

《若手研究者紹介》



肝取り込みトランスポーター Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1) を介した薬物間相互作用リスクの適正評価に向けた、*in vitro* 阻害試験に用いるプローブ基質の探索

和 泉 沙 希* Saki Izumi

エーザイ株式会社 筑波薬物動態研究室

1. は じ め に

元気だけが取り柄のじゃじゃ馬がやってきた、と少なからず思われたに違いない。製薬会社に入社し薬物動態室に配属になって早8年目、これまでのことを振り返ると顔から火が出るほど恥ずかしい出来事が一つや二つではない。それでもこうやって日々明るく仕事ができているのは、どんなに酷い失敗をしても諦めず指導してくださった上司や先輩方、頼りになる同僚、共同研究を通じて知り合った素晴らしい先生方、そしていつも味方になってくれる家族や友人の支えがあったからだと思う。

現在の仕事の紹介に入る前に、少し私のバックグラウンドについてお話ししたい。学生時代は薬品代謝化学教室にて長野哲雄現名誉教授、浦野泰照現教授のご指導の下、蛍光プローブを扱う研究に携わっていた。蛍光プローブとは、例えば活性酸素などのターゲット分子と選択的に反応し、その反応の前後で蛍光強度や蛍光波長が変化することでターゲット分子を可視化できる機能性小分子のことである。私の研究課題は活性酸素検出蛍光プローブの細胞内滞留性を向上させ高感度化するというものであり、新規の有機蛍光プローブを論理的設計・合成により開発

し、それを実際に用いて生細胞イメージングを行っていた。

それが一転、就職を機に薬物動態研究に携わることとなる。「薬物動態って面白そうだなあ、やってみるかっ」という直感と勢いだけで研究分野の壁を飛び越え、学生感覚のまま入社してしまったのだから、受け入れた会社側は大変である。この新人を育てていくのか、と愕然としたのは一人や二人ではないだろう。私自身も学生と社会人の研究アプローチのギャップに少なからず苦しんだ。仕事に対する自身の興味と業務上のニーズは必ずしも一致しないばかりか、仕事の緩急を自分ではコントロールできなかったことから、必然的に学生時代よりもタイムライン、仕事の優先順位とスピード感を強く意識するようになった。人間関係の構築にも一苦勞。製薬会社の研究所には若手からシニアまで多様な価値観を有するグローバルな人材が集っているため、高度なコミュニケーションスキルを駆使する必要がある。また専門分野の異なる者同士がチームを組んで仕事をする場合には、自分の専門に対して責任を負わねばならず、甘えは許されない。そのため、入社後数年間は理想と現実の狭間で戸惑うことが多く、会社の上司をはじめ多くの方々に多大なる迷惑と心配をかけたと思う。

そのような折に始まったのが、理化学研究所の杉山雄一先生を中心としたトランスポーターに関する共同研究であった。本研究活動を通じて会社での自分の立ち位置や強み、企業研究者としてのあり方を少しずつ見出し、また社外の人脈を広げていくこと

*平成 19 年 3 月東京大学薬学部薬学科卒、平成 21 年 3 月東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了、同年 4 月エーザイ株式会社入社、現在に至る。研究分野：薬物動態研究(主にトランスポーター研究)。研究のモットー：楽しく前向きに日々研究。趣味：旅行、ジョギング、水泳。連絡先：〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-1-3 E-mail: s-izumi@hhc.eisai.co.jp

ができた。今回はこの共同研究に端を発した、杉山雄一先生、東京大学大学院薬学系研究科の楠原洋之教授、前田和哉講師をはじめとする先生方、エーザイ株式会社の竹中理博士、小森高文博士、野崎芳胤博士とともに取り組んできた一連のトランスポーター研究について紹介したい。

2. 薬物トランスポーターとは

薬物トランスポーターは様々な臓器・組織に発現している膜蛋白質であり、生体内因子や薬物の細胞内外への輸送に関与している。肝臓や腎臓などの消失臓器においてトランスポーターを介して排泄される薬物が数多く報告されており、cytochrome P450 (CYP) などに代表される代謝酵素とともに薬物の主要な消失経路となっている。薬物トランスポーターの特徴として広い基質認識性を有することが挙げられる。このような特性は生体にとって異物である薬物を体外へ効率よく排泄する上で理にかなっているが、一方で複数の薬物を併用した際にトランスポーター分子上で異なる薬物同士が競合し得るため、薬物間相互作用を引き起こす原因の一つとなっている。実際に臨床においてトランスポーターを介した薬物間相互作用の事例が数多く報告されている。特に安全域の狭い薬物と併用される場合には、薬物間相互作用に起因する血中曝露量の上昇により重篤な副作用を惹起する恐れがあるため、医薬品候補化合物が薬物トランスポーターに対してどの程度の阻害活性を有するかを医薬品開発段階で定量的に評価することが大切である。日米欧の規制当局より近年発出された薬物相互作用に関する（ドラフト）ガイダンス・ガイドラインにおいても、トランスポーターを介した薬物間相互作用リスク評価の重要性が強調されている。

