

氏名	もりた ときお 森田 時生
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2021年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	果汁飲料による小腸有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP)阻害作用の活性本体の探索とその阻害活性の検討
論文審査委員	(主査) 教授 大谷 壽一 (博士(薬学)) (副査) 教授 木内 文之 (薬学博士) 教授 登美 斉俊 (博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 【序論】

現在、医薬品の多くが経口剤として用いられている。このため、消化管吸収過程においては、薬物輸送担体などの薬物動態関連タンパク質の機能特性やその変動が、医薬品の有効性、安全性に影響を与える重要な因子となりうる。中でも、有機アニオン輸送ポリペプチド (organic anion transporting polypeptide: OATP) は solute carrier family に属する 12 回膜貫通型の薬物輸送担体であり、このうち、OATP1A2 と OATP2B1 は小腸、脳、肝臓、腎臓などの様々な組織に発現し、小腸においてはさまざまな薬物の消化管吸収に寄与している。

これら 2 種の OATPs は pH 依存的に輸送活性が変動することが知られている。例えば OATP2B1 の輸送活性は、体液に近い pH 7.4 と比べ、消化管吸収に寄与する小腸上皮の微小環境の弱酸性 (pH 6.3 など) 条件下で亢進する。また、OATP2B1 を含めいくつかの OATPs には multiple binding component が存在し、それらを介した薬物の輸送活性は pH 環境により変動することも明らかとなっている。しかし、これまでに、OATP1A2 における multiple binding component の存在の有無、またそれらを介した基質輸送および阻害剤感受性に対する pH の影響については明らかになっていない。

さらに小腸では、飲食物による OATP1A2 や OATP2B1 の阻害に起因する薬物相互作用 (DDI) が注目されている。たとえば、OATP1A2 と OATP2B1 の基質である fexofenadine をグレープフルーツジュース (GFJ) とともに経口投与した際、その area under the plasma concentration time curve (AUC) は 55% に低下することが報告されている。この GFJ 中の主な OATPs 阻害成分として、naringin が同定されているものの、GFJ に相当する濃度の naringin では、GFJ と fexofenadine の DDI を説明するには不十分とされており、未知の阻害成分の存在が示唆されている。また、GFJ 以外にもオレンジジュースやリンゴジュースにおいて同様の DDI が報告されて

いるものの、その他の果汁飲料については報告がない。従って、GFJ 中の未知の阻害成分や他の果汁中の阻害成分を同定し、OATPs と果汁との新たな相互作用を見出すことは、OATPs を介して吸収される医薬品と飲食物との潜在的な DDI のリスクを明らかにするという点で、臨床的にも意義深い。

本研究では、まず、OATP1A2 における **multiple binding component** の有無、またその生体内 pH と小腸微小環境 pH における輸送機能の変化を明らかにすることを目的に、OATP1A2 の pH 依存的輸送キネティクスおよび阻害剤感受性の変化を定量的に明らかにした。続いて、GFJ 中の新規 OATPs 阻害成分を探索し、新規の活性本体を同定するとともに、その阻害活性を定量的に評価した。さらに、同定された新規阻害成分を含むジャバラ (*Citrus × jabara*) 果汁やその他果汁飲料の OATPs 阻害活性を評価し、新規の飲食物-薬物相互作用の可能性を見出した。

## 第一章 OATP1A2 の詳細な輸送特性の解析

### 【背景・目的】

これまでに OATP1A2 の基質輸送に寄与する **multiple binding component** の有無、さらには、その輸送活性に対する pH 環境の影響については明らかになっていない。そこで、まず OATP1A2 の基質輸送機構の詳細を明らかにすることを目的に、**multiple binding component** の各 component の輸送キネティクスおよびそれらに対する pH の影響について評価した。さらに、既知の阻害剤を用いて、阻害剤の OATP1A2 輸送 component 選択性および阻害活性に対する pH の影響についても検討した。

### 【方法】

OATP1A2 安定発現 HEK293 細胞株 (HEK293-OATP1A2) および empty vector 導入細胞 (mock) を用いて、pH 6.3 および pH 7.4 にて、0.3-3,000  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] estrone 3-sulfate ( $\text{E}_1\text{S}$ ) の 1 min の取り込みをオイルレイヤー法にて評価した。阻害剤として gefitinib (10  $\mu\text{M}$ ), verapamil (100  $\mu\text{M}$ ), naringin (300  $\mu\text{M}$ ), sulfobromophthalein (BSP; 100  $\mu\text{M}$ ), levofloxacin (300  $\mu\text{M}$ ) および methotrexate (MTX; 300  $\mu\text{M}$ ) を用い、pH 6.3 または 7.4 における  $\text{E}_1\text{S}$  単独の取り込み (pH 6.3; 0.3, 300  $\mu\text{M}$ , pH 7.4; 0.3  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]  $\text{E}_1\text{S}$ ) に対する残存活性として評価した。

