

| 報告番号 | 甲 乙 第 号 | 氏 名 | 森田 時生 |
|---|---------|-----|-------|
| <p>主論文題名： 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</p> | | | |
| <p>(内容の要旨)</p> <p>医薬品の経口投与は簡便で高いアドヒアランスが得られる投与経路であることから、多くの医薬品が経口剤として用いられている。そのため、消化管吸収過程を介した薬物相互作用 (DDI) は医薬品の有効性、安全性に影響を与える重要な因子となる。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、薬物の吸収、分布、排泄に寄与している。また、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、生体内 pH 7.4 の場合と比べ、消化管吸収に寄与する小腸局所の微小環境 pH 6.3 条件下で有意に上昇することが明らかとなっている。また、OATP2B1 を含めいくつかの OATPs には multiple binding component が存在し、それらは pH 環境により輸送活性が異なることも知られている。一方で、OATP1A2 については、multiple binding component の有無や、それらを介した基質輸送特性および阻害剤感受性に対する pH の影響は解析されていない。</p> <p>小腸に発現する OATPs は飲食物・薬物の相互作用部位としても注目されている。OATPs の阻害を介した代表的な DDI として、OATP1A2 と OATP2B1 の基質である fexofenadine は、グレープフルーツジュース (GFJ) と併用すると、経口投与後の area under the plasma concentration time curve (AUC) が 55% に低下することが報告されている。GFJ 中の OATPs 阻害成分としては naringin が同定されているものの、GFJ と同濃度の naringin 単独では、同程度の DDI を再現できないことから、GFJ 中には新規の阻害成分が存在する可能性がある。</p> <p>そこで本研究では、まず、OATP1A2 の典型的基質 estrone 3-sulfate を用いて、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。次に、GFJ による OATPs 阻害作用について、新規の活性本体を同定し、その阻害活性を定量的に評価した。さらに、新規阻害成分を含むジャバラ (<i>Citrus × jabara</i>) 果汁の 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。</p> | | | |

第一章 OATP1A2 の pH 依存的な輸送特性の解析

これまでに OATP2B1 など数種の OATPs は輸送キネティクスの異なる multiple binding component を有すること、さらにその輸送活性が pH 依存的に変動することが報告されている。しかし、OATP1A2 の基質輸送に寄与する multiple binding component の有無や、輸送活性に対する pH の影響については明らかになっていない。そこで、本章では OATP1A2 の基質輸送特性を詳細に明らかにすべく、代表的基質 estrone 3-sulfate の輸送活性を指標に、multiple binding component の輸送キネティクスおよびそれらに対する pH の影響を、小腸微小環境である pH 6.3 と生体内環境である pH 7.4 とで比較評価した。さらに、既知の阻害剤を用いて、阻害剤の 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。

まず、OATP1A2 安定発現 HEK293 細胞株を用いて、pH 6.3 と 7.4 における 0.3–3,000 μM estrone 3-sulfate の初期取り込み速度をオイルレイヤー法により評価した。Eadie-Hofstee plot より、OATP1A2 による estrone 3-sulfate 輸送はいずれの pH においても 2 相性が認められた。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 に比べて約 8 倍低下し、親和性の亢進が認められた (5.62 vs 42.1 μM)。すなわち、OATP1A2 においても、OATP2B1 と同様、親和性の異なる multiple binding component からなる輸送特性が明らかとなった。さらに、pH の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が寄与している可能性が示された。このことは、proton-gradient modulator である protonophore (FCCP) 曝露により細胞膜を介した proton 勾配の寄与を評価した結果、すなわち、pH 7.4 において OATP1A2 による estrone 3-sulfate 輸送は影響を受けず、pH 6.0 において約 65% に有意に低下したことからも支持された。

