

## II. 分担研究報告 ( 1 )

### 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 ) ) 分担研究報告書

薬物間相互作用回避に向けた直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーター阻害機序の解析

研究分担者 千葉 寛

#### 研究要旨

Organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) は肝臓・小腸に発現する薬物取り込みトランスポーターである。そのため、OATP2B1機能を阻害する薬剤は薬物間相互作用 (drug-drug interaction, DDI) を引き起こす可能性がある。一方、C型肝炎治療においては、第二世代直接作用型C型肝炎治療薬が標準療法として用いられ始めている。これら薬剤は临床上他の薬剤と併用される機会が多いが、OATP2B1機能に対する阻害プロファイルは明らかとなっていない。そこで本研究では、シメプレビル (SMV) およびアスナプレビル (ASV) のOATP2B1機能に対する影響を明らかとすることを目的とした。OATP2B1安定発現HEK293細胞およびコントロールHEK293細胞を作製した。Estrone-3-sulfate (5 nM)を基質としたトランスポートアッセイをおこない、これら薬剤の共存下および持続的OATP2B1機能阻害効果を解析した。共存下OATP2B1機能阻害効果を解析したところ、SMVおよびASVのOATP2B1に対する $IC_{50}$ 値 ( $\mu M$ ) はそれぞれ $0.49 \pm 0.12$ および $0.16 \pm 0.06$ であった。さらにいずれの薬剤においても、曝露中止後にもその阻害効果が持続する持続的OATP2B1機能阻害効果が認められた。そこで、SMVおよびASVの持続的阻害効果と共存下阻害効果の協調作用を解析したところ、持続的阻害存在時の $IC_{50}$ 値 ( $\mu M$ )はそれぞれ $0.19 \pm 0.05$ および $0.08 \pm 0.01$ に低下した。本研究の結果、SMVおよびASVは強い共存下OATP2B1機能阻害剤であること、さらにこれら薬剤は共存下阻害効果を増強させる持続的阻害効果も有することが明らかとなった。従って、SMVおよびASVとOATP2B1基質薬物との併用時には、DDIに注意を要すると考えられる。

#### A. 研究目的

最近、C型肝炎治療においては次世代の直接作用型治療薬 (direct acting antivirals, DAAs) が次々と開発され、これら新薬による治療が主流となりつつある。DAAsは高い治療効果を有する一方、薬物間相互作用を生じるリスクも臨床にもたらしている。薬物間相互作用は従来薬のインターフェロン やリバビリンでは大きな問題ではなかったため、これまでC型肝炎治療の臨床において重要視されてこなかったが、DAAs時代の到来に伴い、薬物間相互作用への対策は急務の臨床課題であると考えられる。

我々は前年度までに、肝細胞薬物取り込みトランスポーター organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) および OATP1B3 に対する種々の DAAs (テラプレビル [TLV]、シメプレビル [SMV]、アスナプレビル [ASV]、ダクラタビル [DCV]、ソフォスブビル [SOF]) の阻害作用を明らかとしてきた。しかし、OATP1B1 や OATP1B3 と同様に肝薬物取り込みを担う OATP2B1 について上

記 DAAs の阻害作用は明らかとなっていない。

そこで本分担研究では、ヒト肝薬物取り込みトランスポーター OATP2B1 に対する TLV、SMV、ASV、DCV、SOF の阻害プロファイルを明らかとすることを目的として検討をおこなった。

#### 研究方法

#### 試薬

TLV、SMV、ASV、DCVおよびSOFはそれぞれShanghai Biochempartner (Shanghai, China)、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。OATP2B1機能阻害剤であるtaurocholic acid (TCA)、bromosulfophthalein (BSP)およびtestosterone (TST)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) または東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。上記薬剤はdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

## OATP2B1 complimentary DNA (cDNA) クローニング およびOATP2B1発現用プラスミドベクターの作製

ヒト肝cDNAをテンプレートとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (TAKARA, 東京, 日本) を用いて、polymerase chain reaction (PCR) をおこなった。得られたPCR産物をテンプレートとしてPrimeSTAR HS DNA polymerase を用いてPCRをおこない、OATP2B1に制限酵素配列を付加した後、XhoIおよびBamHI処理をおこなった。得られたDNA断片を同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vector (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) とライゲーションさせ、OATP2B1/pcDNA3.1を作製した。DNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー株式会社 (東京) に委託した。