医薬品開発上重要なトランスポーターとして、肝臓のシヌソイド側膜に発現し、アニオン性化合物の血液から肝臓への取り込みに関与するOrganic Anion Transporting Polypeptide(OATP)ファミリートランスポーターが挙げられる。ヒト肝臓にはOATP1B1、OATP1B3 および OATP2B1 の3分子種が発現しているが、その中でもOATP1B1はスタチンなどの多くの薬物の肝取り込みに関与していること、臨床においてOATP1B1を介した薬物間相互作用が報告されていることから重要視されている。したがって医

薬品候補化合物は臨床用量でOATP1B1に対し阻害作用を示さないことが望ましく、*in vitro* OATP1B1阻害試験を創薬初期から継続的に運用し、探索合成化合物の優先順位付けに活用することが重要である。しかし、薬理・安全性・物性などの観点から、最終的に選出した化合物がOATP1B1に対して阻害活性を示すことも少なからずある。その場合には*in vitro* 阻害試験から得られた阻害定数 (K_i) と臨床PKの予測値あるいは実測データをもとに、当局のガイダンス・ガイドラインの決定樹にしたがった薬物間相互作用リスク評価が実施される。リスクありと判定された場合には臨床薬物間相互作用試験を実施し、OATP1B1臨床プローブ基質薬のPKに対する影響を確認することが求められている。

3. *In vitro* OATP1B1 阻害試験が抱えていた課題

OATP1B1に対する阻害活性を評価する際には、OATP1B1遺伝子を強制発現させた哺乳動物由来細胞が広く用いられている。プローブ基質のOATP1B1を介した細胞への取り込みを、被験物質存在・非存在下で検討し、取り込み量の減少に基づいて被験物質の阻害活性を評価する。前述のとおり、薬物間相互作用リスク評価は*in vitro* 試験で算出された K_i 値をもとに実施されるため、適切な試験デザインのもと信頼性の高い K_i 値を求めることがリスク評価の第一歩と言える。しかしながら、OATP1B1に対する K_i (あるいは IC_{50}) 値の報告値には大きなばらつきがあり、その一因として研究施設間で使用するプローブ基質の違いが考えられた。実際に、同一の阻害剤であっても、評価に用いる典型的プローブ基質の種類によってOATP1B1に対する阻害活性が大きく異なることが報告されていた¹⁾。このことは、選択したプローブ基質に依存して被験物質のOATP1B1に対する阻害活性を過大あるいは過小評価することを示唆するものであり、特に過小評価した場合には薬物間相互作用リスクを見逃し、臨床安全性上の問題につながる恐れがある。そこで我々は、このOATP1B1の基質依存的な阻害を様々な基質・阻害剤の組み合わせで検討し、OATP1B1を介した薬物間相互作用リスクを適正に評価し得る最適な*in vitro* プローブ基質を提案すべく、以下の検討を行った。

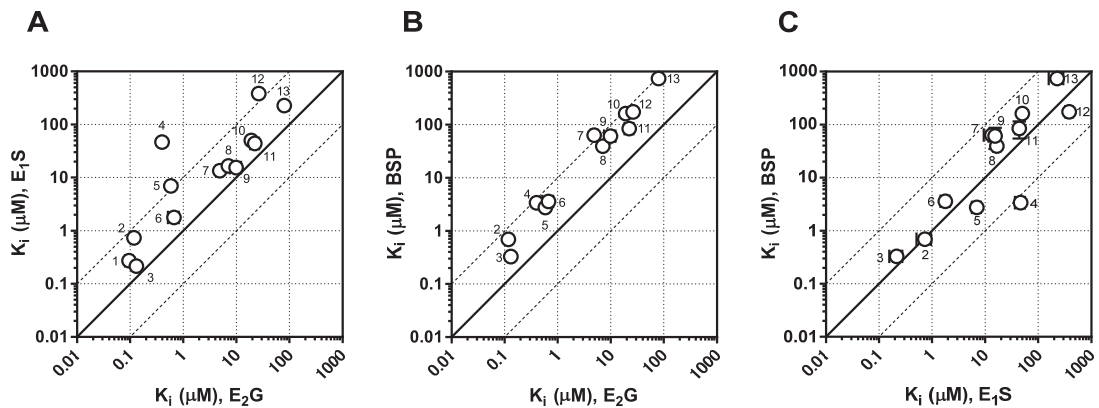


図1 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$, $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ および $[^3\text{H}]\text{BSP}$ をプローブ基質として用いて得られた OATP1B1 に対する K_i 値の比較