### 【結果・考察】

OATP1A2 の **multiple binding component** の輸送活性と pH 依存的な輸送キネティクスパラメータの変化

いずれの pH 条件においても OATP1A2 の E<sub>1</sub>S 濃度依存的な取り込みが観察された。さらに、Eadie-Hofstee plot より二相性の輸送特性を示した。また、pH 6.3 における高親和性 component のミカエリス定数 ( $K_m$ ) は、pH 7.4 と比べ約 8 倍小さく、親和性の亢進が認められた (5.62 vs 42.1  $\mu$ M)。以上より、OATP1A2 において multiple binding component からなる輸送特性が確認され、さらに、pH 低下に伴う輸送活性の上昇は、高親和性 component の基質親和性の亢進に起因していることが示された。

### OATP1A2 阻害活性に対する pH の影響

pH 6.3 条件下、0.3  $\mu$ M E<sub>1</sub>S では検討したすべての阻害剤で有意な阻害が認められたのに対して、300  $\mu$ M E<sub>1</sub>S 輸送は BSP を除くすべての阻害剤で阻害を示さなかった。つまり、これらの阻害剤は BSP を除きいずれも高親和性 component 特異的な阻害剤であることが示された。pH 7.4 では、BSP、gefitinib、levofloxacin の阻害活性は有意に減弱し、MTX による阻害は消失した。これは、pH 変化による高親和性 component の輸送寄与率の低下、あるいは、pH 変化による阻害剤の荷電状態の変化に起因する可能性が示唆された。以上より、OATP1A2 阻害剤の間で、阻害活性に対する pH の影響が異なることが明らかとなった。

## 第二章 果汁飲料中の新規 OATP1A2、OATP2B1 阻害成分の探索とその阻害活性の検討

### 【背景・目的】

これまでに、GFJ 中の OATPs 阻害成分について網羅的な探索は行われておらず、naringin 以外の成分については明らかになっていない。そこで本章では、GFJ から新規 OATPs 阻害成分を探索し、その阻害活性を定量的に評価した。続いて、GFJ 中から単離された新規 OATP1A2、OATP2B1 阻害成分である narirutin を多く含有するジャバラ果汁に着目した。ジャバラは近年花粉症に対する有効性が謳われ、健康食品として注目が集まっているが、ジャバラと医薬品との薬物相互作用についてはこれまでに検討がなされていない。そこで、ジャバラ果汁の OATPs 阻害活性を評価するとともに、naringin ならびにこれらのアグリコン naringenin を加えた各成分の阻害強度を比較した。

### 【方法】

#### GFJ 中からの narirutin の同定

市販の GFJ を HP-20 column chromatography (c.c.) により分離し、さらに silica gel c.c. および分取 HPLC を用いて分離・精製し narirutin を単離した。HPLC-UV

法を用いて GFJ 中の narirutin および naringin の濃度を定量した。

#### 阻害キネティクス解析

HEK293-OATP1A2, HEK293-OATP2B1 および mock 細胞を用いて、pH 6.3 条件下にて、0.3  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ] E<sub>1</sub>S および各濃度の阻害剤を 1 min 同時にインキュベーションし、E<sub>1</sub>S 単独の取り込みに対する残存活性として評価し、高または低親和性 component に対する IC<sub>50</sub> を算出した。阻害剤として、narirutin (0.3–600  $\mu\text{M}$ )、naringin (0.3–600  $\mu\text{M}$ )、naringenin (0.3–100  $\mu\text{M}$ )、果汁飲料 (1, 5% に希釈し、pH 6.3 に調整) を使用した。Narirutin の OATP1A2 および OATP2B1 に対する阻害様式は、50  $\mu\text{M}$  または 30  $\mu\text{M}$  narirutin 存在/非存在下の [ $^3\text{H}$ ] E<sub>1</sub>S 取り込み活性を指標に、競合/非競合阻害モデルにそれぞれ当てはめて決定した。また、基質として E<sub>1</sub>S および fexofenadine を用い、HEK293-OATP1A2 における OATP1A2 介在性輸送に対する 1, 5% ジャバラ果汁および GFJ の阻害活性を評価した。なお、いずれの基質も濃度は 0.3  $\mu\text{M}$  とし、取り込み時間はそれぞれ 1 min, 60 min とした。

#### **【結果・考察】**

##### GFJ 中の新規 OATPs 阻害成分 narirutin の同定とその阻害活性の検討

分取した画分のうち、強い OATP2B1 阻害活性を示した画分より新規 OATPs 阻害成分として narirutin を同定した。GFJ 中の narirutin と既知阻害成分 naringin の濃度はそれぞれ 264  $\mu\text{M}$ 、1260  $\mu\text{M}$  であった。