## OATP2B1安定発現HEK293細胞の樹立および細胞培養

ヒト胎児腎臓由来Human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞はHUMAN SCIENCE (東京) より入手し、Dulbecco 's modified Eagle 's medium (Life technologies) 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。

OATP2B1安定発現HEK293細胞 (OATP2B1/HEK293) および空ベクター導入HEK293細胞 (Mock/HEK293) は、OATP2B1/pcDNA3.1またはpcDNA3.1 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。樹立した細胞 (それぞれOATP2B1/HEK293およびMock/HEK293とする) はG418 disulfate salt を400 µg/mLの濃度で添加して培養した。上記細胞は全て5% CO<sub>2</sub> / 95% airを気相とした37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

## Total RNA抽出およびcDNA合成

OATP2B1/HEK293およびMock/HEK293からの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 glyceraldehyde-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) をテンプレートとし、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OATP2B1/HEK293におけるOATP2B1 mRNAおよび細胞におけるGAPDH mRNAの発現を解析した。

## Western blotting

### 細胞膜可溶化画分調製

Mock/HEK293 および OATP2B1/HEK293 細胞を150-mmディッシュに播種した。コンフルエントに達した後に、培地を除去し、PBS (-) で細胞層をリンスし、セルスクレーパーで剥離した。これをPBS (-) で懸濁し、800 × g、4 °C で3分間遠心分離して細胞ペレットを調製した。これら細胞ペレットをSET buffer (0.25 sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, Protease inhibitors cocktail, pH 7.4) で懸濁し、ソニケーションで破碎した。これを1,000 × g、4 °C で10分間遠心分離し、得られた上清をさらに100,000 × g、4 °C で40分間超遠心した。これにより得られた沈殿を0.8% NP-40, 0.4% deoxycholic acidおよび0.08% sodium dodecyl sulfate (SDS) 添加SET bufferに懸濁し、ソニケーションにより破碎した。これを再度100,000 × g、4 °C で40分間超遠心し、得られた上清を膜可溶化画分とした。蛋白質濃度は、Pierce® BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc, Rockford, USA) を用いて測定した。

## Western blotting

上記により得られた膜可溶化画分 (10 µg) にSET bufferを加えて、10 µLとした後、同量のlaemmli bufferを加え、37 °Cで30分間インキュベートし、10%のポリアクリルアミドゲルにより分離した後、ポリフッ化ビニルデン膜 (PVDF) に転写した。転写後のPVDF膜は、5% Skim milk (wako) 含有Tris Buffered Saline with Tween 20を用いて室温で2時間のブロッキングをおこなった。一次抗体はrabbit anti-OATP-B (H-189) IgG (400-倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, CA) および mouse anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase IgG (1,000-倍希釈; Sigma) をCan Get Signal solution 1 (TOYOBO, 大阪) で希釈したものをを用い、室温で1時間振とうした。二次抗体は horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG

(5,000倍希釈で使用; Sigma) およびhorseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (5,000倍希釈で使用; Abcam, Cambridge, UK) を Can Get Signal solution 2 (TOYOBO, 大阪) で希釈したものをを用い、室温で1時間処理した。蛍光検出はAmersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare, Giles, UK) およびLAS-4000 (FUJIFILM, 東京) によりおこなった。

## Transport assay

### OATP2B1を介した基質取り込み活性解析

作製したOATP2B1/HEK293における基質取り込み活性は以下の方法で解析した。OATP2B1/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 $4.0 \times 10^5$  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OATP2B1の基質溶液は、Na<sup>+</sup>-plus Krebs-Henselei buffer (Na<sup>+</sup>-KHB) (pH 6.5) に<sup>3</sup>H]E3S (2120.1 GBq/mmol) (PerkinElmer Life Science, Inc. Boston, MA, USA) および非標識E3S (Sigma-Aldrich) を溶解し、最終基質濃度5 nM (高親和性部位を介した取り込み) または50 μM (低親和性部位を介した取り込み) および最終放射線濃度0.25 μCi/mLとした。阻害実験では、OATP2B1に対する典型的阻害剤として、TCA (高親和性部位阻害剤)、TST (低親和性部位阻害剤) またはBSP (両親和性部位阻害剤) をそれぞれ最終阻害剤濃度1 mM, 1 mMまたは100 μMの濃度で基質溶液に加えた。