13 化合物 (1, E_1S ; 2, CsA; 3, BSP; 4, ritonavir; 5, rifampin; 6, tacrolimus; 7, erythromycin; 8, E_2G ; 9, ketoconazole; 10, taurocholate; 11, verapamil; 12, gemfibrozil; 13, probenecid) の OATP1B1 に対する K_i 値を, RI 標識された 3 つのプローブ基質 ($[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$, $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ および $[^3\text{H}]\text{BSP}$) に対して算出し, K_i 値を基質間で比較した. A) $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ の比較, B) $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ と $[^3\text{H}]\text{BSP}$ の比較, および C) $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ と $[^3\text{H}]\text{BSP}$ の比較. 文献 2) より引用.

4. 放射性同位体 (RI) 標識プローブ基質を用いた基質依存的な OATP1B1 阻害の検討

In vitro トランスポーター阻害試験においては RI 標識されたプローブ基質が好んで使用されてきた. RI 標識体を用いた評価は高感度であり, また定量分析法が簡便であることから, 特に当局への申請を目的とした試験に適していると言える. そこで我々は, OATP1B1 の典型的プローブ基質として古くから使用されてきた $[^3\text{H}]\text{estradiol-17}\beta\text{-glucuronide}$ (E_2G), $[^3\text{H}]\text{estrone-3-sulfate}$ (E_1S) および $[^3\text{H}]\text{sulfobromophthalein}$ (BSP) の 3 基質を用いて 13 化合物の OATP1B1 阻害活性を検討し, 得られた K_i 値を基質間で比較した²⁾. その結果, 同一の阻害剤であっても用いる基質によって OATP1B1 に対する K_i 値が大きく乖離し, 特に阻害剤 ritonavir, gemfibrozil, erythromycin の K_i 値はそれぞれ 117 倍, 14 倍, 13 倍も異なることが判明した. また臨床において OATP 阻害剤として使用される rifampin や cyclosporine A (CsA) の K_i 値もそれぞれ 12 倍, 6 倍の乖離を示した.

さらに, 得られた K_i 値を基質間で比較したところ, 全ての阻害剤の OATP1B1 に対する K_i 値は $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ を用いた場合に最も低い値を示すことが明らかとなった (図 1). 即ちこれら 3 基質の中では $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ が最も被験物質の OATP1B1 阻害活性を強く検出することができ, これを用いて得られる K_i

値をリスク評価に使用することで, 薬物間相互作用リスクを見逃す可能性が低減できると考えられた.

5. 臨床基質薬を用いた基質依存的な OATP1B1 阻害の検討

先の検討から E_2G が OATP1B1 を介した薬物間相互作用のリスク評価に適した *in vitro* プローブ基質であることが示唆されたが, E_2G は生体内物質であり薬物ではない. 当然, 薬物間相互作用のリスク評価は, 臨床で併用が予想される OATP 基質薬に対して行うことが望まれる. 仮に E_2G と OATP 基質薬の間に大きな K_i 値の乖離が認められ, 特に E_2G をプローブ基質として使用した際に薬物間相互作用リスクが過小評価されてしまう場合には, E_2G を阻害試験のプローブ基質として用いることは不適である. そこでスタチンを含む 15 の OATP 基質薬の OATP1B1 発現細胞への取り込みを検討し, それぞれの取り込みに対する 3 種類の典型的阻害剤 (CsA, rifampin および gemfibrozil) の K_i 値を評価し, E_2G の結果と比較した³⁾.

