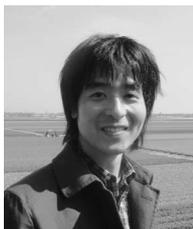


《若手研究者紹介》



臨床で生じる薬物間相互作用におけるトランスポーターの意義

設 楽 悦 久 Yoshihisa Shitara
千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室

1. はじめに

「若手研究者紹介」の原稿を依頼されたものの、最近、自分は「若手」と名乗っていてよいものだろうかと悩んでしまう。今年で、いよいよ35歳。四捨五入すると40歳である。毎年25歳を迎える学生に、四捨五入すると自分と同じ年齢だとからかっているが、それも今年で終わりである。シンポジウムなどで、座長を務められるS先生あたりが、「若手からの意見が聞きたいなあ」とおっしゃると、自分は意見を述べても良いのかどうかと真剣に悩んでしまう今日この頃である。この原稿を読まれた方の中には、こいつはいつまで若手のつもりなんだと心苦しく思われる方もおられるかも知れません。ですが、書いている本人が一番心苦しいということを理解していただければ幸いです。

2. 4年生～修士課程

4年生になる際に、杉山雄一教授の製剤学教室を選びました。何故、生物薬剤学の研究室を選択したのか、ということに関しましては、多数の方が読む雑誌に書けるような立派な動機でもありません。一つだけ、研究室選択に至ったまともな動機として、実際の医薬品開発に役に立つような研究がしたかったということが挙げられます。それでいて、有機化

学は苦手であったため、生物系しか選択の余地がありませんでした。今にして思えば、どの研究分野であっても、医薬品開発に生かせると思うのですが、学生当時の私には、それこそが薬剤学だと思ったということです。

読者の中には、生物薬剤学ではなく、物理薬剤学の研究者の方も多数おられると思います。物理薬剤も明らかに医薬品開発に直結する分野であるのですが、東大には生物薬剤学の研究室しかなく、選択肢が限られていました。ただし、私が研究室に配属になった当時は、現在とは違い、同じ研究室でDDSに近いような研究も行われており、私自身が、物理薬剤のような研究もできる研究室であると思いこんでいた節もあります。実際に、研究室に配属になってから修士課程まで、今の研究とは全く異なっており、生理活性を有するタンパクのような高分子の経細胞輸送に関する研究を行っておりました。タンパク製剤は薬価が高いことから、投与してから分解されにくいタンパク製剤の開発や有効性の高い投与方法などについて考えておりました。そのころ、星薬科大学の永井先生のご講演を聴く機会があり、インスリンの経口投与製剤の開発の試みに非常に感激した覚えがあります。

3. トランスポーター研究への移行

博士課程に進学した頃から、トランスポーター研究に着手するようになりました。しかしながら、進学した当初は、現在とは異なるテーマで研究を行っており、トランスポーター機能を維持した状態でラット肝細胞を培養する方法を開発しておりました。このような培養法はトランスポーターの誘導に

筆者紹介：1997年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了。2004年5月に博士(薬学)を授与される。1998～2001年北里大学薬学部助手、2001～2002年科学技術振興事業団CREST技術員、2002～2005年昭和大学薬学部助手、2005年より現職(千葉大学大学院薬学研究院講師)。研究のモットー：実際の医薬品開発に役立つ研究をする。楽しくやる。

関する研究などで有用となる可能性があります。既に、種々の培養法によって、代謝酵素の機能を維持することができるという報告を受けており、同様の方法を用いてトランスポーターの機能を維持できないか試みていたのです。近年では、米国の Dr. Kim Brouwer らによって sandwich culture を用いた方法の報告を目にしますが、実験を行っていた当時には、論文を参考にしながら試みたものなかなかうまくいかなかったという苦い思い出があります。この研究を行っている頃に、肝細胞の凍結保存技術が確立されつつあるという話や不死化させることができるという話を耳にするようになり、夢のような技術だと感じておりました。後者については、その直後に東北大学の寺崎先生らのグループで、薬剤学の分野にも応用され、素晴らしい結果を出されるのを目にすることになりました。一方、凍結肝細胞については、この後、私自身が使うことができるようになり、研究の幅が広がることになりました。