Transport assayでは、細胞を37 °CのNa<sup>+</sup>-plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200 μLを加えて37 °Cで取り込み反応を開始した。E3S取り込み時間は、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分間とした。その後、細胞を氷冷したNa<sup>+</sup>-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDS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® BCA™ Protein Assay Kit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]

$$[\text{取り込み活性 (pmol/ mg protein/ min)}] = [\text{放射能 (dpm)}] / [\text{基質溶液放射能}$$

$$(\text{dpm/nmol})] / [\text{採取量 (mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] \times [1000 (\text{pmol/nmol})] / [\text{タンパク濃度 (mg protein/mL)}] \times [\text{全量 (mL)}] / [\text{取り込み時間 (min)}]$$

### DAAの共存下OATP2B1機能阻害活性解析

Transport assayは上記と同様の方法でおこなった。高親和性部位の阻害にはTLV (0.1, 1.0, 10, 40 および100 μM)、SMV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 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, 4.0, 10, 40および100 μM) およびSFV (1.0, 4.0, 10, 40 または100 μM) を用いた。低親和性部位の阻害にはTLV (0.1, 0.4, 1.0, 4.0, 10, 40および100 μM)、SMV (0.01, 0.1, 1.0, 10および100 μM)、ASV (0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1.0, 4.0および10 μM)、DCV (0.1, 1.0, 10, 40および100 μM) およびSFV (1.0, 4.0, 10, 40または100 μM) を用いた。コントロールとしてDMSOを最終濃度0.1 %で細胞に曝露した。DAAのOATP2B1に対する50%阻害濃度 [IC<sub>50</sub>]<sub>∞</sub> (μM) は式[2]を用いて算出した。

#### 式[2]

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

ここで、それぞれの取り込み活性値はOATP2B1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 はDAAの濃度 (μM) を示す。

### DAAの濃度依存性な持続的OATP2B1機能阻害活性解析

DAAの持続的OATP2B1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。TLV、SMV、DCV、SFV (0.1, 1.0および10 μM)、ASV (0.01, 0.1および1 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa<sup>+</sup>-KHBで細胞を1時間、37 °Cで培養した後、Na<sup>+</sup>-KHBで二回リンスし、DAA非存在下にてtransport assayをおこなった。取り込み活性値はコントロールの取り込み活性値の相対値 (%) として算出した。

### DAAの時間依存性な持続的OATP2B1機能阻害活性解析

DAAの持続的OATP2B1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<sup>+</sup>-KHB (pH 6.5)で細胞を1時間、37 °Cで培養し、その後培養培地 (抗生剤不含) で一回リンスした後、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<sup>+</sup>-KHBで2回リンスし、DAA非存在下にて上記と同様の方法でtransport assayをおこなった。取り込み活性値は上記と同様に各時間におけるコントロールの取り込み活性値の相対値 (%) として算出した。

#### DAAの持続的機能障害効果の共存下OATP2B1機能障害効果への影響解析

DAAの持続的機能障害効果が共存下OATP2B1機能障害作用に及ぼす影響は既報の方法をもとに解析した。SMV (0.001, 0.01, 0.1, 0.4, 1.0および10 μM)、ASV (0.001, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4および1.0 μM) またはコントロールとして0.1% DMSOを含むNa<sup>+</sup>-KHBで細胞を1時間、37 °Cで培養した後、Na<sup>+</sup>-KHBで二回リンスし、SMV (0.001, 0.01, 0.1, 0.4, 1.0 および10 μM)、ASV (0.001, 0.01, 0.04, 0.1, 0.4 および1.0 μM) の存在下にてtransport assayをおこなった。DAAのOATP2B1に対する持続的かつ共存下50%阻害濃度 [ $IC_{50}$ ]<sub>co+pre</sub> (μM) は式[2]を用いて算出した。

#### 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

ヒト肝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

##### OATP2B1安定発現系HEK293の作製

OATP2B1/HEK293またはMock/HEK293より調製したcDNAを用いて、OATP2B1 mRNAの発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP2B1/HEK293のみにおいてOATP2B1 mRNA発現が認められた。

続いて、OATP2B1蛋白質の発現を明らかにするため、OATP2B1/HEK293またはMock/HEK293より膜可溶化画分を調製し、Western blottingをおこなった。その結果、Mock/HEK293ではOATP2B1蛋白質の発現が認められず、OATP2B1/HEK293でOATP2B1蛋白質の発現が認められた。