その結果, OATP 基質薬を *in vitro* プローブ基質として用いた際にも基質依存的な阻害が観察され, CsA, rifampin および gemfibrozil の OATP1B1 に対する K_i 値はそれぞれ 6.3 倍, 3.4 倍および 26 倍の乖離を示した. だが, OATP 基質薬を用いて得られた 3 阻害剤の K_i 値は, 一部の例外を除き, $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ をプローブ基質として得られた K_i 値の 3 倍の範囲内

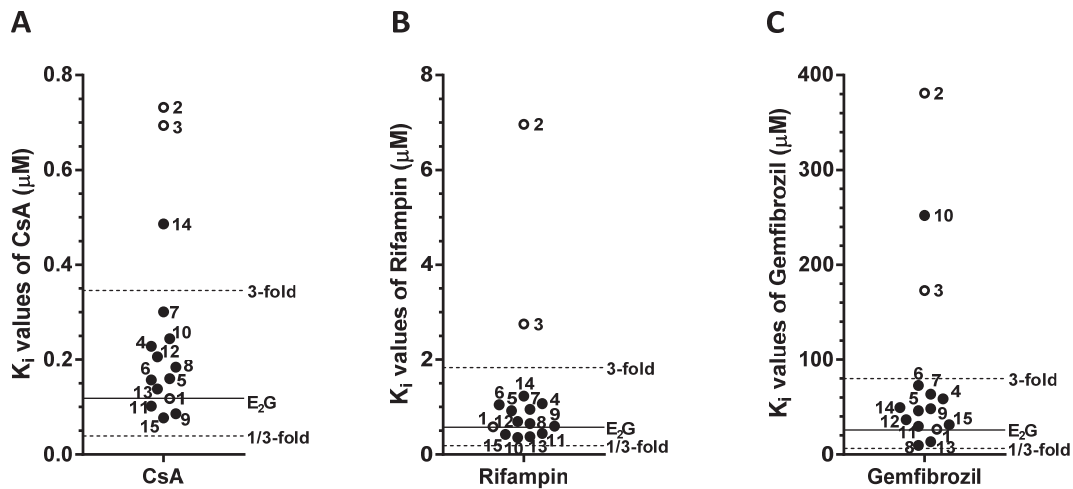


図2 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$, $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$, $[^3\text{H}]\text{BSP}$ および OATP 基質薬をプローブ基質として使用した時に得られた, CsA, rifampin および gemfibrozil の OATP1B1 に対する K_i 値の比較

A) CsA, B) rifampin, および C) gemfibrozil の OATP1B1 に対する K_i 値を, 15 種類のプローブ基質 (1, E_2G ; 2, E_1S ; 3, BSP; 4, pitavastatin; 5, atorvastatin; 6, fluvastatin; 7, rosuvastatin; 8, pravastatin; 9, repaglinide; 10, nateglinide; 11, glibenclamide; 12, bosentan; 13, valsartan; 14, torasemide; 15, fexofenadine) を使用して算出し, K_i 値を基質間で比較した. 文献 3) より一部改変し引用.

におさまっていた. 一方で, $[^3\text{H}]\text{E}_1\text{S}$ および $[^3\text{H}]\text{BSP}$ をプローブ基質として用いて得られた K_i 値は, OATP 基質薬を用いて得られる値よりも大きな K_i 値を示した (図 2).

さらに, 得られた K_i 値をもとに, 阻害剤 CsA, rifampin および gemfibrozil の OATP1B1 阻害リスク評価を当局の薬物相互作用ガイダンス・ガイドラインにしたがって実施したところ, E_2G は OATP 基質薬を用いた時と同等のリスク評価結果を与えることが確認された. 以上の結果から, E_2G は OATP 基質薬の代替基質として使用可能であり, かつ保守的な K_i 値算出を通じて薬物間相互作用リスクの過小評価の危険性を最小限に抑えることができることが確認でき, E_2G は OATP1B1 阻害試験に適した *in vitro* プローブ基質であると結論づけられた.

6. 新規蛍光プローブ基質を用いた OATP1B1 阻害評価系の樹立

E_2G は *in vitro* OATP1B1 阻害試験において理想的なプローブ基質と言えるが, RI 標識体として使用されるため安全性の面から取り扱いに注意を要し, さらにサンプル処理や測定に時間を要するためスループット性に課題が残されている. このような点は, ある程度限られた数の被験物質に対して実施される当局申請用試験では大きな問題とならないが, 創薬

初期の多検体スクリーニングには適さない. そこで高感度かつ高スループット性を両立し得る蛍光法に着目し, 特に創薬初期段階で有用な OATP1B1 阻害試験系の樹立を試みた⁴⁾.