続いて、0.3 μM estrone 3-sulfate 輸送活性に対する gefitinib (10 μM), verapamil (100 μM), naringin (300 μM), sulfobromophthalein (BSP; 100 μM), levofloxacin (300 μM), methotrexate (300 μM) の影響を両 pH で比較した。その結果は pH 6.3 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。これと比較して pH 7.4 では、BSP、gefitinib、levofloxacin の阻害活性は有意に減弱し、methotrexate による阻害は消失した。すなわち、OATP1A2 阻害活性に対する pH の影響は、阻害剤間で異なることが明らかとなった。

以上の結果から、OATP1A2 の生理的機能やそれを介した薬物相互作用の評価には、適切な pH 環境下での基質輸送および阻害キネティクスの評価が必須である。

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

これまでに、GFJ 中の OATPs 阻害成分についての体系的・網羅的な探索は行われておらず、naringin 以外の阻害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。そして GFJ 中から新規 OATPs 阻害成分である narirutin を見出したため、これ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。

まず、GFJ をカラムクロマトグラフィーを用いて分離精製した。続いて、OATP1A2 または OATP2B1 安定発現 HEK293 細胞株を用いて、0.3 μM estrone 3-sulfate 取り込みに対する阻害活性を指標に阻害成分を探索した。その結果、新規 OATP1A2、OATP2B1 阻害成分として narirutin を同定した。また、narirutin と naringin、ならび naringenin の濃度依存的な OATP1A2、OATP2B1 阻害活性を評価した結果、各成分の阻害活性は OATP1A2 で naringenin ($\text{IC}_{50} = 9.08 \mu\text{M}$) > narirutin (22.6 μM) > naringin (33.9 μM) の順に強く、OATP2B1 でも同様に naringenin ($\text{IC}_{50} = 10.3 \mu\text{M}$) > narirutin (18.2 μM) > naringin (37.0 μM) の順に強かった。 IC_{50} と HPLC-UV 法を用いて定量したグレープフルーツジュース中の narirutin と naringin の含量から推定した 5% 果汁の推定阻害率は、OATP1A2 で 64%、OATP2B1 で 58% と、実際の 5% 果汁の阻害活性 (OATP1A2: $71 \pm 8.1\%$, OATP2B1: $61 \pm 17\%$) 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された。さらに、narirutin の OATPs に対する阻害様式を検討するために narirutin の存在/非存在下の濃度依存的な estrone 3-sulfate 取り込み活性を評価した。その結果、narirutin は両 OATPs を競合的に阻害することが明らかとなった。また、narirutin と naringin による阻害は両 OATPs で 300 μM から頭打ちが見られ、これらの阻害剤は高親和性 component を特異的に阻害するモデルで良好に説明できた。一方で、naringenin は単一の component を阻害するモデルで良好に説明できた。すなわち、アグリコンの配糖体化により OATPs の低親和性 component に対する親和性が低下する可能性が示唆された。

次に、narirutin を高濃度 (約 440 μM) に含有するジャバラ果汁による、OATP1A2 と OATP2B1 を介した 0.3 μM estrone 3-sulfate または 0.3 μM fexofenadine 輸送阻害活性を評価した。その結果、ジャバラ果汁はいずれの基質においても強力に両 OATPs 介在性輸送を阻害し、なかでも 5% ジャバラ果汁は OATP1A2 を介した fexofenadine 取り込みを 82% 阻害し

た。そのため、ジャバラ果汁は GFJ と同様に OATPs 基質薬物の消化管吸収を阻害することが示唆された。一方で、fexofenadine 取り込みに対する narirutin 単独での阻害活性 (IC_{50}) は、109 μM であり、ジャバラ果汁による阻害を説明できなかつた。従って、ジャバラ果汁には narirutin 以外にも OATPs を阻害する成分が含有されている可能性がある。

以上の通り、本研究では、OATP1A2 において基質輸送に寄与する multiple binding component の存在をはじめて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、さらに、ジャバラ (果汁) を新規薬物相互作用候補食品として見出した。本研究で得られた知見は、OATPs 基質薬物を介した薬物相互作用を回避し、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。