4. 凍結ヒト肝細胞を用いた研究

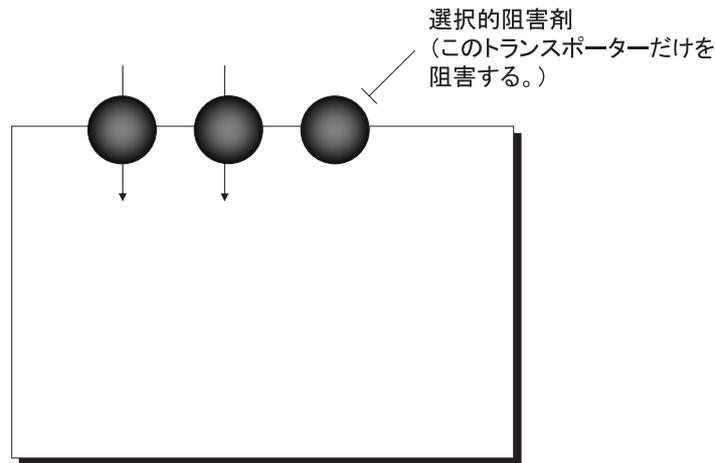
博士課程の学生だった頃、米国の In Vitro Technologies 社から Dr. Albert P. Li が東大の研究室で講演を行うために来日されました。その講演会では、凍結ヒト肝細胞の技術、それを利用した研究についての話を聞かせていただくことができました。当時の研究室では、というか今でもだと思いますが、セミナー中に質問を求められて、質問がないと答えることは許されないという暗黙の了解がありました。トランスポーター機能を維持した肝細胞の長期培養法を検討していた私が質問を求められるのは当然の成り行きであり、自分の研究を紹介した上で、長期培養の成功の可能性について尋ねたところ、彼の返答は、既存の培養法ではうまくいかないと思うといったようなものだったように思います。そして、彼は、冗談を交えつつ、学位を取りたいのであれば、その研究を続けるより、凍結ヒト肝細胞を用いた研究をした方がよいといったようなことをおっしゃっていました。この後、その話は現実のものとなりました。私の指導教授である杉山先生は、研究のセンスだけでなく、行動力も素晴らしく、このときは本当にその行動力に驚かされました。これを機に、当時、それほど流通していなかった凍結ヒト肝細胞を用いた研究を行うことができるようにな

りました。研究室のみんなから、あのとき質問したから、このようなツールを使えるようになったのだと冷やかされたことを記憶しております。このときの研究テーマの変化が、その後のトランスポーターレベルでの相互作用研究につながるわけです。ただ一言、口に出して質問しただけで、研究歴ががらっと変わるような変化につながることもあるものですね。

こうして、凍結ヒト肝細胞と新鮮ヒト肝細胞を用いたときの薬物取り込み機能の比較や凍結ヒト肝細胞とラット遊離肝細胞での取り込み機能の比較などを行うこととなりました。このときの結果については、Drug Metabolism and Pharmacokinetics に掲載されておりますので、詳細については省きます¹⁾が、凍結ヒト肝細胞が、薬物取り込み機能を定性的に議論する上では、有用なツールであることが示されました。取り込み機能を定量的に議論する場合であっても、有用なではありますが、用いるロットによっては機能が低下している場合があります。トランスポーターによって輸送される薬物が、どのくらいの親和性で認識されるのかといった定性的な評価はできるということが確認されたため、ある薬物がトランスポーターで輸送されるときに、別の薬剤を併用することで、臨床で用いられる濃度では障害を受けるだろうかといった定性的な評価に用いることができ、この後のトランスポーターレベルでの相互作用研究に用いることが可能であることが示唆されました。

5. トランスポーター寄与率を求めるための試み

凍結ヒト肝細胞の有用性を検討する研究は、重要なものではあったのですが、使うことができる細胞の数は限られており、毎日この実験をするわけにもいきません。そこで、実際には、この研究は片手間で行い、その一方で、トランスポーターの寄与率を算出することを目的とした研究を行いました。すなわち、ある薬物が肝臓に取り込まれる際に、複数のトランスポーターを介して輸送されることがあるのですが、その際に個々のトランスポーターが取り込み全体に対して、どの程度の寄与率を占めているのかということをも明らかにするための研究を行いました。この研究により寄与率が求まれば、トランスポーター発現細胞を用いて行った研究で得られた結



(トータルの取り込み) - (選択的阻害剤存在下での取り込み) から、目的のトランスポーターを介した取り込みを見積もる。

図1 トランスポーター特異的(選択的)阻害剤を用いた寄与率算出法

果から、ヒト肝細胞での取り込みに補外して求めることができるようになります。したがって、供給に制限のあるヒト肝細胞をルーチンに用いる必要はなくなり、多くの試験をトランスポーター発現細胞で代用し、必要なときだけヒト肝細胞を用いることが可能になります。