これまでに OATP1B1 の蛍光基質はいくつか報告されていた. Chenodeoxycholy-(Nε-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole)-lysine (CDCA-NBD), cholyglycylamido-fluorescein (CGamF), および choly-L-lysyl-fluorescein (CLF) は胆汁酸を NBD や fluorescein などの蛍光団で修飾したものであるが, いずれも市販されておらず使用前に合成する必要がある. また, fluorescein や, fluorescein を蛍光団とした fluorescein methotrexate (FMTX) や 8-fluorescein-cAMP (8-FcA) は一般試薬として購入可能だが, OATP1B1 を介した十分な取り込み活性が見えない, あるいは試薬が高価でランニングコストが高くなるなどの点で必ずしも探索活用におけるニーズを十分に満たしていなかった. そこで我々は, pH 7.4 で負電荷を帯び, かつ強い蛍光を有する fluorescein 誘導体に着目し, 新規 OATP1B1 蛍光プローブ基質の探索を試みた. その結果, Oregon green, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), および 4',5'-dibromofluorescein の 3 化合物を新規 OATP1B1 蛍光プローブ基質として見出し, これら新規蛍光プローブ基質の OATP1B1 を介した取り込み活性は, 既知プローブ基質 (fluoro-

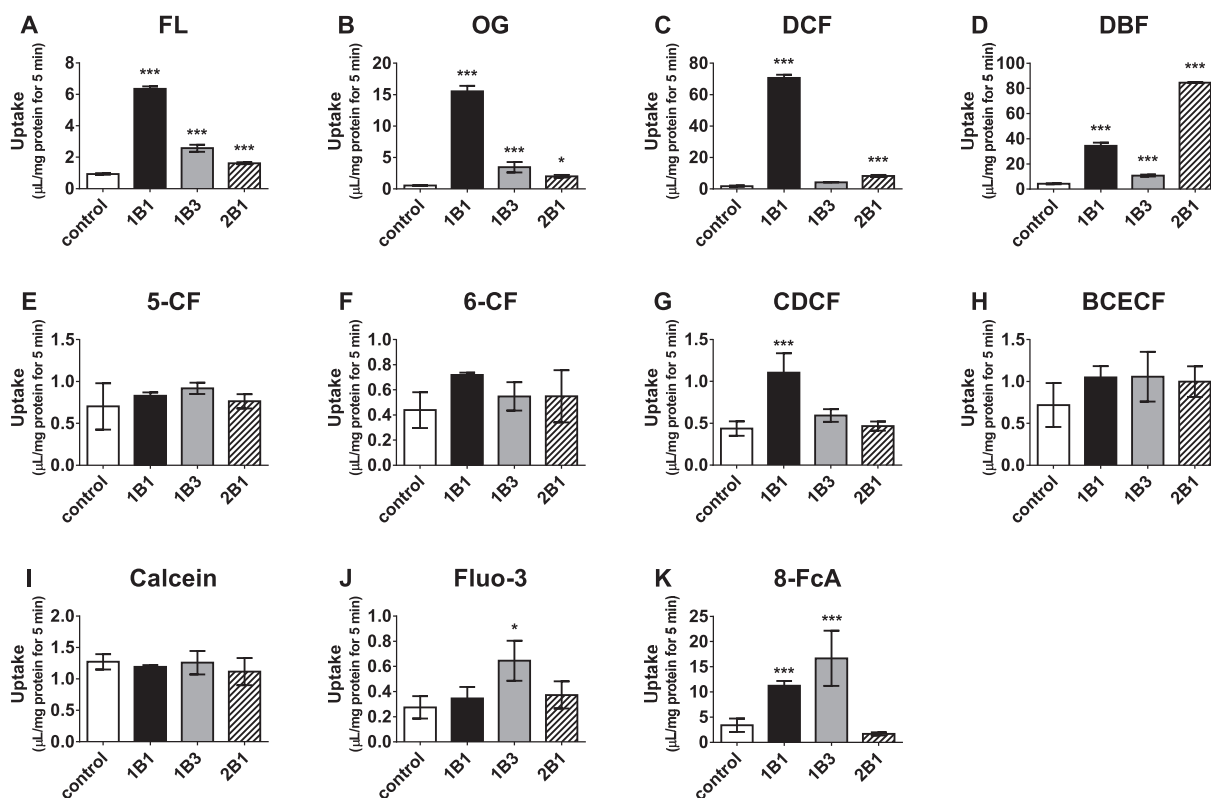


図3 Fluorescein および fluorescein 誘導体の OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 発現細胞および control 細胞への 5 分間の取り込み