##### OATP2B1高親和性部位または低親和性部位を介したE3S取り込み活性解析

OATP2B1/HEK293またはMock /HEK293におけるOATP2B1高または低親和性部位を介したE3S取り込み活性を、各活性部位により優先的に輸送される濃度 (それぞれ0.005 μMまたは50 μM) を用いて解析した。その結果、OATP2B1/HEK293 (高親和性部位) およびMock/HEK293におけるE3S取り込み活性値はそれぞれ0.18 ± 0.03、0.006 ± 0.001 (pmol/mg protein/min) であり、OATP2B1/HEK293においてMock /HEK293よりも高い活性が認められた。この取り込み活性は、高親和性部位選択的阻害剤TCA (1 mM) および両親和性部位に対する阻害剤BSP (100 μM) の存在下で完全に消失したのに対し、低親和性部位に優先的な阻害剤TST (1 mM) 存在下では、阻害ではなく、活性の増強が認められた。このTSTのOATP2B1 高親和性部位を介した取り込みに対する増強効果は、これまでも報告があるがその理由は不明である。一方、OATP2B1低親和性部位を介した取込み活性値は、OATP2B1/HEK293で316.2 ± 37.4 (pmol/mg protein/min) とMock /HEK293の42.9 ± 7.3 (pmol/mg protein/min) よりも高かった。これら取り込み活性は、TST (1 mM) およびBSP (100 μM) の存在下で完全に消失したのに対し、TCA (1 mM) では十分に阻害されなかった。以上の結果より、作製したOATP2B1/HEK293では、既報と同様、異なる活性部位を介した二種類のE3S取り込み機構が認められた。

##### DAAの共存下OATP2B1機能障害プロファイル

OATP2B1高または低親和性部位を介したE3S取り込み活性におよぼすTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV (いずれも0.01-100 μM) の影響を解析した。その結果、TLVは高親和性部位に対する阻害効果は認められなかったが、低親和性部位に対する[ $IC_{50}$ ]<sub>co</sub>値 (μM) は16.22 ± 2.73であった。SMV、ASVおよびDCVは高親和性部位に対する阻害効果を有しており、その[ $IC_{50}$ ]<sub>co</sub>値 (μM) はそれぞれ0.49 ± 0.12、0.16 ± 0.06および35.5 ± 4.10であった。また、これら薬剤はいずれも低親和性部位も阻害し、それら[ $IC_{50}$ ]<sub>co</sub>値はそれぞれ10.15 ± 2.80、0.92 ± 0.08および50.10 ± 18.02 (μM) であった。一方、SFVはいずれの親和性部位に対しても機能障害効果を示さなかった。したがって、SMVおよびASVは*in vitro*において各親和性部位に対して強い共存下機能障害効果を有する一方で、TLVは低親和性部位のみに対する阻害効果を有することが明らかとなった。また、DCVおよびSFVによるOATP2B1阻害効

果は他剤と比較し顕著に小さい、あるいは認められないことも明らかとなった。

#### DAAの濃度依存性な持続的OATP2B1機能阻害効果

DAAの持続的OATP2B1機能阻害プロファイルを明らかとするため、OATP2B1の高親和性または低親和性部位を介したE3S取り込み活性に対するTLV、SMV、ASV、DCVおよびSFV前処理の影響を解析した。その結果、SMV (1.0および10  $\mu\text{M}$ ) 前処理後の高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $40.2 \pm 5.9$ 、 $29.2 \pm 5.4$  (%)、低親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $36.1 \pm 12.0$ 、 $8.6 \pm 6.4$  (%)であり、両活性部位に対するSMVの強い持続的機能阻害効果が認められた。同様に、ASVも両親和性部位に対して強い持続的機能阻害効果を有しており、ASV (0.1および1  $\mu\text{M}$ ) 前処理後の高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $48.1 \pm 3.1$ 、 $14.8 \pm 5.6$  (%)、低親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $68.0 \pm 24.3$ 、 $18.4 \pm 0.5$  (%)であった。したがって、SMVおよびASVは共に強い持続的OATP2B1機能阻害効果を有することが明らかになった。一方、TLV、DCVおよびSFVでは、いずれの親和性部位に対しても顕著な持続的機能阻害効果は認められなかった。