私が研究を始めた当初は、ラットに比べてヒトにおいては、さほど多くの分子種のトランスポーターがクローニングされていなかったため、研究のモデルとして、ラットトランスポーターを対象とし、Oatp1a1と1a4を介した輸送を区別して評価し、それぞれの寄与率を算出する方法論を構築することを目的としました。その方法として、それぞれのトランスポーターに対して特異的に働く阻害剤を探索するというアプローチをとりました(図1)。

Oatp1a1と1a4は同じファミリーに属するトランスポーターであり、非常に広範囲の化合物を基質として認識します。これらのトランスポーターは比較的基質認識性が近く、特異的に作用する阻害剤を探索するのは困難でありました。また、有機アニオントランスポーターという名称を持っているにもかかわらず、一部の有機カチオンもまた基質とするため、阻害剤として働く可能性のある化合物もまた、非常に広範囲な化合物群から探索する必要がありました。しかしながら、Oatp1a4がdigoxinを基質として認識し、肝への取り込みを行う一方で、Oatp1a1は基質としないという違いがあり、このようなことが手がかりとなりました。実際に、digoxinは、

Oatp1a4を低濃度で阻害する一方で、Oatp1a1を阻害せず、選択性の高い阻害剤の一つとなりうることが示唆されました。この他の化合物については、ほとんどの場合において、阻害剤としての活性が両方のトランスポーターに対して同程度であり、選択性の高い化合物は見いだされませんでした。結局、いくつかの比較的選択性が高い阻害剤を見いだした²⁾ものの、阻害定数に大きな差が無く、*in vivo*で一方のトランスポーターのみを阻害しうるといった本来求めていた理想的な阻害剤を見いだすには至りませんでした。

この後、興和株式会社から東大に研究生としていらしていた平野雅博士らによって、特異的阻害剤を用いた方法ではなく、トランスポーターに対する特異的基質を用いた方法や肝細胞および発現細胞におけるトランスポーター発現量によって規格化する方法などが提唱され、これらを組み合わせて用いることによって、寄与率の算出ができることが示されました^{3,4)}。このような報告が出たことで、発現細胞を用いた研究からヒト肝への取り込みを予測する方法論が、ある程度確立されたのではないかと思います。

6. トランスポーターレベルでの相互作用研究

前項に記しましたように、ヒト肝細胞を用いることができるようになったことから、トランスポーター機能について定性的な評価を行えるようになっていました。その当時、高脂血症治療薬セリバスタ

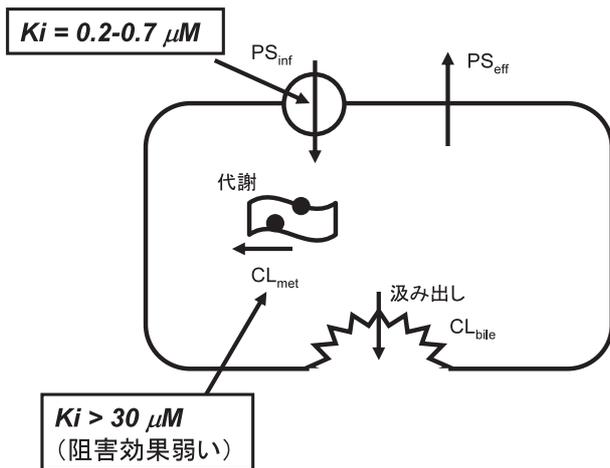


図2 セリバスタチンとシクロスポリンの相互作用メカニズム
シクロスポリンはセリバスタチンの代謝よりも、むしろトランスポーターを介した取り込みを阻害する。

チンが免疫抑制薬シクロスポリンと併用することによって、薬物間相互作用を受けることが報告されており、しかしながら、代謝阻害ではこの現象を説明することができないことが示唆されていました。そこで、私たちは、肝取り込みトランスポーターの阻害の可能性を考え、これを明らかにするための研究を始めました。当時は、トランスポーターが臨床で意味を持っていることを示すための重要な例の一つであると考えて、大変はりきって実験したことを覚えています。この実験の結果は、予想通り、シクロスポリンがセリバスタチンのトランスポーターを介した肝取り込みを阻害する一方で、代謝阻害はほとんど起こさないというものであり、トランスポーターレベルで生じた薬物間相互作用の例であることが示されました^{5,6)}(図2)。以前から、消化管や腎のP-糖タンパクを阻害することで生じる相互作用の例は数多く報告されていましたが、この例は肝取り込みトランスポーターの阻害が原因となって生じる臨床報告された相互作用の最初のものであろうと思います。最近では、医薬品添付文書にもこのような記載がなされるに至っています。