A) fluorescein (FL), B) oregon green (OG), C) 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), D) 4',5'-dibromofluorescein (DBF), E) 5-carboxyfluorescein (5-CF), F) 6-carboxyfluorescein (6-CF), G) 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF), H) 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescein (BCECF), I) calcein, J) fluo-3, K) 8-fluorescein-cAMP (8-FcA). 文献4) より引用。

rescein, 8-FcA) と同等以上であることを明らかにした (図3)。

中でも OATP1B1 に対して最も大きな取り込み活性を示し、かつ、検出感度の点でも最も優れた DCF に着目し、DCF が果たして OATP1B1 阻害評価において OATP 基質薬や $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ の代替として用いることが可能か否か検討した。その結果 DCF を基質として用いて得られる各阻害剤の K_i 値と $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ を基質として用いて得られる K_i 値の間には非常に良好な 1:1 の相関があることが確認された (図4)。さらに DCF と E_2G は互いに競合阻害することから、いずれも OATP1B1 の同一の結合部位を介して取り込まれることが示唆された。以上より新規蛍光プローブ基質 DCF は、 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$ や臨床基質薬の代替として多検体評価に応用可能であることが示され、本阻害試験方法を用いることで薬物間相互作用リスクの低いより安全な医薬品の創出に、創薬初期から貢献できるものと期待される。

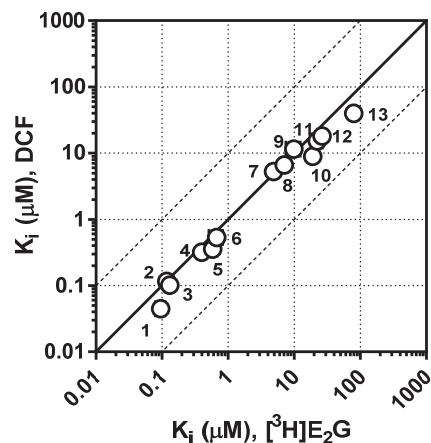


図4 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$, DCF をプローブ基質として用いて得られた OATP1B1 に対する K_i 値の比較

13 化合物 (1, E_1S ; 2, CsA; 3, BSP; 4, ritonavir; 5, rifampin; 6, tacrolimus; 7, erythromycin; 8, E_2G ; 9, ketoconazole; 10, TCA; 11, verapamil; 12, gemfibrozil; 13, probenecid) の OATP1B1 に対する K_i 値を、2つのプローブ基質 (RI 標識体 $[^3\text{H}]\text{E}_2\text{G}$, および蛍光プローブ基質 DCF) に対して算出し、 K_i 値を基質間で比較した。文献4) より引用。

7. お わ り に

これら一連の研究を開始した頃は、自分の興味の赴くまま夢中に実験を行っていた。最近は自分の興味は勿論、創薬現場における顕在的または潜在的なニーズを満たす研究を行いたいと考えている。例えば前臨床で薬物間相互作用リスク評価を実施する際には、医薬候補品のヒト体内動態予測が必要である。ヒト体内動態予測は薬物間相互作用だけでなく、臨床薬効量推定や安全域の議論にも関係するため非常に重要である。特にトランスポーター基質のヒト体内動態予測は難度が高いが、大いにやりがいのある研究だと感じ、現在意欲的に取り組んでいる。

また私には企業研究者として社業に貢献するだけでなく、科学の発展に貢献する責任があると感じている。私の発信できる情報は限られているかもしれないが、継続的に情報を発信し、薬物動態分野の発展の一助になりたいと考えている。

引 用 文 献

- 1) J. Noé, R. Portmann, ME. Brun, C. Funk, Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3, *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1308–1314 (2007).
- 2) S. Izumi, Y. Nozaki, T. Komori, K. Maeda, O. Takenaka, K. Kusano, T. Yoshimura, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17 β -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein, *Drug Metab. Dispos.*, **41**, 1859–1866 (2013).
- 3) S. Izumi, Y. Nozaki, K. Maeda, T. Komori, O. Takenaka, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, Investigation of the impact of substrate selection on *in vitro* organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions, *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 235–247 (2015).
- 4) S. Izumi, Y. Nozaki, T. Komori, O. Takenaka, K. Maeda, H. Kusuhara, Y. Sugiyama, Investigation of fluorescein derivatives as substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 to develop sensitive fluorescence-based OATP1B1 inhibition assays, *Mol. Pharmaceutics*, **13**, 438–448 (2016).