#### DAAによる持続的OATP2B1機能阻害効果の時間依存性

上記において顕著な持続的OATP2B1機能阻害効果が認められたSMVおよびASVについて、その時間依存性を解析した。その結果、SMVの前処理から1または3時間後における高親和性部位の取り込み活性値はそれぞれコントロールの $34.3 \pm 14.9$ 、 $58.1 \pm 3.3$  (%)と、前処理後3時間以上継続するのに対し、低親和性部位ではそれぞれコントロールの $83.1 \pm 8.8$ 、 $109.1 \pm 7.0$  (%)と前処理後1時間程度しか続かなかった。また、ASVの前処理から1または3時間後における高親和性部位の活性値はそれぞれコントロールの $57.1 \pm 5.6$ 、 $77.5 \pm 24.5$  (%)、低親和性部位に対しては、それぞれコントロールの $100.6 \pm 1.4$ 、 $111.9 \pm 17.0$  (%)であり、SMVの持続的阻害プロファイルと類似したプロファイルが認められた。したがって、両薬剤の持続的OATP2B1機能阻害効果の継続時間は、基質取り込みに係る活性部位毎に異なることが明らかとなった。

#### DAAの持続的OATP2B1機能阻害効果の共存下機能阻害効果に対する影響

SMVおよびASVの持続的OATP2B1機能阻害効果による共存下機能阻害効果への増強作用を明らかとするため、各薬剤前処理かつ共存下におけるE3S取り込み活性を解析した。その結果、SMVおよびASVの高親和性部位に対する $[\text{IC}_{50}]_{\text{co+pre}}$ 値は、それぞれ共存下阻害条件のみから得られた値と比較して2.6または2.0倍低下し、 $0.19 \pm 0.05$ 、 $0.08 \pm 0.01$  ( $\mu\text{M}$ )となった。一方、低親和性部位においてもそれぞれの $[\text{IC}_{50}]_{\text{co+pre}}$ 値は共存下阻害条件のみから得られた値より低下し $0.39 \pm 0.05$ 、 $0.37 \pm 0.12$  ( $\mu\text{M}$ )となったが、その低下度はSMVにおいてASVよりもより顕著であった(それぞれ26.0または2.5倍低下)。以上より、SMVおよびASVの持続的OATP2B1機能阻害効果は共に共存下機能阻害効果を増強させることが明らかとなったが、その上乗せ効果は活性部位により異なることも明らかとなった。

#### D. 考察

本研究の結果、SFV以外の解析した全てのDAAはOATP2B1を阻害することが明らかとなった。まず共存下阻害作用について、TLVは低親和性部位を介したE3S取り込みのみを阻害し、高親和性部位を介したE3S取り込みには影響しなかった。これは既報のtestosteroneおよびpenicillin Gと同様の阻害特徴であるが、興味深いことに、高親和性部位の活性を増強しない点ではTLVはこれら化合物と異なる特徴を有する。一方、SMVおよびASVはOATP2B1両活性部位に対して共存下機能阻害効果を有しており、sulfasalazine、BSP、montelukastやDHEASに次ぐ、新たな両活性部位阻害剤であることが明らかとなった。しかし、SMVおよびASVは高親和性部位に対する阻害効果が同等であるにもかかわらず、両者の低親和性部位への阻害効果は大きく異なっていた。Pubchemデータベースを用いてSMVおよびASVの物性を比較したところ、それらの疎水性、極性および分子量など主だった物理化学的性質は極めて類似していた。そのため、低親和性部位に対する阻害効果の差を生じる原因は不明であるが、SMVにはASVと異なるマクロサイクリック環構造が存在することから、このような構造的差異がOATP2B1各親和性部位に対する阻害効果に關与する可能性が考えられる。

一方、これまでにアップルジュース(AJ)において持続的OATP2B1機能阻害効果が報告されているが、本研究では、臨床で用いられる薬剤として初めてSMVおよびASVが持続的OATP2B1機能効果を有することを明らかとした。これら薬剤の各活性部位に対する持続的機能阻害効果は共存下阻害時の阻害強度と一致しておらず、これはAJの阻害プ

ロファイル（両活性部位に対して、共存下機能阻害効果有するのに対し、持続的阻害効果は高親和性部位のみに認められる）と類似している。これらのことから、DAAの各親和性部位に対する持続的OATP2B1機能阻害効果の強度は共存下OATP2B1機能阻害効果の強度からは判断できないといえる。

以上のことから、それぞれのDAAはOATP2B1に対して固有の阻害作用（各活性部位に対する共存下・持続的阻害効果の組み合わせ）を有することが明らかとなった。このようにDAA間にOATP2B1阻害作用の差異を生じる詳細は不明であるが、共存下および持続的で阻害機序が異なる可能性が考えられる。

これまでに持続的OATP2B1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、その可能性の一つとして細胞膜上OATP2B1蛋白質量の低下が考えられる。近年、OATP2B1発現MDCK細胞において、細胞膜上のOATP2B1蛋白質がprotein kinase C (PKC) 活性化により内在化することでE3Sの取り込み活性が低下することが報告されている。したがって、SMVおよびASVのPKC活性化作用は不明であるものの、同様の現象が起こる可能性は否定できないと考えられる。しかし、SMVおよびASVの二つの活性部位に対する持続的機能阻害効果の継続時間が異なっていたことから、持続的機能阻害の機序としてOATP2B1の内在化だけでは説明し切れないと考えられる。一方、細胞内に取り込まれたSMVおよびASVが持続的機能阻害に関与する可能性も考えられる。これまでにシクロスポリンA (CsA)はOATP1B1に対して持続的機能阻害を有することが報告されているが、CsAは前処理後約18時間にわたって、その代謝物と共に細胞内に蓄積することが明らかとなっている。この蓄積したCsA（およびその代謝物）は持続的OATP1B1機能阻害に関与する可能性が指摘されている。したがって、SMVおよびASVの細胞内蓄積解析や持続的OATP2B1阻害効果の速度論的解析をおこなうことが、今後はこれら薬剤の持続的OATP1B機能阻害の特徴や機序を明らかにするために必要であると考えられる。

本研究の結果および前年度の結果を考え合わせると、SMVおよびASVはいずれの肝OATP分子種に対しても強い阻害効果を有することが明らかとなった。したがって、臨床でDAAによるOATPs機能阻害を介したDDIが生じるリスクはあると考えられる。例えば、fexofenadineおよびpravastatinはOATP1B1/1B3/2B1により吸収されることが報告されていることから、SMVおよびASVはこれらの薬剤と併用する時に注意を要する可能性がある。また、今後開発される薬物についてもOATPsを主な肝取り込みトランスポーターとする場合には、SMVやASVとのDDIを評価すべきであると考えられる。さ

らに、OATP1B1/1B3/2B1を介したSMVおよびASVとの*in vivo* DDIリスク評価では、今後、共存下阻害効果ばかりでなく持続的阻害効果も考慮することを、その手法とともに検討していく必要があると考えられる。

## E．結論

以上本研究の結果から、解析したDAA (SFV以外)は異なるプロファイルで共存下OATP2B1機能阻害効果を有することが明らかとなり、SMVおよびASVについては強い持続的OATP2B1機能阻害効果を有することも明らかになった。さらに、この持続的機能阻害効果により共存下機能阻害効果は大きく増強し、その効果は一定時間継続すると考えられることから、SMVおよびASVのOATP2B1を介した*in vivo* DDIリスクは、共存下機能阻害の結果のみから推定される以上に高くなる可能性が考えられる。したがって、前年度までに得られた知見とも考え合わせ、特にSMVおよびASVを用いたC型肝炎治療においては、肝OATPsの基質として取り込まれる薬物を併用する際に、DDIに注意を要すると考えられる。

## F．研究発表

### 1. 論文発表

Furihata T, Fu Z, Suzuki Y, Matsumoto S, Morio H, Tsubota A, Matsumoto S, Chiba K. Differential inhibition features of direct acting anti-hepatitis C virus agents against human organic anion transporting polypeptide 2B1. *Int J Antimicrob Agents*. 2015, in press.

Furihata T, 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.

### 2. 学会発表

森尾花恵, 降幡知巳, 付中国, 鈴木雄基, 松本涉吾, 坪田昭人, 千葉寛. 新規直接型C型肝炎治療薬の小腸organic anion transporting polypeptide 2B1阻害プロファイル(神戸、2015年3月)

Suzuki Y, Furihata T, Fu Z, Matsumoto S, Tsubota A, Sun Y, Morio H, Chiba K. Identification of simeprevir and asunaprevir as unique OATP

inhibitors with long-lasting properties. 19th North American regional ISSX meeting/29th JSSX annual meeting (San Francisco, USA Oct. 2014)

付中国、降幡知巳、松本涉吾、坪田昭人、孫雨晨、鈴木雄基、森尾花恵、千葉寛. 新規直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1/1B3阻害プロファイル 第9回トランスポーター研究会(名古屋、2014年6月)

G. 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