この研究を行っているときに、セリバスタチンがゲムフィブロジルという別の高脂血症治療薬との併用によって相互作用を受け、時には死に至るような重篤な有害事象の原因になっているという報告を受けました。この報告を受けて文献を調べたところ、ゲムフィブロジルはシンバスタチンやロバスタチン

のような他のスタチンとも相互作用を起こしており、これらの例ではラクトン型ではなく、開環したカルボン酸型の血中濃度が上昇していることがわかりました。シンバスタチンやロバスタチンの場合には、ラクトン型の方がむしろ代謝を受けやすいことから、代謝阻害ではないと考えました。そして、ラクトン型は脂溶性が高く、トランスポーターの影響を受けにくいのに対して、カルボン酸型であればトランスポーターによる肝取り込みの割合が大きいのではないかと考え、研究を進めました。すなわち、この研究を始めた当初は、トランスポーターレベルの相互作用であるという根拠がそれなりにあったわけですが、非常に、注目されている事例であっただけに、目を追うごとに、この相互作用に関する報告が増えており、PubMedを検索するときに、自分と同様のアプローチを行っている報告がないかと冷や冷やしていました。しかしながら、ゲムフィブロジルを使った実験を行ってみると、セリバスタチンの阻害および肝取り込みのいずれに対しても、臨床血中濃度の範囲では阻害が認められませんでした。そこで、ゲムフィブロジルの代謝物を合成し、それらを用いた研究を行ったところ、結果としては、トランスポーターではなく、CYP2C8を介した代謝をゲムフィブロジルのグルクロン酸抱合体が阻害するということが示されました⁷⁾。当初の予想とは異なっていたのですが、グルクロン酸抱合代謝物が代謝阻害するという考えは、意外なものでありました。その後、別の研究者により、このグルクロン酸抱合代謝物は、競合阻害ではなく、mechanism based inhibitionによる阻害を起こすことが示され、このために、臨床で重大な相互作用を起こしたということが示されております⁸⁾。

7. 今後の研究の展望

一昨年より千葉大学大学院に移り、これまでに私が入り組んできた薬物動態に関する研究だけでなく、研究室として行ってきた毒性研究に携わることになりました。最近では、私は薬物の体内動態と毒性を結びつけた研究を行っています。あまり結果は出ておりませんが、その中の一つが、薬物によるミトコンドリア障害と、薬物のミトコンドリア内への移行性をリンクさせた研究であります。このような薬物の細胞内動態ということは、毒性だけでなく、

薬効を考える上でも重要なのではないかと考えています。毒性の研究は、一つのメカニズムで説明されることが少ないので、考えるべき事が多岐にわたっており、研究として困難ではありますが、その分面白いのではないかと考えて取り組んでおります。

引用文献

- 1) Y. Shitara, A.P. Li, Y. Kato, C. Lu, K. Ito, T. Itoh, Y. Sugiyama, Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol 17 β -D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **18** (1), 33–41 (2003).
- 2) Y. Shitara, D. Sugiyama, H. Kusuhara, Y. Kato, T. Abe, P.J. Meier, T. Itoh Y. Sugiyama, Comparative inhibitory effects of different compounds on rat Oatpl (Slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport, *Pharm. Res.*, **19** (2), 147–153 (2002).
- 3) M. Hirano, K. Maeda, Y. Shitara Y. Sugiyama, Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311** (1), 139–146 (2004).
- 4) M. Hirano, K. Maeda, Y. Shitara Y. Sugiyama, Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1, *Drug Metab. Dispos.*, **34** (7), 1229–1236 (2006).
- 5) Y. Shitara, T. Itoh, H. Sato, A.P. Li, Y. Sugiyama, Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304** (2), 610–616 (2003).
- 6) Y. Shitara, M. Hirano, Y. Adachi, T. Itoh, H. Sato, Y. Sugiyama, *In vitro* and *in vivo* correlation of the inhibitory effect of cyclosporin A on the transporter-mediated hepatic uptake of cerivastatin in rats, *Drug Metab. Dispos.*, **32** (12), 1468–1475 (2004).
- 7) Y. Shitara, M. Hirano, H. Sato, Y. Sugiyama, Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the organic anion transporting polypeptide 2 (OATP2/OATP1B1: SLC21A6)-mediated hepatic uptake and CYP2C8-mediated metabolism of cerivastatin: Analysis of the mechanism of the clinically relevant drug-drug interaction between cerivastatin and gemfibrozil, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311** (1), 228–236 (2004).
- 8) B.W. Ogilvie, D. Zhang, W. Li, A.D. Rodrigues, A.E. Gipson, J. Holsapple, P. Toren, A. Parkinson, Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: Implications for drug-drug interactions, *Drug Metab. Dispos.*, **34** (1), 191–197 (2006).