Narirutin と naringin の 0.3  $\mu\text{M}$  E<sub>1</sub>S 取り込み阻害活性は 300  $\mu\text{M}$  より高濃度では頭打ちが認められ、これらの二つの化合物は二つの輸送 component のうちの高親和性 component を特異的に阻害すると考えられた。一方、これらのアグリコン naringenin による阻害は、component 選択的な特徴はみられなかった。また、各成分の阻害活性は OATP1A2 で naringenin (IC<sub>50</sub> = 9.08  $\mu\text{M}$ ) > narirutin (22.6  $\mu\text{M}$ ) > naringin (33.9  $\mu\text{M}$ ) の順に強く、OATP2B1 でも同様に naringenin (IC<sub>50</sub> = 10.3  $\mu\text{M}$ ) > narirutin (18.2  $\mu\text{M}$ ) > naringin (37.0  $\mu\text{M}$ ) の順に強かった。すなわち、配糖体化は低親和性 component に対する相互作用を減弱させ、糖鎖の結合様式が OATPs の阻害活性に影響を及ぼすことが示唆された。また、各 IC<sub>50</sub> 値と GFJ 中の narirutin と naringin の濃度から推定した果汁の推定阻害率は、実際の果汁による阻害率と一致した。すなわち、GFJ による OATPs の阻害は、narirutin と naringin により定量的に説明可能であった。

また、narirutin はいずれの OATPs についても、競合阻害モデルの方が非競合阻害モデルよりも結果をより良好に説明できた。そのため、narirutin は競合的に両 OATPs を阻害すると考えられる。

### ジャバラ果汁の OATP1A2、OATP2B1 阻害活性

Narirutin を 440  $\mu\text{M}$  含有するジャバラ果汁は、5% の濃度で OATP1A2 と OATP2B1 の E<sub>1</sub>S 輸送をそれぞれ 33, 19% にまで阻害した。加えて、1, 5% ジャバラ果汁は OATP1A2 を介した 0.3  $\mu\text{M}$  fexofenadine 輸送をそれぞれ 72, 18% にまで阻害し、これは GFJ による阻害と同等だった。そのため、fexofenadine のような OATPs 基質薬とジャバラ（果汁）を併用した場合、前者の吸収が阻害される可能性が示唆された。

#### **【結論】**

本研究では、OATP1A2 において基質輸送に寄与する multiple binding component の存在を明らかにするとともに、その pH 依存的な輸送キネティクスの詳細を明らかとした。また、GFJ 中から新規の OATPs 阻害成分として narirutin を同定した。本研究で得られた知見は、OATPs 基質薬物による適正な薬物治療を行うための一助となることが期待される。

## 論文審査結果の要旨

申請者は、薬物の消化管吸収に関与していると考えられている 2 種の薬物トランスポーター、OATP (organic anion transporting polypeptide) 1A2 および OATP2B1 に着目し、薬物-飲食物間相互作用に関する新規情報の構築を目指した。まず申請者は、これら 2 種の OATPs の活性が pH によって影響を受けることの重要性に着目し、生体内 pH に近い pH 7.4 と、薬物吸収にかかる消化管微小環境に近い pH 6.3 の間でその輸送活性を比較するとともに、その輸送特性を解析した。その結果、両 OATPs の詳細な輸送特性、すなわち高親和性輸送と低親和性輸送の存在ならびに両輸送に対する pH の影響に関して、定量的な情報を新たに得ることができた。さらに、各条件下での阻害剤に対する感受性についても、定量的な情報を構築した。続いて、両 OATPs を介した薬物-飲食物相互作用に着目し、臨床上的影響が懸念されているグレープフルーツの果汁を、OATP2B1 阻害活性を指標に分離分画を進め、新規 OATPs 阻害成分として narirutin を単離同定するとともに、その阻害特性を詳細に解析した。これは、既知の阻害成分である naringin よりも強力な OATPs 阻害成分であった。続いて、narirutin を高濃度に含有する柑橘類としてジャバラを同定した。

これらの成果は、消化管における OATP1A2 および OATP2B1 を介した薬物-飲食物間相互作用の予測と回避に重要な情報を提供するとともに、新たな相互作用の可能性を示したものである、科学的にも臨床的にも重要な知見と判断できる。

申請者は令和 3 年 2 月 24 日に実施された論文審査会において上記の学位論文にかかる研究内容を発表した。続いて、研究の内容や関連知識に関する口頭試問が行われた。申請者は論文の内容および最新の知見に沿って、口頭試問に対して適切に回答した。

以上より、論文の内容ならびに申請者の関連領域における専門知識のいずれの観点においても、申請者は、博士（薬学）の学位を授与されるにふさわしいと判断された。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

1. Morita T, Akiyoshi T, Sato R, Katayama K, Yajima K, Kataoka H, Imaoka A, Sugimoto Y, Ohtani H. pH-Dependent transport kinetics of the human organic anion-transporting polypeptide 1A2. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2020; 35(2): 220-227.
2. Morita T, Akiyoshi T, Sato R, Uekusa Y, Katayama K, Yajima K, Imaoka A, Sugimoto Y, Kiuchi F, Ohtani H. Citrus fruit-derived flavanone glycoside narirutin is a novel potent inhibitor of organic anion-transporting polypeptides. *J Agric Food Chem.* 2020; 68(48): 14182–14191.