 結論

本研究の結果から、解析したすべての第二世代 DAA は異なるプロファイルで共存下 OATP1B 機能阻害効果を有していることが明らかとなった。さらに、SMV および ASV は他剤と比較して強い持続的 OATP1B 機能阻害効果を有していることも明らかとなった。したがって、SMV は *in vivo* における OATP1B 機能阻害を介した DDI リスクが高いと考えられ、また、ASV についても SMV と比較して弱いものの OATP1B 機能阻害を介した *in vivo* DDI の可能性は否定できないと考えられた。一方で、DCV および SFV については、そのようなリスクは低いと考えられた。これらのことより、SMV または ASV を用いた C 型肝炎治療においては、OATP1B を主要消失経路とする薬剤との併用に十分注意する必要があると考えられる。また、今後持続的 OATP1B 機能阻害効果の機序を明らかとし、持続的機能阻害効果を反映した予測法を確立することができれば、従来よりも高い精度で DAA による OATP1B 機能阻害を介した *in vivo* DDI リスクの定量的予測が可能になることが期待される。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

Furihata T, Kishida S, Sugiura H, Kamiichi A, Iikura M, Chiba K. Functional analysis of purine nucleoside phosphorylase as a key enzyme in ribavirin metabolism. Drug Metab Pharmacokinet. 2014;29:211-214.

Furihata, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides, in revision.

2. 学会発表

降幡知巳、坪田昭人、本間真人、千葉寛. 肝炎・膵がん個別化治療の基盤確立に向けた治療薬トランスポーターの遺伝子機能解明 第134回日本薬学会年会(熊本、2014年3月)

付 中国、降幡知巳、松本涉吾、鈴木雄基、坪田昭人、千葉寛. 第二世代直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1阻害プロファイル 第134回日本薬学会年会(熊本、2014年3月)

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし