

有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 の輸送機能に及ぼす
経口分子標的抗がん薬の影響とその評価に関する研究

2017 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

【薬学】臨床薬学分野

小出 博義

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Hiroyoshi Koide, Masayuki Tsujimoto, Ai Takeuchi, Miyu Tanaka, Yoko Ikegami, Mayu Tagami, Syoko Abe, Miki Hashimoto, Tetsuya Minegaki, Kohshi Nishiguchi. Substrate-dependent effects of molecular-targeted anticancer agents on activity of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Xenobiotica*. [Online early access]. DOI: 10.1080/00498254.2017.1393582. Published Online: Nov 10, 2017. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00498254.2017.1393582?journalCode=ixen20> (accessed Dec 12, 2017). [第1章, 第2章, 第3章]

目次

序論.....	1
第1章 OATP1B1 を介した基質の取り込みに及ぼす分子標的抗がん薬の影響.....	7
第1節 緒言.....	7
第2節 実験方法.....	8
1. 試薬.....	8
2. 細胞.....	8
3. 試薬の調製.....	8
4. 細胞の継代.....	9
5. コラーゲンコート法.....	9
6. 細胞播種.....	10
7. 細胞内取り込み実験.....	10
8. 細胞内薬物量の定量.....	12
9. データ解析.....	15
第3節 結果.....	16
1. OATP1B1 を介した基質薬物の取り込みに及ぼす分子標的薬の影響.....	16
2. OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響における基質間の相関性および一貫性.....	19
第4節 考察.....	24
第5節 小括.....	27
第2章 OATP1B1 による基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響.....	28
第1節 緒言.....	28
第2節 実験方法.....	30
1. 試薬.....	30
2. 細胞.....	30

3.	試薬の調製.....	30
4.	細胞の継代.....	31
5.	コラーゲンコート法.....	31
6.	細胞播種.....	31
7.	細胞内取り込み実験.....	32
8.	細胞内薬物量の定量.....	33
9.	データ解析.....	36
第3節	結果.....	39
1.	OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすレンバチニブの濃度依存的な影響.....	39
2.	薬物相互作用指数予測.....	40
3.	OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響に関する速度論的解析.....	41
4.	HEK/Mock 細胞および HEK/OATP1B1 細胞におけるレンバチニブの細胞内取り込み.....	43
第4節	考察.....	44
第5節	小括.....	45
第3章	分子標的抗がん薬存在下での OATP1B1 基質輸送の速度論的解析.....	46
第1節	緒言.....	46
第2節	実験方法.....	47
1.	試薬.....	47
2.	細胞.....	47
3.	試薬の調製.....	47
4.	細胞の継代.....	48
5.	コラーゲンコート法.....	48
6.	細胞播種.....	48

7. 細胞内取り込み実験.....	49
8. 細胞内薬物量の定量.....	49
9. データ解析.....	52
第3節 結果.....	55
1. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすアフチニブの濃度依存的な影響.....	55
2. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすセリチニブの濃度依存的な影響.....	56
3. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすニンテダニブの濃度依存的な影響.....	57
4. 薬物相互作用指数予測.....	58
5. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼす分子標的薬の影響に関する速度論的解析.....	60
第4節 考察.....	63
第5節 小括.....	65
総括.....	66
謝辞.....	68
引用文献.....	69

略語一覽

AIC	Akaike's information criterion
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ANOVA	Analysis of Variance
AUC	Area under the curve
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSA	Bovine serum albumin
BSEP	Bile salt export pump
C_{\max}	Maximum plasma concentration
CYP	Cytochrome P450
DCF	2',7'-dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E_1S	Estrone-3-sulfate
E_2G	Estradiol-17 β -glucuronide
EC_{50}	Half-maximal (50%) effective concentration
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European Medicines Agency
E_{\max}	Maximal effect
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fluorescein
f_u	Unbound fraction in blood
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
IC_{50}	50% inhibitory concentration

$[I]_{u,inlet,max}$	Estimated maximum unbound concentration at the liver inlet
K_i	Inhibition constant
K_m	Micaelis-Menten constant
MHLW	Ministry of Health, Labor and Welfare
MRP	Multidrug resistance protein
MULTI	The name of a nonlinear least squares program
NTCP	Sodium taurocholate co-transporting polypeptide
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
PBS	Phosphate buffered saline
P-gp	P-glycoprotein
PGT	Prostaglandin transporter
PS-mix	Penicillin-streptomycin mixture
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
V_{max}	Maximum velocity
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UPW	Ultrapure water

序論

臨床現場では、原疾患や合併症の治療のため複数の薬物が処方される場合が多く、併用薬物、飲食物または嗜好品との薬物相互作用に注意を払わなければならない。経口投与された薬物は小腸上皮細胞から取り込まれた後、小腸上皮細胞または肝細胞において代謝され、代謝を逃れた薬物が全身循環へと入る。全身循環に入った薬物は未変化体または肝臓で代謝された後、尿中または胆汁中に排泄される。そのため、薬物相互作用は消化管、肝臓または腎臓で生じることが多く、バイオアベイラビリティや全身クリアランスが変動する結果、併用薬物の有効性低下や有害事象増大を招いてしまう。薬物相互作用は、シトクロム P450 (CYPs)、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGTs) をはじめとする薬物代謝酵素を介するものや P 糖タンパク質 (P-gp) や有機アニオン輸送ポリペプチド (OATPs) をはじめとする薬物トランスポーターを介するものが代表的である。また、このような薬物代謝酵素や薬物トランスポーターは広範な基質認識性を有するものも存在するため、一つのタンパク質の機能変動が薬物の薬理作用による枠組み、すなわち構造類似性を超えて影響することに留意しなければならない。したがって、薬物相互作用を回避するためには、対象薬物が薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの機能に及ぼす影響を適切に評価しなければならない。

肝臓は、薬物の主たる代謝臓器であると同時に、生体内成分の解毒にも関与している。多くの薬物および生体内成分は、CYPs や UGTs などにより代謝され、胆汁排泄または尿中排泄されることで体内から消失する。また、薬物トランスポーターも同様に薬物および生体内成分の消失に関与している。肝臓類洞側膜における肝細胞内への取り込みには OATPs、有機カチオン輸送体 (OCT) 1 およびナトリウムタウロコール酸共輸送ポリペプチド (NTCP) といった取り込みトランスポーターが、肝細胞内から胆管への分泌輸送には P-gp、乳がん耐性タンパク質 (BCRP) および多剤耐性関連タンパク質 (MRP) 2 といった排泄トランスポーターがそれぞれ関与している¹⁾ (Figure 1)。

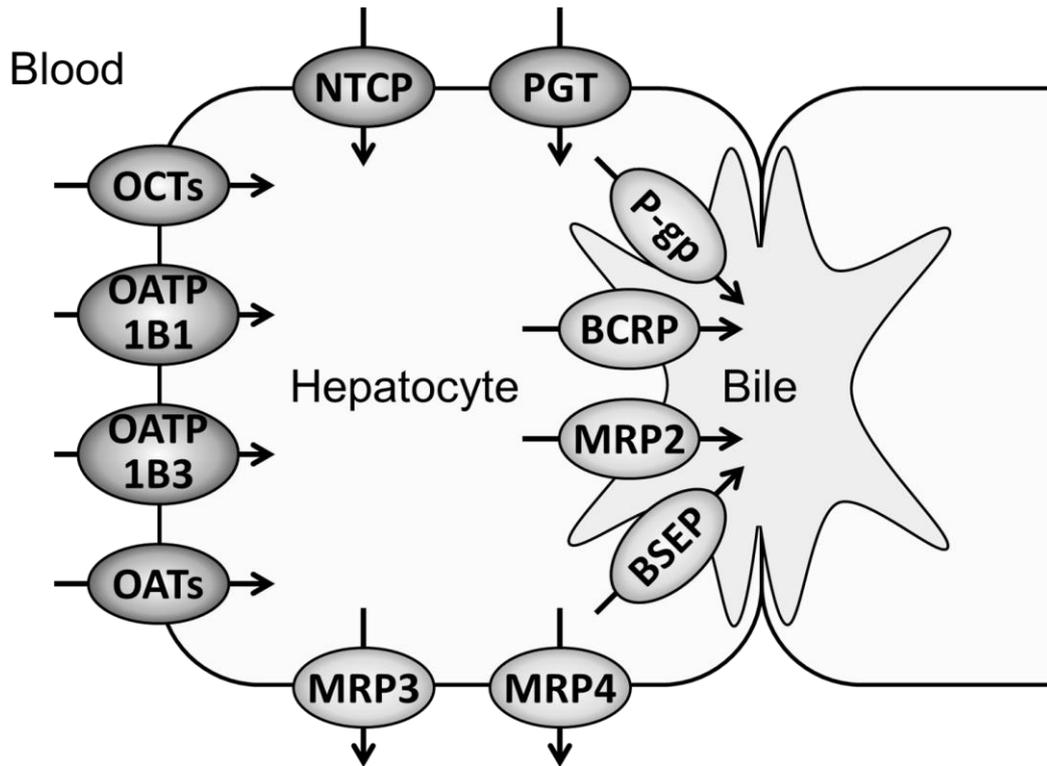


Figure 1. Basolateral and canalicular transporters in human liver

BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; MRP, Multidrug resistance protein; NTCP, Sodium taurocholate co-transporting polypeptide; OAT, Organic anion transporter; OATP, Organic anion transporting polypeptide; OCT, Organic cation transporter; P-gp, P-glycoprotein; PGT, Prostaglandin transporter

肝臓に発現する薬物トランスポーターのうち、ヒト肝臓類洞側膜に選択的に発現する OATP1B1 は、12 回膜貫通型の取り込みトランスポーターであり、広範な薬物を基質認識することが知られている²⁾。OATP1B1 の代表的な基質薬物として、アトルバスタチンやプラバスタチンといった HMG-CoA 還元酵素阻害薬、レパグリニドやナテグリニドといった速攻型インスリン分泌促進薬、バルサルタンやオルメサルタンといったアンギオテンシン II 受容体拮抗薬およびイリノテカン活性代謝物 SN-38 やメトトレキサートといった抗がん薬などが挙げられる。また、OATP1B1 は、ビリルビンやそのグルクロン酸抱合体、胆汁酸、ステロイドの硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体、甲状腺ホルモンなどの生体内成分も基質として認識する³⁾。Yamazaki らは、HMG-CoA 還元酵素阻害薬およびアンギオテンシン II 受容体拮抗薬において、ヒトにおける *in vivo* 肝固有クリアランスは、ヒト凍結肝細胞により得られた肝取り込みの固有クリアランス値から予測可能であることを報告している^{4,5)}。すなわち、このような OATP1B1 基質薬物では、OATP1B1 を介した取り込み過程が肝消失における律速過程であることを示しており、OATP1B1 は様々な薬物の体内動態を規定する重要な因子の 1 つであると考えられている。

OATP1B1 の輸送機能は、遺伝的多型、特殊病態および併用薬物によって変動することが知られている。まず遺伝子多型の影響について記せば、OATP1B1 の輸送能低下を示す *SLCO1B1* の T521C 変異アレル⁶⁾ を有する患者ではアトルバスタチン⁷⁾ や SN-38⁸⁾ などの OATP1B1 基質薬物の血中濃度が増大することが報告されている (Table 1)。また、*SLCO1B1* 遺伝子の T521C 変異アレルを有する患者ではシンバスタチンによる横紋筋融解症のリスク増大⁹⁾ やイリノテカンによる重篤な好中球減少症のリスク増大⁸⁾ などが報告されている。

Table 1. Clinical pharmacogenomics study for the *SLCO1B1*

Drug	No. of subjects divided by <i>SLCO1B1</i> c.521T>C	AUC (increase)	Ref.
Atorvastatin	TT/TC/CC=16/12/4	CC vs TT; 144%, TC vs TT; 52%	7)
Pravastatin	TT/TC/CC=16/12/4	CC vs TT; 91.2%, TC vs TT; 9.6%	10)
Rosuvastatin	TT/TC/CC=16/12/4	CC vs TT; 65.0%, TC vs TT; 57.6%	7)
SN-38	TT/TC/CC=55/23/3	TC+CC vs TT; 28.7%	8)
Methotrexate	TT/TC/CC=61/20/1	CC vs TC+TT; 310%	11)
Repaglinide	TT/CC=12/8	CC vs TT; 56-108%	12)
Nateglinide	TT/TC/CC=11/4/2	CC vs TT; 108%, TC vs TT; 82%	13)
Fexofenadine	TT/TC/CC=10/8/2	CC vs TT; 127%, CC vs TC; 76%	14)

AUC, Area under the curve

次に特殊病態時の変化について記す。SN-38¹⁵⁾、ロスバスタチン¹⁶⁾ およびレパグリニド¹⁷⁾ は、いずれも肝消失型薬物であるにも関わらず、それらの血中濃度は重篤な腎機能障害時に増大することが報告されている。これらの現象は、重篤な腎機能障害時において血中に高濃度に蓄積するフラン化合物やインドール化合物などのタンパク結合性の高い尿毒症物質が OATP1B1 の輸送活性を低下させることに一部起因すると考えられている^{18,19)}。さらに、併用薬物による薬物相互作用について記す (Table 2)。HMG-CoA 還元酵素阻害薬とゲムフィブロジルまたはシクロスポリンの併用は代表的な薬物相互作用事例であり、本相互作用は重篤な有害事象である横紋筋融解症の発症、時として死を招く場合があると報告されている²⁰⁻²²⁾。これはゲムフィブロジルおよびシクロスポリンが OATP1B1 を介した HMG-CoA 還元酵素阻害薬の肝取り込みを抑制するためであると考えられている^{23,24)}。また、C 型肝炎治療薬であるシメプレビルは、高頻度で高ビリルビン血症を誘発することが報告されている²⁵⁾。こ

れは、シメプレビルが OATP1B1 を介したビリルビンの肝取り込みを阻害するためと考えられ²⁶⁾、この報告と一致して、シメプレビルの併用は OATP1B1 基質薬物であるシンバスタチン、アトルバスタチンおよびロスバスタチンの血中濃度を顕著に増大させることが知られている²⁷⁾。以上のように、遺伝子多型、病態、および併用薬物が OATP1B1 の基質薬物や内因性成分の肝固有クリアランスに影響を与え、それらの体内動態を変動させることで有効性の低下または有害事象の増大をもたらす例も少なくない。したがって、OATP1B1 の活性変動には CYPs 同様に細心の注意が必要である。

Table 2. Clinical drug-drug interactions between OATP1B1 substrate and inhibitor

Drug	Inhibitor	AUC (increase)	Ref.
Atorvastatin	Cyclosporine	770%	28)
Pitavastatin	Cyclosporine	300%	29)
Pravastatin	Cyclosporine	890%	30)
Rosuvastatin	Cyclosporine	610%	31)
SN-38	Cyclosporine	20–630%	32)
Methotrexate	Cyclosporine	20%	33)
Repaglinide	Cyclosporine	140%	34)
Fexofenadine	Rifampicin	210–250%	35)

AUC, Area under the curve

近年、科学技術の進歩により、数多くの分子標的抗がん薬 (分子標的薬) が登場している³⁶⁾。分子標的薬は、Bcr-Abl 融合遺伝子や anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子のようにがん細胞に特異的に発現する因子、または、上皮増殖因子受容体 (EGFR) や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のようにがん細胞に過剰に発現する因子を標的とするため、既存の細胞障害性の抗がん薬と比較して有害事象が少ないと考えられる。イマチニブやソラフェニブなどの小分子の分子標的薬は長期間継続的に経口投与されることが多く、このことは抗がん薬治療を入院治療から外来治療へのシフトに繋がっている。その反面、分子標的薬と基礎疾患または合併症の治療薬との薬物相互作用に十分注意する必要がある。分子標的薬は適応患者に限られるため、薬物相互作用の臨床報告は必ずしも多くはないものの、分子標的薬の併用が他の抗がん薬の体内動態を変動させることがいくつか報告されている (Table 3)。たとえば、イリノテカン静脈内投与患者において、分子標的薬であるソラフェニブやレゴラフェニブ服用時における SN-38 の血中濃度は、非併用時と比較して有意に高いことが報告されている^{37, 38)}。SN-38 およびドセタキセルはいずれも OATP1B ファミリーの基質であることから^{39, 40)}、これら分子標的薬は

OATP1B1 の輸送機能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

Table 3. Clinical drug interaction between OATPs substrate and morecular-targeted agents

Morecular-targeted agents	Drug	AUC (rate of change)	Ref.
Pazopanib	SN-38	20% increase	41)
Sorafenib	SN-38	67-120% increase	37)
Regorafenib	SN-38	44% increase	38)
Cediranib	SN-38	No change	42)
Axitinib	Docetaxel	55% increase	43)
Pazopanib	Docetaxel	57% increase	44)
Sorafenib	Docetaxel	36–80% increase	45)
Afatinib	Docetaxel	No change	46)
Cediranib	Docetaxel	No change	42)
Nintedanib	Docetaxel	No change	47)

AUC, Area under the curve

In vitro 実験においても、OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響が報告されている。たとえば、ゲフィチニブ⁴⁸⁾、パゾパニブ⁴⁹⁾ およびソラフェニブ⁵⁰⁾ が OATP1B1 の輸送活性を阻害すること、また、ニロチニブ⁵¹⁾、ソラフェニブ⁵²⁾ およびレゴラフェニブ⁵³⁾ が OATP1B1 の基質となることがそれぞれ報告されている。しかしながら、OATP1B1 の輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響は、*in vitro* 実験間で必ずしも一致した見解を得られていないことが問題である。たとえば、ニロチニブおよびソラフェニブは、Hu らの報告⁵⁰⁾ では OATP1B1 を介した estradiol-17 β -glucuronide (E₂G) の輸送を阻害する一方で、Johnston らの報告⁵⁴⁾ では OATP1B1 輸送を介した estrone-3-sulfate (E₁S) を阻害しないことが報告されている。このような *in vitro* 実験間の相違は、選択した基質の種類などの実験条件の違いが影響していると推察されるが、その原因は不明である。

そこで本研究は、OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響を明らかにすることを目的とした。第1章では、OATP1B1 安定発現細胞および複数の OATP1B1 基質を用いた *in vitro* 実験により、OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響を5種類の基質を用いて網羅的に評価した。第2章では、OATP1B1 輸送活性に対して強力な阻害作用を示したレンバチニブについて、OATP1B1 により輸送されるか否か

を明らかにすると共に、他の OATP1B1 基質に対する阻害について検討を行った。また、レンバチニブが臨床において到達する濃度範囲内で OATP1B1 を介した相互作用を引き起こすか否かについても合わせて検討した。第3章では、基質により OATP1B1 輸送機能への影響が異なったアフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブについて基質濃度依存実験および速度論的解析を行った。また、これら分子標的薬が臨床において到達する濃度範囲内で OATP1B1 を介した相互作用を引き起こすか否かについても合わせて検討した。

以下、得られた結果を3章にわたり知見する。

第1章 OATP1B1 を介した基質の取り込みに及ぼす分子標的抗がん薬の影響

第1節 緒言

Tamai ら⁵⁵⁾ は、OATP1B1 を介した E₁S の輸送を Eadie-Hofstee プロットを用いて解析した結果、OATP1B1 を介した E₁S の輸送には高親和性で低容量の基質結合部位と低親和性で高容量の基質結合部位が存在することを報告している。このことは、OATP1B1 は複数の基質結合部位を有することを示唆している。また、一部の OATP1B1 阻害薬において、OATP1B1 に対する阻害作用の程度は基質の種類により大きく異なることが報告されている^{56, 57)}。たとえば、フィブラート系薬物であるゲムフィブロジルは、OATP1B1 を介したフルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチンおよびタウロコール酸の輸送を阻害する一方で、OATP1B1 を介した E₁S およびトログリタゾン硫酸の輸送を阻害しない⁵⁶⁾。これらの報告は、OATP1B1 の阻害作用に明確な基質依存性が存在することを示唆しており、不適切な基質選択が OATP1B1 に対する阻害作用を評価する上で誤った結果を導く可能性を孕んでいる。しかしながら、OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響について基質の種類に着目した検討は行われておらず、OATP1B1 輸送機能に対して基質依存的な影響を有するか否かは不明である。

そこで、本章では OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響を明らかにすることを目的として、OATP1B1 を介した輸送に及ぼす分子標的薬の影響について複数の基質薬物を用いて網羅的に比較検討した。

第2節 実験方法

1. 試薬

アトルバスタチン、カンプトテシン、2',7'-ジクロロフルオレセイン (DCF)、フルオレセイン (FL)、SN-38、バルサルタン、テルミサルタン、ロスバスタチンおよび酪酸ナトリウムは、Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) より購入した。アフアチニブ、セリチニブ、ニロチニブおよびレゴラフェニブは MedChem Express (Monmouth Junction, NJ, USA) より、カボザンチニブは Chem Scene (Monmouth Junction, NJ, USA) より、セジラニブは LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) より、ネラチニブ、ニンテダニブおよびソラフェニブは LC Laboratories (Woburn, MA, USA) より、レンバチニブ、パゾパニブおよびチバンチニブは AdooQ Bioscience (Irvine, CA, USA) より、それぞれ購入した。リファンピシンは、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より購入した。その他の試薬は試薬特級グレードまたは HPLC グレードのものを使用した。

2. 細胞

ヒト胎児由来腎臓 (HEK293) 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (Tokyo, Japan) より購入した。なお、実験には OATP1B1 を安定発現させた HEK293 細胞 (HEK/OATP1B1 細胞) および空のベクターが導入された HEK293 細胞 (HEK/Mock 細胞) をそれぞれ使用した¹⁹⁾。

3. 試薬の調製

1) 細胞培養液の調製

Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 粉末培地および NaHCO₃ (終濃度 44.0 mM) を発熱性物質を除去した超純水 (pf-UPW) 1L に溶解した後、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (PS-mix, 終濃度 Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) 10 mL および MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x) (終濃度 0.1 mM, Nakalai Tesque) 10 mL を添加した。この時、HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞では、G418 (終濃度 0.72 mM, Nakalai Tesque) を添加した。クリーンベンチ内で、その混合液を 0.22 µm のメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌した後、0.45 µm のメンブレンフィルターを用いて濾過滅菌した非動化済みのウシ胎児血清 (FBS, 終濃度 10%, Lot No. AXM56561 および AAJ208538, Thermo Fisher scientific K.K., Waltham, MA, USA) 100 mL を添加し、細胞培養液を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存し、細胞培養時には温浴で 37°C に加温したものを用いた。

2) HEPES-HBSS (HEPES-Hank's balanced salt solution buffer) の調製

NaCl 4.00 g, KCl 0.20 g, CaCl₂ 0.07 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, MgCl₂·6H₂O 0.05 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.054g, KH₂PO₄ 0.03g, NaHCO₃ 0.176 g, Glucose 0.50 g および 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) 2.98 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、1M NaOH で pH 7.4 とし、HEPES-HBSS を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

3) PBS (Phosphate-buffered saline) の調製

NaCl 4.00 g, KCl 0.10 g, KH₂PO₄ 0.10 g および Na₂HPO₄·12H₂O 1.448 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、PBS (-) を調製した。この時、PBS (+) は CaCl₂ (終濃度 0.9 mM)、MgCl₂ (終濃度 0.5 mM) を添加した。滅菌 PBS (-) 調製の場合は、121 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

4. 細胞の継代

あらかじめ細胞培養液および滅菌 PBS (-) 溶液は 37°C に加温し、Trypsin-EDTA 溶液は室温に戻した。10 cm ディッシュの細胞培養液を吸引除去後、滅菌 PBS (-) 溶液により 2 回洗浄した。Trypsin-EDTA 溶液 2 mL を添加して、37°C で数分間加温することでディッシュから細胞を剥離した。細胞培養液 8 mL を添加し、190×g で 6 分間遠心分離した。上清除去後に得られたペレットを細胞培養液 10 mL で懸濁し、10 cm ディッシュ (培養面積 55 cm², IWAKI AGC Techno glass Co., Ltd., Chiba, Japan) に播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。

5. コラーゲンコート法

細胞接着と伸展の促進を目的として、株式会社ニッピ (Tokyo, Japan) のコラーゲンコート培養方法に従って、24 穴細胞培養プレート (培養面積 1.9 cm², Corning Inc., Corning, NY, USA) および 12 穴細胞培養プレート (培養面積 3.8 cm², Corning Inc.) にコラーゲン処理を行った。すなわち、ウシ真皮由来 I 型コラーゲン (3 mg/mL) に濾過滅菌済 5 mM 酢酸を加え 300 倍希釈した溶液 (10 µg/mL, 24 穴細胞培養プレート) または 150 倍希釈した溶液 (20 µg/mL, 12 穴細胞培養プレート) を、0.5 mL ずつ各穴に添加した。30 分静置後、内容液を吸収除去した。その後 30 分間風乾させ、PBS (-) 0.5 mL で 3 回洗浄し細胞播種に用いた。

6. 細胞播種

HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞をコラーゲン処置済 24 穴細胞培養プレート (0.5×10^5 cells/mL/well) または 12 穴細胞培養プレート (1.5×10^5 cells/mL/well) に播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下にて培養した。3 日間後、遺伝子発現を活性化させる目的でヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である酪酸ナトリウム (終濃度 5mM) 含有細胞培養液に交換し、培養した⁵⁸⁾。翌日、細胞内取り込み実験を第 1 章第 2 節 7. に示すとおり行った。

7. 細胞内取り込み実験

細胞内取り込み実験は、既報に準じて行った¹⁹⁾。アトルバスタチン⁷⁾ および SN-38⁸⁾ の血中濃度は OATP1B1 の機能低下型の遺伝子多型の保因者において有意に高いこと、バルサルタンの血中濃度⁵⁹⁾ は OATP1B1 の活性増大型の遺伝子多型の保因者において低下傾向にあることがそれぞれ報告されている。そのため、本検討では臨床試験において肝消失における OATP1B1 の重要性が示されているアトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンをハイスループット性に優れる蛍光化合物である FL⁶⁰⁾ および DCF⁶⁰⁾ に加えて検討した (Figure 2)。

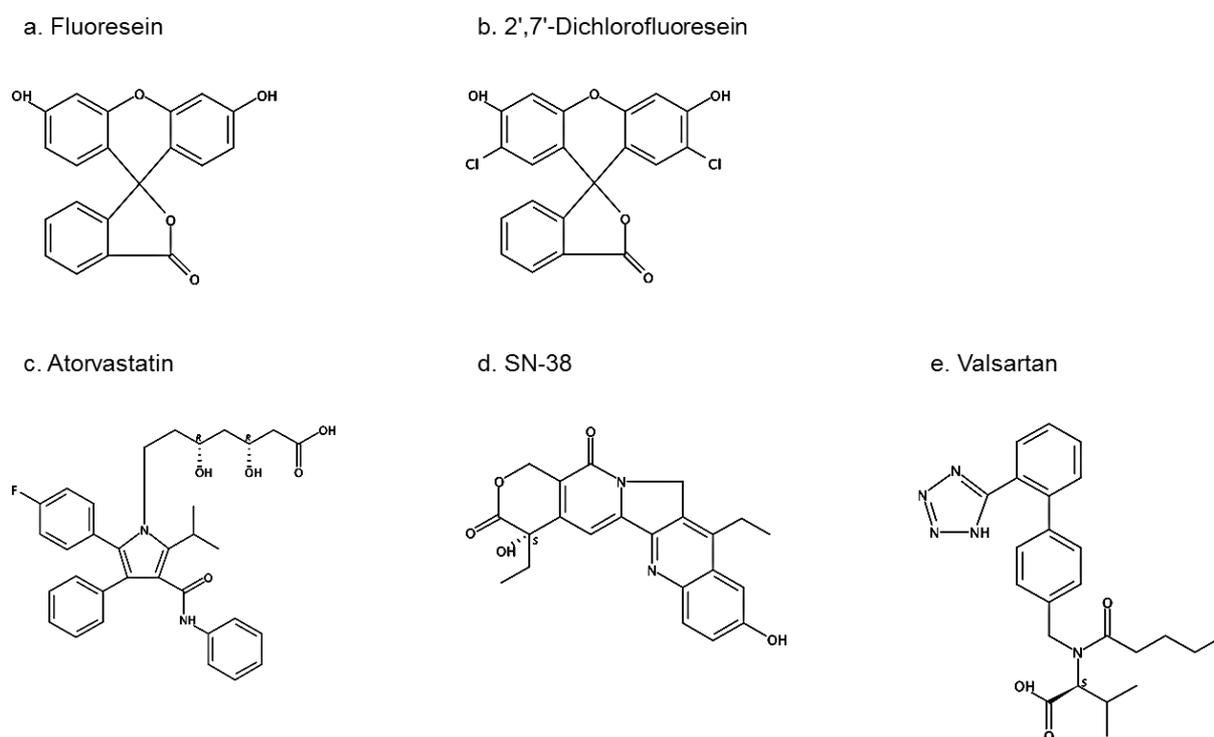


Figure 2. Structural formulas of selected OATP1B1 substrates.
Structural formulas were acquired through a SciFinder database search.

分子標的薬は、各疾患治療において臨床上有用性が高いと考えられるもの（アファチニブ、カボザンチニブ、セジラニブ、セリチニブ、レンバチニブ、ネラチニブ、ニロチニブ、ニンテダニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、ソラフェニブおよびチバンチニブ: Figure 3) を選択した。OATP1B1 阻害のポジティブコントロールとしてリファンピシン⁶¹⁾ を選択した。

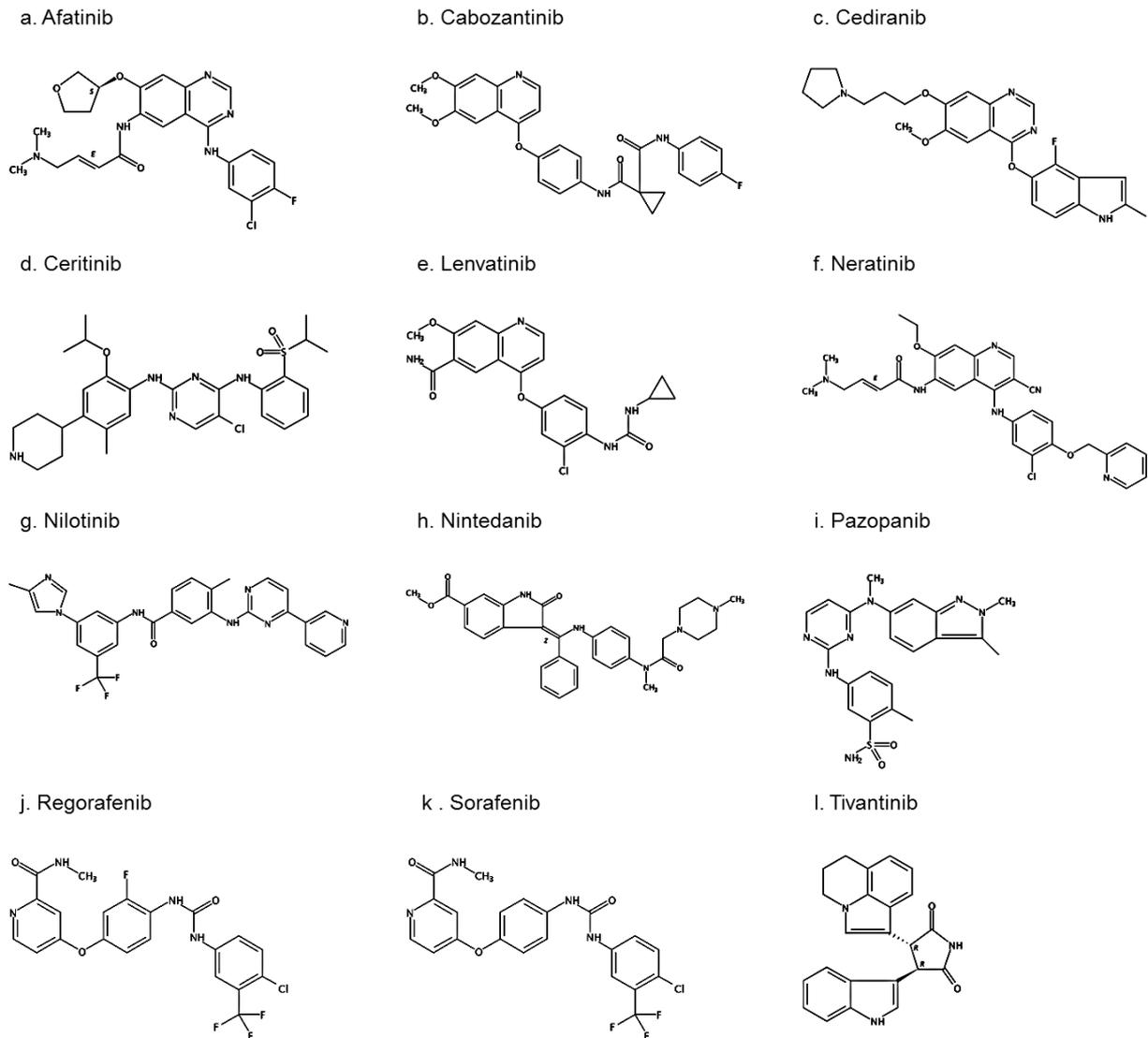


Figure 3. Structural formulas of molecular-targeted agents.

Structural formulas were acquired through a SciFinder database search.

Cited from “Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 1”.

細胞は、37°Cに加温した HEPES-HBSS 溶液で2回洗浄し、加温した HEPES-HBSS 溶液で10分間プレインキュベーションした。12種類の分子標的薬処置実験では、基質と同時に分子標的薬を添加した。試験溶液として、各種基質 (FL: 3 μ M, DCF: 1 μ M, アトルバスタチン: 0.5 μ M, SN-38: 1 μ M, バルサルタン: 1 μ M) のみを HEPES-HBSS に溶解したコントロール溶液、基質にリファンピシン (30 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液、基質に各種分子標的薬 (30 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液を調製した。なお、基質として SN-38 を用いる場合は、取り込み実験の前日に DMSO に溶解し、等量の 0.05 M NaOH を添加することで SN-38 を完全にカルボキシ体に変換したものを扱い、取り込み実験開始3分前に試験溶液を調製した^{19,39}。取り込み実験は、37°Cに加温した試験溶液 0.3 mL (24 穴細胞培養プレート) または 0.5 mL (12 穴細胞培養プレート) を添加することにより開始した。一定時間 (FL, DCF, アトルバスタチンおよびバルサルタン: 2分, SN-38: 0.5分) 経過後に、試験溶液を吸収除去することにより取り込みを停止した。その後、直ちに氷上に移し、氷冷 PBS (+) で細胞を3回ずつ素早く洗浄した。なお、OATP1B1 機能評価実験に先立ち、基質の細胞内取り込み量を経時的に測定したところ、FL, DCF およびアトルバスタチンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と5分間以降での定常状態が、バルサルタンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と10分間以降での定常状態がそれぞれ観察されたため、基質の輸送実験は取り込み時間を2分間とした。一方、SN-38 では取り込み1分間までの範囲内において時間依存的な増加が観察されたものの、それ以降では速やかに定常状態に達したため、基質の輸送実験は取り込み時間を0.5分間とした。また、いずれの基質においても、基質の輸送実験は、基質濃度と細胞内取り込み量との間に線形性が成り立つ濃度範囲内において検討した。取り込み実験終了後、第1章第2節8. に示す細胞内薬物量の定量が行われるまで -80°C にて保管した。

8. 細胞内薬物量の定量

基質として FL および DCF を用いた場合は、0.1 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解させた細胞溶液を、基質としてアトルバスタチンおよびバルサルタンを用いた場合は UPW 500 μ L で凍結融解した細胞懸濁液を、基質として SN-38 を用いた場合は 0.4 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解後、0.4 M HCl 水溶液 350 μ L で中和させた細胞溶液をそれぞれ検体とし、以下に示す基質の細胞内蓄積量の定量を行った。なお、基質の取り込み量は、タンパク質の定量により単位タンパク質当たりの基質取り込み量とした。

1) FL および DCF の定量

FL および DCF は、Izumi らの報告⁶⁰⁾ に準じて行った。検体 200 μL を 96 穴蛍光測定用黒色プレート (CorningTM 96-well Solid Black Polystyrene Microplates, Corning Inc.) に分取後、Multi-Mode Microplate Reader (Power Scan[®] HT, BioTek Japan, Tokyo, Japan) を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm にて蛍光強度を測定することで定量した。

2) アトルバスタチンの定量

アトルバスタチンの定量は、Ayad らの報告⁶²⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 2 nM テルミサルタン含有アセトニトリル 1,200 μL を添加し⁶³⁾、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μL を分取後、窒素気流下にて 40 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所, Kyoto, Japan)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径 5 μm , 長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)
移動相	: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長 260 nm, 蛍光波長 300 nm
カラム槽温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$
保持時間	: アトルバスタチン 13 分, テルミサルタン 6 分

3) SN-38 の定量

SN-38 の定量は、Katsube らの報告¹⁹⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 1.25 ng/mL カンプトテシン含有 50% メタノール水溶液 100 μL およびアセトニトリル 1,300 μL を順次添加し、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした上清 1,600 μL を分取後、すべてラクトン体にするために上清に 0.2 M HCl 100 μL を加え^{19,39)}、窒素気流下にて 40 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル = 75 : 25) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 μm , 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.02 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.0): アセトニトリル = 75 : 25
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長370 nm, 蛍光波長530 nm
カラム槽温度	: 40 °C

4) バルサルタンの定量

バルサルタンの定量は Rao の方法⁶⁴⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 50 nM ロサルタン含有アセトニトリル 1,200 μL を順次添加し⁶⁵⁾、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μL を分取後、窒素気流下にて 40 °C で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.0) : アセトニトリル = 55 : 45) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 μm , 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 2.0): アセトニトリル = 55 : 45
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長270 nm, 蛍光波長380 nm
カラム槽温度	: 40 °C
保持時間	: バルサルタン14分, ロサルタン7分

5) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質とした Lowly らの方法⁶⁶⁾ に準じて行った。サンプル 200 μL に対して 2 w/v % Na_2CO_3 含有 0.1 M NaOH 水溶液と 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 含有 1 w/v % 酒石酸カリウム水溶液を 50 : 1 で混合した溶液 1 mL を添加後、直ちに攪拌した。10 分間静置後に、UPW で 2 倍希釈したフェノール試薬 100 μL を添加し、直ちに攪拌した。30 分間静置したものを Multi-Mode Microplate Reader (Power Scan[®]HT, BioTek Japan) を用いて、検出波長 750 nm にて吸光度を測定した。

9. データ解析

OATP1B1特異的な基質の取り込み速度は、HEK/OATP1B1細胞における取り込み速度から、HEK/Mock細胞における取り込み速度を差し引いて算出した。得られた測定値は、すべて平均値±標準誤差 (S.E.) (n = 6) で表示した。統計学的検定として、三群間以上の多群間の比較には一元配置分散分析法 (non-repeated measures a one-way analysis of variance (ANOVA)) に続く Dunnett's testを適応した。その際、危険率5%未満 (両側) を有意差ありとした。統計学的解析には、統計解析ソフト SPSS II version 24.0. (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた。次に、OATP1B1輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響が基質間で相違するのかを検討するため、分子標的薬存在下における基質の取り込み効率を他の基質の取り込み効率に対して散布図としてプロットし、相関性を評価した。1:1の相関性から外れる分子標的薬を選択するために、1:0.5、1:2の相関性の範囲を評価の目安とした。また、基質間の分子標的薬存在下における取り込み効率の一致度を定量化するためにBland-Altman分析を行った⁶⁷⁾。Bland-Altmanプロットは、12種類の分子標的薬に関して、2基質間の取り込み効率の平均値をx軸に、2基質間の取り込み効率の差をy軸にプロットした散布図で表した。一致度の平均的偏り (bias) および95%一致限界 (95% limit of agreement; 95%LoA) は、それぞれ2基質間の取り込み効率の差の平均値および平均値±1.96×標準偏差 (S.D.) と定義した。

第3節 結果

1. OATP1B1 を介した基質薬物の取り込みに及ぼす分子標的薬の影響

FL の取り込みは、アフアチニブ (240%)、ニンテダニブ (312%)、パゾパニブ (133%) 処置時に有意に増大し、カボザンチニブ (59%)、セリチニブ (51%) およびレンバチニブ (33%) 処置時に有意に低下した (Figure 1-1A)。また、DCF の取り込みは、カボザンチニブ (61%)、セリチニブ (49%)、レンバチニブ (11%)、ニロチニブ (49%)、ニンテダニブ (74%)、ソラフェニブ (84%) およびチバンチニブ (69%) 処置時に有意に低下した (Figure 1-1B)。

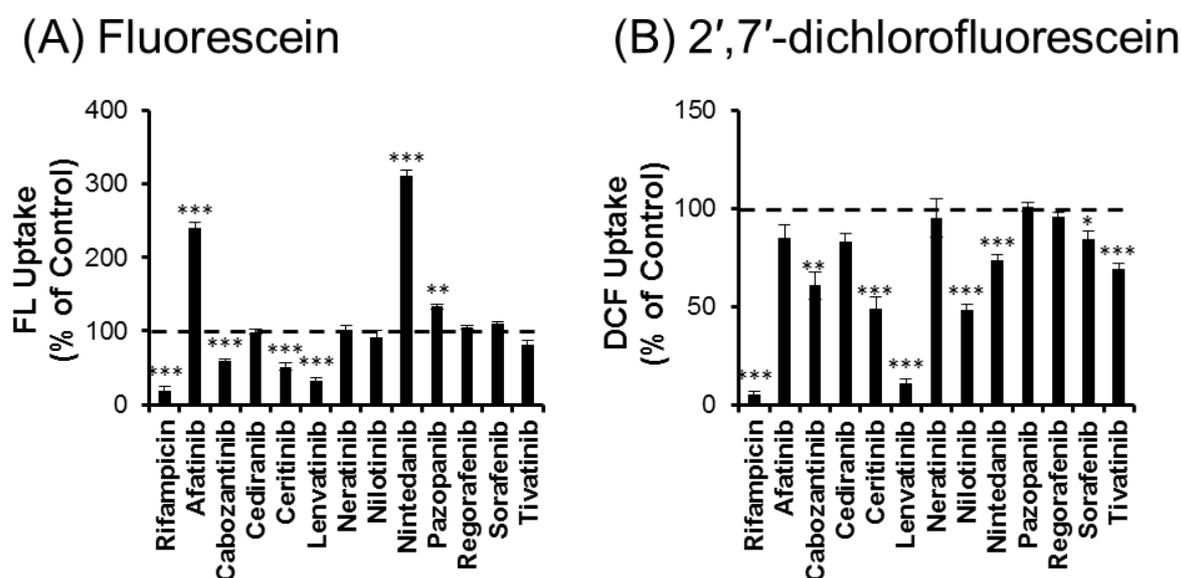


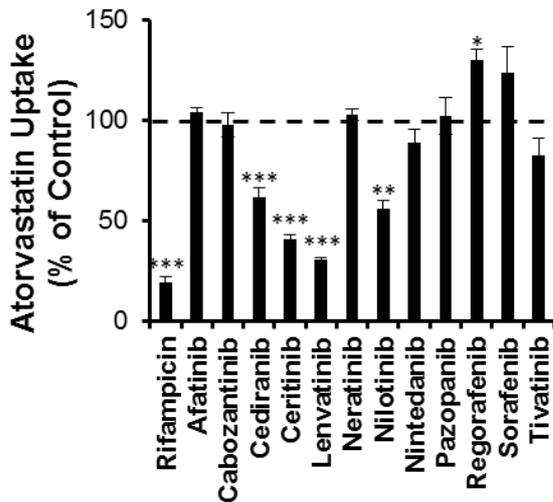
Figure 1-1. Effects of molecular-targeted agents on OATP1B1-mediated uptake of fluorescent substrates.

Uptake experiments of (A) FL and (B) DCF in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (3 μ M) and DCF (1 μ M) in the absence (Control) of rifampicin, presence of rifampicin (30 μ M), or presence of molecular-targeted agents (30 μ M) at 37°C for 2 min after 10 min pre-incubation. Each column represents mean \pm S.E. (n = 6). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein.

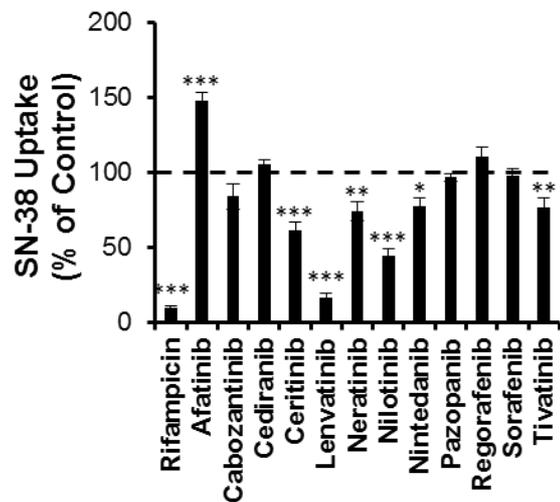
Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 2".

アトルバスタチンの取り込みは、レゴラフェニブ (133%) 処置時に有意に増大し、セジラニブ (62%)、セリチニブ (41%)、レンバチニブ (30%) およびニロチニブ (56%) 処置時に有意に低下した (Figure 1-2A)。SN-38 の取り込みは、アフアチニブ (148%) 処置時に有意に増大し、セリチニブ (61%)、レンバチニブ(17%)、ネラチニブ (74%)、ニロチニブ(44%)、ニンテダニブ (78%) およびチバンチニブ (76%) 処置時に有意に低下した (Figure 1-2B)。バルサルタンの取り込みは、セリチニブ (166%) およびニンテダニブ (133%) 処置時に有意に増大し、カボザンチニブ (74%)、レンバチニブ (30%)、ニロチニブ(58%) およびチバンチニブ (74%) 処置時に有意に低下した (Figure 1-2C)。

(A) Atorvastatin



(B) SN-38



(C) Valsartan

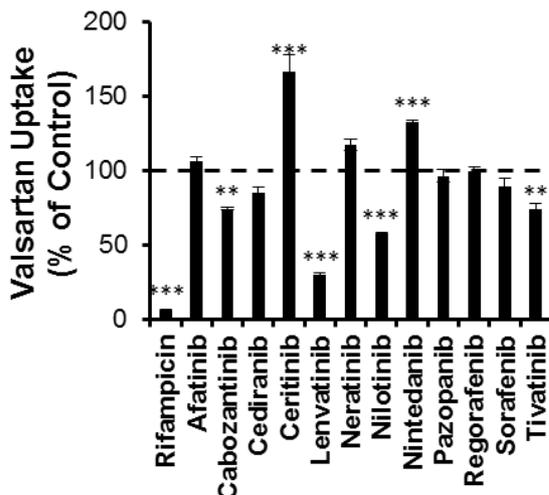


Figure 1-2. Effects of molecular-targeted agents on OATP1B1-mediated uptake of clinically used substrate drugs.

Uptake experiments of (A) atorvastatin, (B) SN-38, and (C) valsartan in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing atorvastatin (0.5 μ M), SN-38 (1 μ M), and valsartan (1 μ M) in the absence (Control) of rifampicin, presence of rifampicin (30 μ M), or presence of molecular-targeted agents (30 μ M) at 37°C for 2 min (atorvastatin and valsartan) or 0.5 min (SN-38) after 10 min pre-incubation. Each column represents mean \pm S.E. (n = 6). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001).

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 2".

2. OATP1B1 輸送機能に及ぼす分子標的薬の影響における基質間の相関性および一致性

分子標的薬存在下、アトルバスタチン、OATP1B1 を介した SN-38 およびバルサルタンの輸送と FL の場合と比較した散布図および Bland-Altman プロットを Figure 1-3 に示す。分子標的薬存在下におけるアトルバスタチンの取り込み効率は、アフーチニブおよびニンテダニブを除いて、FL において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まった (Figure 1-3A)。また、分子標的薬存在下における SN-38 の取り込み効率は、ニンテダニブおよびニロチニブを除いて、FL において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内にほぼ収まった (Figure 1-3C)。さらに、分子標的薬存在下におけるバルサルタンの取り込み効率は、アフーチニブ、セリチニブおよびニンテダニブを除いて、FL において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まった (Figure 1-3E)。一方で、アフーチニブおよびニンテダニブ存在下におけるアトルバスタチンの取り込み効率、ニロチニブおよびニンテダニブ存在下における SN-38 の取り込み効率、およびアフーチニブ、セリチニブおよびニンテダニブ存在下におけるバルサルタンの取り込み効率は、0.5-2 倍の範囲外となった。Bland-Altman プロットでは、ニンテダニブ存在下における臨床基質薬および FL の取り込み効率の差が 95%LoA の範囲外となった (Figure 1-3B, 1-3D および 1-3F)。

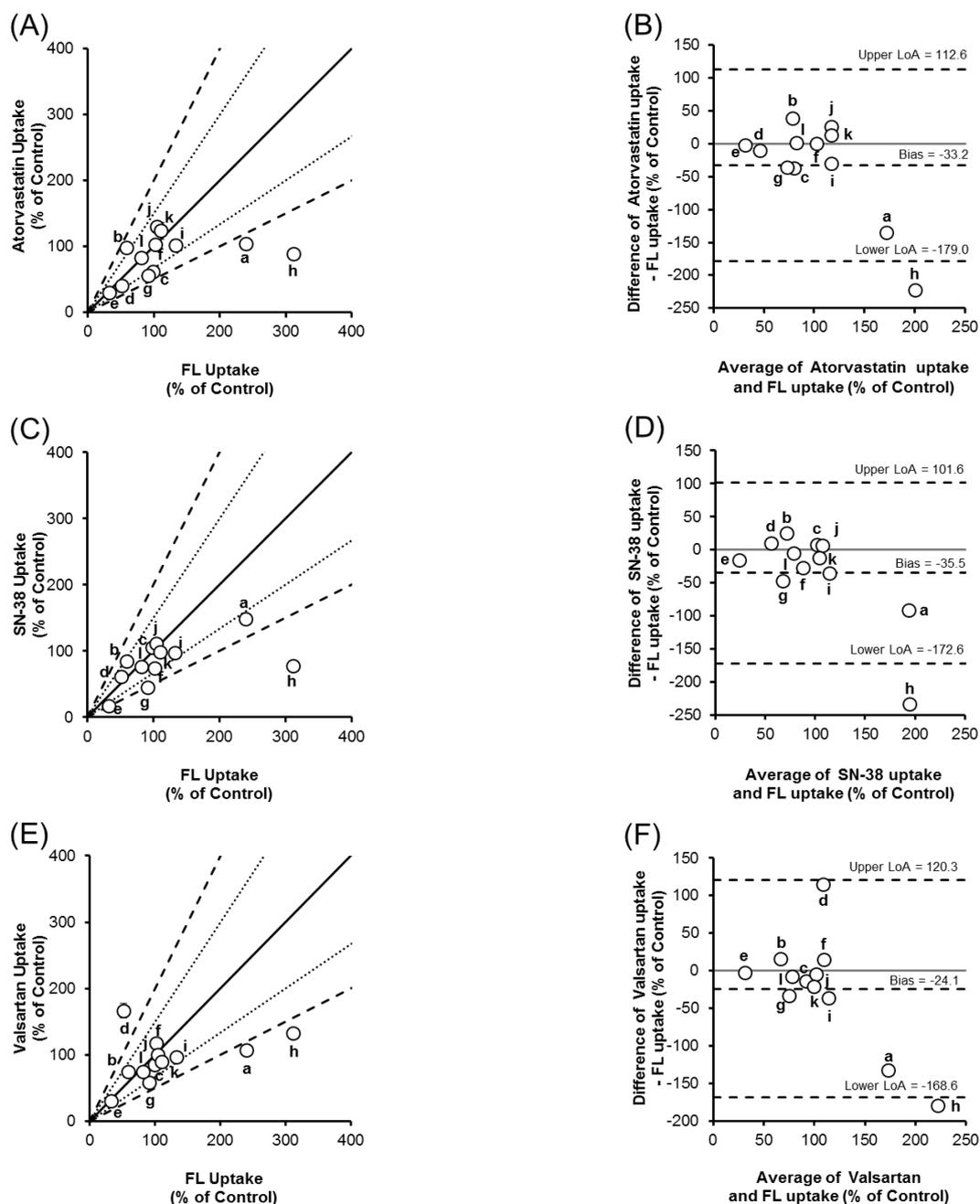


Figure 1-3. Comparison of the effects of molecular-targeted drugs on OATP1B1-mediated uptake of FL and clinically used substrate drugs.

Values of substrate uptake (% of Control) were taken from Figure 1-1 and 1-2. (A, C and E) Relationship between the uptake of clinically used substrate drugs and that of FL in the presence of molecular-targeted agents. Each point represents the mean \pm S.E. The solid lines represent 1:1 correlation; the dotted lines represent 1:0.67 and 1:1.5 correlations; the dashed broken lines represent 1:0.5 and 1:2 correlations. (B, D and F) Bland-Altman plot (bias and LoA) for the uptake of two substrates in the presence of molecular-targeted agents. For each of the molecular-targeted agents, the mean of the uptakes of two substrates is plotted on the abscissa, and the difference between the uptakes of two substrates is plotted on the ordinate. FL, fluorescein; LoA, limits of agreement. a, afatinib; b, cabozantinib; c, cediranib; d, ceritinib; e, lenvatinib; f, neratinib; g, nilotinib; h, nintedanib; i, pazopanib; j, regorafenib; k, sorafenib; l, tivantinib. Figure 1-3A, 1-3C and 1-3E were cited from “Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 3”.

分子標的薬存在下、OATP1B1 を介したアトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンの輸送と DCF の場合と比較した散布図および Bland-Altman プロットを Figure 1-4 に示す。また、分子標的薬存在下におけるアトルバスタチンの取り込み効率は、レンバチニブを除いて、DCF において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まった (Figure 1-4A)。分子標的薬存在下における SN-38 の取り込み効率は、DCF において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まった (Figure 1-4C)。さらに、分子標的薬存在下におけるバルサルタンの取り込み効率は、セリチニブを除いて、DCF において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まった (Figure 1-4E)。一方で、レンバチニブ存在下におけるアトルバスタチンの取り込み効率、およびセリチニブ存在下におけるバルサルタンの取り込み効率は、0.5-2 倍の範囲外となった。Bland-Altman プロットでは、アフアチニブ存在下における SN-38 および DCF の取り込み効率の差、セリチニブ存在下におけるバルサルタンおよび DCF の取り込み効率の差が 95%LoA の範囲外となった (Figure 1-4D および 1-4F)。

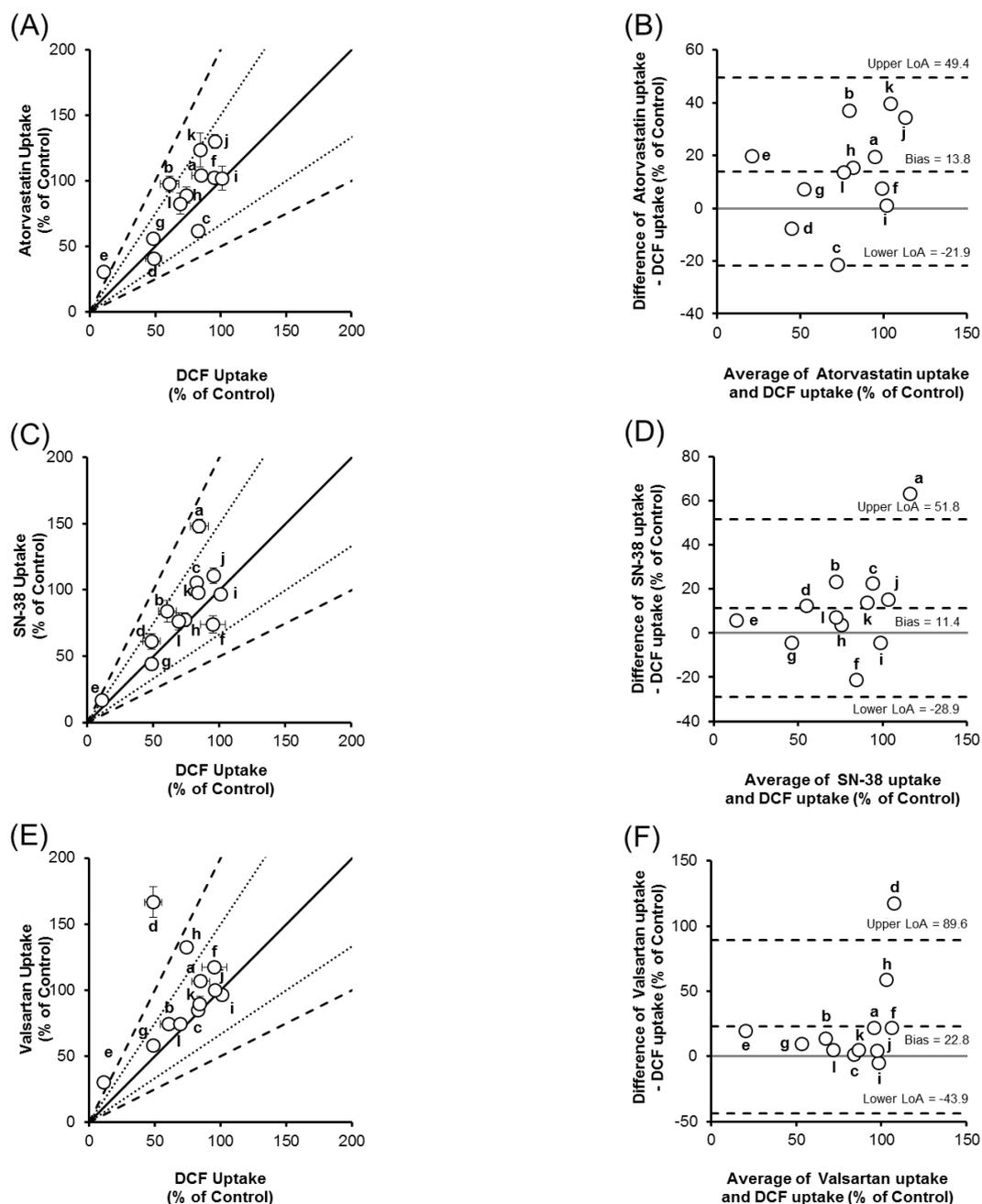


Figure 1-4. Comparison of the effects of molecular-targeted drugs on OATP1B1-mediated uptake of DCF and clinically used substrate drugs.

Values of substrate uptake (% of Control) were taken from Figure 1-1 and 1-2. (A, C and E) Relationship between the uptake of clinically used substrate drugs and that of DCF in the presence of molecular-targeted agents. Each point represents the mean \pm S.E. The solid lines represent 1:1 correlation; the dotted lines represent 1:0.67 and 1:1.5 correlations; and the dashed broken lines represent 1:0.5 and 1:2 correlations. (B, D and F) Bland-Altman plot (bias and LoA) for the uptake of two substrates in the presence of molecular-targeted agents. For each of the molecular-targeted agents, the mean of the uptakes of two substrates is plotted on the abscissa, and the difference between the uptakes of two substrates is plotted on the ordinate. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; LoA, limits of agreement. a, afatinib; b, cabozantinib; c, cediranib; d, ceritinib; e, lenvatinib; f, neratinib; g, nilotinib; h, nintedanib; i, pazopanib; j, regorafenib; k, sorafenib; l, tivantinib.

Figure 1-4A, 1-4C and 1-4E were cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 4".

分子標的薬存在下、FL と DCF を基質とした場合を比較した散布図および Bland-Altman プロットを Figure 1-5 に示す。分子標的薬存在下における FL の取り込み効率は、アファチニブ、レンバチニブおよびニンテダニブを除いて、DCF において得られた値の 0.5-2 倍の範囲内に収まったのに対して、アファチニブおよびニンテダニブ存在下における取り込み効率は 0.5-2 倍の範囲外となった (Figure 1-5A)。Bland-Altman プロットでは、ニンテダニブ存在下における FL および DCF の取り込み効率の差が 95%LoA の範囲外となった (Figure 1-5B)。

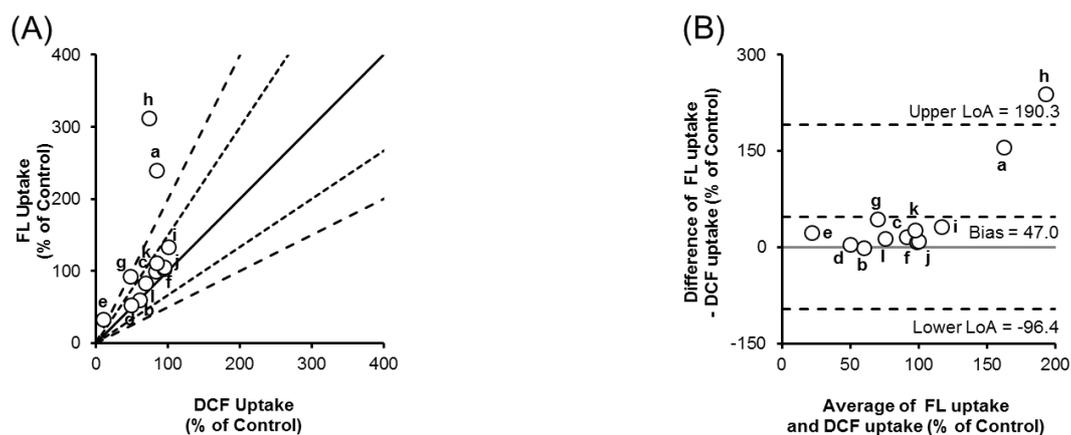


Figure 1-5. Comparison of the effects of molecular-targeted drugs on OATP1B1-mediated uptake of FL and DCF.

Values of substrate uptake (% of Control) were taken from Figure 1-1. (A) Relationship between uptake of FL and that of DCF in the presence of molecular-targeted agents. Each point represents the mean \pm S.E. The solid lines represent 1:1 correlation; the dotted lines represent 1:0.67 and 1:1.5 correlations; the dashed broken lines represent 1:0.5 and 1:2 correlations. (B) Bland-Altman plot (bias and LoA) for the uptake of FL and DCF in the presence of molecular-targeted agents. For each of the molecular-targeted agents, the mean of the uptakes of FL and DCF is plotted on the abscissa, and the difference between the uptakes of two substrates is plotted on the ordinate. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein; LoA, limits of agreement. a, afatinib; b, cabozantinib; c, cediranib; d, ceritinib; e, lenvatinib; f, neratinib; g, nilotinib; h, nintedanib; i, pazopanib; j, regorafenib; k, sorafenib; l, tivantinib.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 5".

第4節 考察

本研究においてアフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、OATP1B1 輸送機能に対する基質間の阻害効率または促進効率の違いが、それらの相関関係から大きく外れ、OATP1B1 輸送機能に及ぼす影響は基質により大きく異なった (Figure 1-1-1-5)。本結果は、リトナビルやエリスロマイシン⁶⁸⁾、イブプロフェンやジクロフェナク⁶⁹⁾ による OATP1B1 を介した基質輸送の促進または阻害作用が基質の種類によって顕著に異なるという結果と一致している。また、アフアチニブは OATP1B1 を介した E₂G の輸送を軽微に阻害すること (IC₅₀ = 82.8 μM)⁷⁰⁾、0.05–5 μM のセリチニブは OATP1B1 を介した E₂G の輸送を阻害すること⁷¹⁾、ニンテダニブが OATP1B1 を介した基質輸送を阻害しないこと⁷²⁾ が報告されている。以前の報告を合わせて考えると本検討結果は、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブによる OATP1B1 を介した薬物相互作用のリスクを評価する際には、適切な基質を用いた OATP1B1 の機能評価が必要であることを示唆している。

過去に、ルチンが OATP1B1 を介したデヒドロエピアンドロステロン硫酸の輸送を促進すること⁷³⁾、イリノテカンが OATP1B1 を介した E₁S の輸送を促進すること⁷⁴⁾ がそれぞれ報告されている。また、イブプロフェン、ジクロフェナクおよびルミラコキシブは OATP1B1 を介したブロモスルホフタレインの輸送を阻害する一方で、OATP1B1 を介したプラバスタチンの輸送を促進させることが報告されている。これら薬物によるプラバスタチン輸送の促進は、イブプロフェン存在下ではミカエリス定数 (K_m) の低下および最大取り込み速度 (V_{max}) の増大を、ジクロフェナクまたはルミラコキシブ存在下では V_{max} の増大を伴っており⁶⁹⁾、このことはいくつかの化合物が OATP1B1 の基質との結合過程または基質のトランスロケーション過程に影響することを示している。本検討はアフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブが一部の OATP1B1 を介した基質輸送を促進させることを初めて示した報告である (Figure 1-1 および 1-2)。これらのことから、イブプロフェンと同様に、アフアチニブ、セリチニブ及びニンテダニブもアロステリックな調節を介して OATP1B1 の基質に対する親和性および基質のトランスロケーションを増大させることで OATP1B1 を介した基質輸送を促進させていると推察される。

OATP1B1 を介した DCF 輸送において、全ての分子標的薬による阻害効率が他の基質の場合と比較して、同等または大きかった (Figure 1-4 および 1-5)。一般的に、医薬品開発段階の非臨床試験では OATP1B1 の基質として E₂G、E₁S およびブロモスルホフタレインなどが選択されており、これら 3 基質のうち E₂G が OATP1B1 阻害薬に対する感受性が最も高いことが報告されている⁵⁷⁾。また、DCF の OATP1B1 阻害薬に対する感受性は E₂G と同等であることが報告されている⁶⁰⁾。すなわち、DCF を基質とした OATP1B1 の機能評価は、高感度かつ簡便、迅速かつ安全に測定できるだけでなく、シクロ

スポリンなどの OATP1B1 阻害薬と同様に、分子標的薬においても薬物相互作用予測の偽陰性を生じにくいことが示唆されるため、相互作用評価に有用なツールであると考えられる。しかしながら、ニロチニブは OATP1B1 を介した E₂G および E₁S の輸送を強力に阻害すること (IC₅₀ = 2.8 μM)^{49,50}、パゾパニブおよびソラフェニブが OATP1B1 を介した E₂G の輸送を強力に阻害すること^{50,75}、レゴラフェニブが OATP1B1 を介した E₂G および E₁S の輸送を強力に阻害すること^{50,53} がそれぞれ報告されている。既報の結果に反して、30 μM のパゾパニブ、レゴラフェニブおよびソラフェニブは OATP1B1 を介した DCF の輸送にほとんど影響せず、30 μM のニロチニブは OATP1B1 を介した DCF の輸送を約 50% 程度阻害するのみであった (Figure 1-1B)。また、分子標的薬の一つであるイマチニブが FL の取り込みを有意に減少させるものの、フルオレセイン-メトトレキサートの取り込みに影響しないことが報告されている⁷⁶。以上のことから、一部の分子標的薬においては、単一の基質を用いた評価のみでは、誤った薬物相互作用の理解へと導く可能性が示唆される。したがって、OATP1B1 を介した薬物相互作用が疑われる場合には、該当する薬物を基質とした OATP1B1 の機能評価の実施が望ましいと考えられる。

本検討においてカボザンチニブ、セジラニブ、ネラチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、ソラフェニブおよびチバンチニブは、OATP1B1 を介した 5 種の基質の輸送にほとんど影響しなかった (Figure 1-1 および 1-2)。一方で、ニロチニブは DCF、アトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンの輸送を 50% 程度阻害し、レンバチニブは 5 種全ての基質の輸送を強力に阻害した (Figure 1-1 および 1-2)。本結果は、15 μM カボザンチニブが OATP1B1 を介した E₂G の輸送に影響しない⁷⁷、セジラニブ、ネラチニブ、ソラフェニブ (それぞれ 10 μM) が OATP1B1 を介した E₁S の輸送に影響しない⁵⁴、10 μM レゴラフェニブが OATP1B1 を介したプラバスタチンの輸送に影響しない⁷⁸、レンバチニブが OATP1B1 を介した E₂G の輸送を阻害する (IC₅₀ = 7.29 μM)⁷⁹ という既報の結果と一致している。一方で、ニロチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブおよびソラフェニブにおいては、本検討結果と既報において示された結果^{49,50,53,75} とは一致しなかった。すなわち、ニロチニブが OATP1B1 を介した E₁S の輸送を阻害すること (IC₅₀ = 2.8 μM)⁴⁹、パゾパニブが OATP1B1 を介した E₂G の輸送を強力に阻害すること (IC₅₀ = 0.79 μM)⁷⁵、0.5-100 μM レゴラフェニブが OATP1B1 を介した E₁S の輸送を濃度依存的に阻害すること⁵³ がそれぞれ報告されている。また、Hu ら⁵⁰ は、ニロチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブあるいはソラフェニブ (それぞれ 10 μM) の 15 分間のプレインキュベーション処置が OATP1B1 を介した E₂G の輸送を顕著に阻害することを報告している。さらに、30 分間のプレインキュベーション処置の追加によりシクロスポリン⁸⁰ やリトナビル⁸¹ の OATP1B1 阻害作用が、単なる同時処置よりも顕著に増強することが報告されている。したがって、ニロチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブお

よびソラフェニブにおける既報との差異は、選択した基質の違いだけでなく、プレインキュベーション処置の有無にも起因している可能性が考えられる。

本検討において、ソラフェニブおよびレゴラフェニブは、SN-38 の取り込みを阻害しなかった (Figure 1-2B)。この結果は、ソラフェニブ³⁷⁾ またはレゴラフェニブ³⁸⁾ 服用患者において生じるイリノテカン静脈内投与時の SN-38 血中濃度の増大が、OATP1B1 の直接的な阻害では説明出来ないことを示している。過去に、SN-38 グルクロン酸抱合体の血中濃度と SN-38 の血中濃度との比 (SN-38 グルクロン酸抱合体の血中濃度/SN-38 の血中濃度) が、UGT1A1 の機能低下アレルを有する患者で顕著に低下することが報告されており、SN-38 の消失には OATP1B1 だけでなく、UGT1A1 も大きな役割を果たすことが知られている⁸²⁾。また、ソラフェニブおよびレゴラフェニブが UGT1A1 機能を阻害することから⁸³⁾、これらの相互作用は OATP1B1 の直接的阻害ではなく、UGT1A1 の機能阻害など他のメカニズムに起因すると考えられる。

本検討では分子標的薬の影響を過小評価しないように、分子標的薬の処置濃度を臨床濃度 (例えば、ソラフェニブおよびレゴラフェニブの最高血中濃度 (C_{max}) はそれぞれ $16.8 \mu\text{M}$ ⁸⁴⁾ および $8.1 \mu\text{M}$ ⁷⁸⁾ である) と同等以上である $30 \mu\text{M}$ で設定したため、必ずしも臨床的な濃度を反映していない。分子標的薬による薬物相互作用の臨床的重要性を明らかにするためには、本章で明らかにしたレンバチニブのような OATP1B1 輸送活性を強力に阻害する分子標的薬あるいは OATP1B1 輸送活性を促進する分子標的薬 (アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブ) についてさらなる検討が必要である。

第5節 小活

本章では、OATP1B1 を介した輸送に及ぼす分子標的薬の影響について複数の基質を用いて比較検討し、次の知見を得た。

1. OATP1B1 輸送機能に及ぼすアフチニブ、セリチニブおよびニンテダニブの影響は、基質の種類により大きく異なること
2. アフチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、一部の OATP1B1 を介した基質輸送を促進させること
3. レンバチニブは、OATP1B1 を介した 5 種全ての基質の輸送を強力に阻害すること

以上の結果から、分子標的薬による OATP1B1 を介した薬物相互作用が疑われる場合には、実臨床で相互作用が疑われた OATP1B1 基質薬物を用いた評価が必要であると考えられた。

第2章 OATP1B1による基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響

第1節 緒言

第1章では、5種のOATP1B1基質を用いて網羅的にOATP1B1機能に及ぼす分子標的薬の影響を評価した結果、レンバチニブがOATP1B1による全ての基質の輸送を強力に阻害することについて明らかにした。そこで本章では、レンバチニブに焦点を当てた詳細な検討を行った。第1章においてFL以外の基質の輸送を中程度に阻害したニロチニブが、OATP1B1の基質となることが報告されている⁵¹⁾。また、レンバチニブは肝消失型薬物である⁸⁵⁾、その血中濃度はOATP1B1阻害薬であるリファンピシンの併用により有意に増大することが報告されている⁸⁶⁾。これらのことから、レンバチニブもニロチニブと同様にOATP1B1の基質となり、他のOATP1B1基質の輸送を強力に阻害する可能性が考えられた。

OATP1B1を介した薬物相互作用は、時として致命的な有害事象にもなるため²²⁻²⁴⁾、最近では、アメリカ食品医薬品局 (US Food and Drug Administration (FDA))⁸⁷⁾ や欧州医薬品庁 (European Medicines Agency (EMA))⁸⁸⁾ は、CYP同様に医薬品承認申請時に、OATP1B1を介した薬物相互作用リスク評価に関する資料の提出を求めている。本邦においても、2014年に厚生労働省医薬食品局審査管理課 (Japan Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW)) より、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」が公表されている⁸⁹⁾。OATP1B1の輸送機能を変動させる薬物の中には、リファンピシンのようにOATP1B1の基質となり⁹⁰⁾、OATP1B1を介した基質薬物の輸送を臨床用量から想定される血中濃度域で阻害するものもあれば⁹¹⁾、シクロスポリンのようにOATP1B1基質とならないが、強力な阻害作用を示す薬物も存在する⁸⁰⁾。現状では*in vitro*実験によるOATP1B1の相互作用試験を行い、*in vitro*相互作用試験のデータと臨床相互作用のデータに基づいて作成された決定樹を用いて薬物相互作用の有無が評価されている (Figure 2-1)。

そこで本章では、レンバチニブによるOATP1B1を介した基質輸送の阻害機序について検討すると共に、レンバチニブが臨床においてOATP1B1を介した相互作用の可能性についても合わせて評価した。

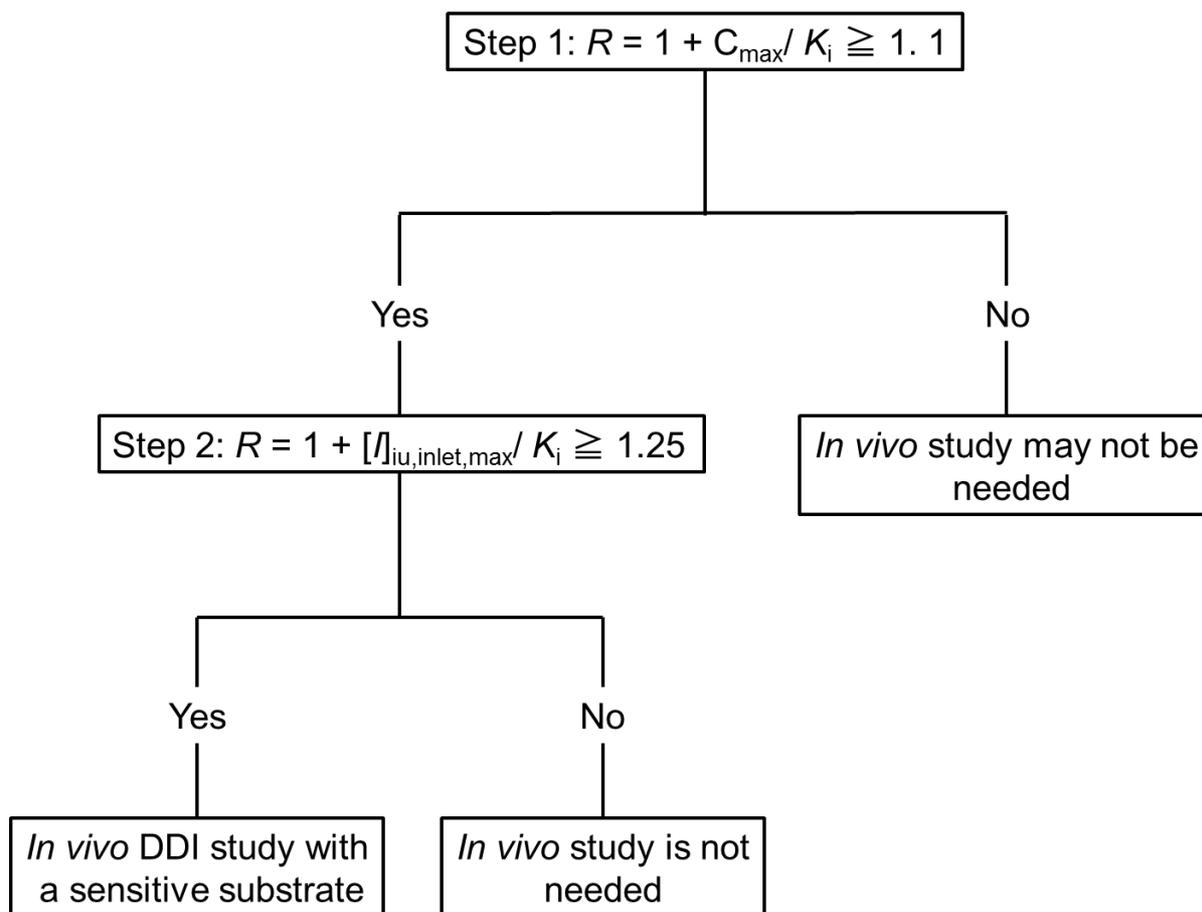


Figure 2-1. OATP1B1 inhibition decision tree: evaluation of the possibility of the investigational drug being an OATP1B1 inhibitor.

The decision tree of the FDA for the inhibition of OATP1B1 consists of two steps⁸⁷⁾, and MHLW recommends only the second step⁸⁹⁾. C_{\max} , steady-state total plasma concentration; $[I]_{iu,inlet,max}$, estimated maximum unbound concentration of molecular-targeted agent at the inlet to the liver; K_i , inhibition constant.

第2節 実験方法

1. 試薬

アトルバスタチン、カンプトテシン、DCF、FL、SN-38、バルサルタン、テルミサルタン、ロスバスタチンおよび酪酸ナトリウムは、Tokyo Chemical Industry より、レンバチニブは AdooQ Bioscience (Irvine, CA, USA) より、それぞれ購入した。その他の試薬は試薬特級グレードまたは HPLC グレードのものを使用した。

2. 細胞

HEK293 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。なお、実験には OATP1B1 を安定発現させた HEK293 細胞 (HEK/OATP1B1 細胞) および空のベクターが導入された HEK293 細胞 (HEK/Mock 細胞) をそれぞれ使用した¹⁹⁾。

3. 試薬の調製

1) 細胞培養液の調製

D-MEM (Life Technologies) 粉末培地および NaHCO₃ (終濃度 44.0 mM) を pf-UPW 1L に溶解した後、PS-mix (終濃度 Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Nakalai Tesque) 10 mL および MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x) (終濃度 0.1 mM, Nakalai Tesque) 10 mL を添加した。この時、HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞では、G418 (終濃度 0.72 mM, Nakalai Tesque) を添加した。クリーンベンチ内で、その混合液を 0.22 µm のメンブランフィルターを用いて濾過滅菌した後、0.45 µm のメンブランフィルターを用いて濾過滅菌した非動化済みの FBS (終濃度 10%, Lot No. AXM56561 および AAJ208538, Thermo Fisher scientific K.K.) 100 mL を添加し、細胞培養液を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存し、細胞培養時には温浴で 37°C に加温したものを用いた。

2) HEPES-HBSS (HEPES-Hank's balanced salt solution buffer) の調製

NaCl 4.00 g, KCl 0.20 g, CaCl₂ 0.07 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, MgCl₂·6H₂O 0.05 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.054g, KH₂PO₄ 0.03g, NaHCO₃ 0.176 g, Glucose 0.50 g および HEPES 2.98 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、1M NaOH で pH 7.4 とし、HEPES-HBSS を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

3) PBS (Phosphate-buffered saline) の調製

NaCl 4.00 g、KCl 0.10 g、KH₂PO₄ 0.10 g および Na₂HPO₄·12H₂O 1.448 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、PBS (-) を調製した。この時、PBS (+) は CaCl₂ (終濃度 0.9 mM)、MgCl₂ (終濃度 0.5 mM) を添加した。滅菌 PBS (-) 調製の場合は、121 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

4. 細胞の継代

あらかじめ細胞培養液および滅菌 PBS (-) 溶液は 37°C に加温し、Trypsin-EDTA 溶液は室温に戻した。10 cm ディッシュの細胞培養液を吸引除去後、滅菌 PBS (-) 溶液により 2 回洗浄した。Trypsin-EDTA 溶液 2 mL を添加して、37°C で数分間加温することでディッシュから細胞を剥離した。細胞培養液 8 mL を添加し、190×g で 6 分間遠心分離した。上清除去後に得られたペレットを細胞培養液 10 mL で懸濁し、10 cm ディッシュ (IWAKI AGC Techno glass Co., Ltd.) に播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。

5. コラーゲンコート法

細胞接着と伸展の促進を目的として、株式会社ニッピのコラーゲンコート培養方法に従って、24 穴細胞培養プレート (Corning Inc.) および 12 穴細胞培養プレート (Corning Inc.) にコラーゲン処理を行った。すなわち、ウシ真皮由来 I 型コラーゲン (3 mg/mL) に濾過滅菌済 5 mM 酢酸を加え 300 倍希釈した溶液 (10 µg/mL, 24 穴細胞培養プレート) または 150 倍希釈した溶液 (20 µg/mL, 12 穴細胞培養プレート) を、0.5 mL ずつ各穴に添加した。30 分静置後、内容液を吸引除去した。その後 30 分間風乾させ、PBS (-) 0.5 mL で 3 回洗浄し細胞播種に用いた。

6. 細胞播種

HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞をコラーゲン処置済 24 穴細胞培養プレート (0.5×10⁵ cells/mL/well) または 12 穴細胞培養プレート (1.5×10⁵ cells/mL/well) に播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。3 日間後、遺伝子発現を活性化させる目的でヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である酪酸ナトリウム (終濃度 5 mM) 含有細胞培養液に交換し、培養した⁵⁸⁾。翌日、細胞内取り込み実験を第 2 章第 2 節 7. に示すとおり行った。

7. 細胞内取り込み実験

1) 基質の細胞内取り込み実験

細胞内取り込み実験は、第1章第2節7.と同様に行った。細胞は、37°Cに加温した HEPES-HBSS 溶液 (pH 7.4) で2回洗浄し、加温した HEPES-HBSS で10分間プレインキュベーションした。レンバチニブの濃度を変化させた OATP1B1 基質の輸送実験では、基質と同時にレンバチニブを添加した。試験溶液として、各種基質 (FL: 3 μ M, DCF: 1 μ M, アトルバスタチン: 0.5 μ M, SN-38: 1 μ M, バルサルタン: 1 μ M) のみを HEPES-HBSS に溶解したコントロール溶液、基質にレンバチニブ (0.3-30 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液を調製した。なお、基質として SN-38 を用いる場合は、取り込み実験の前日に DMSO に溶解し、等量の 0.05 M NaOH を添加することで SN-38 を完全にカルボキシ体に変換したものを扱い、取り込み実験開始3分前に試験溶液を調製した^{19,39}。基質濃度を変化させた実験では、試験溶液として、各種基質 (FL: 5-200 μ M, DCF: 2-100 μ M, アトルバスタチン: 0.2-5 μ M, バルサルタン: 5-150 μ M) のみを HEPES-HBSS に溶解したコントロール溶液、基質にレンバチニブ (3 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液を調製した。なお、SN-38 の検討に関しては SN-38 の溶解度が低いため十分な濃度の取り込み実験が行えなかったことから、検討した濃度範囲内では輸送飽和性が確認できず、速度論的解析を行うための十分なデータを確保できなかった。取り込み実験は、37°Cに加温した試験溶液 0.3 mL (24 穴細胞培養プレート) または 0.5 mL (12 穴細胞培養プレート) を添加することにより開始した。一定時間 (FL, DCF, アトルバスタチンおよびバルサルタン: 2 分, SN-38: 0.5 分) 経過後に、試験溶液を吸収除去することにより取り込みを停止した。その後、直ちに氷上に移し、氷冷 PBS (+) で細胞を3回ずつ素早く洗浄した。なお、OATP1B1 機能評価実験に先立ち、基質の細胞内取り込み量を経時的に測定したところ、FL、DCF およびアトルバスタチンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と5分間以降での定常状態が、バルサルタンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と10分間以降での定常状態がそれぞれ観察されたため、基質の輸送実験は取り込み時間を2分間とした。一方、SN-38 では取り込み1分間までの範囲内において時間依存的な増加が観察されたものの、それ以降では速やかに定常状態に達したため、基質の輸送実験は取り込み時間を0.5分間とした。また、いずれの基質においても、レンバチニブの濃度を変化させた輸送実験は、基質濃度と細胞内取り込み量との間に線形性が成り立つ濃度範囲内において検討した。取り込み実験終了後、第2章第2節8.に示す細胞内薬物量の定量が行われるまで-80°Cにて保管した。

2) レンバチニブの細胞内取り込み実験

レンバチニブの細胞内取り込み実験は、以下のように行った。細胞は、37°Cに加温した

HEPES-HBSS 溶液 (pH 7.4) で2回洗浄し、加温した HEPES-HBSS で10分間プレインキュベーションした。試験溶液として、レンバチニブ (時間依存性: 0.2 μ M, 濃度依存性: 0.1-5 μ M) を添加した HEPES-HBSS を調製した。取り込み実験は、37°C に加温した試験溶液 0.5 mL (12 穴細胞培養プレート) を添加することにより開始した。一定時間 (時間依存性: 0.5-10 分, 濃度依存性: 2 分) 経過後に、試験溶液を吸収除去することにより取り込みを停止した。その後、直ちに氷上に移し、氷冷 PBS (+) で細胞を3回ずつ素早く洗浄した。なお、レンバチニブ時間依存実験は、基質濃度と細胞内取り込み量との間に線形性が成り立つ濃度範囲において検討し、レンバチニブ濃度依存性実験は、取り込み時間と細胞内取り込み量との間に線形性が成り立つ時間範囲内において検討した。取り込み実験終了後、第2章第2節8. に示す細胞内薬物量の定量が行われるまで-80°C にて保管した。

8. 細胞内薬物量の定量

基質として FL および DCF を用いた場合は、0.1 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解させた細胞溶液を、基質としてアトルバスタチン、バルサルタンおよびレンバチニブを用いた場合は UPW 500 μ L で凍結融解した細胞懸濁液を、基質として SN-38 を用いた場合は 0.4 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解後、0.4 M HCl 水溶液 350 μ L で中和させた細胞溶液をそれぞれ検体とし、以下に示す基質の細胞内蓄積量の定量を行った。なお、基質の取り込み量は、タンパク質の定量により単位タンパク質当たりの基質取り込み量とした。

1) FL および DCF の定量

FL および DCF は、Izumi らの報告⁶⁰⁾ に準じて行った。検体 200 μ L を 96 穴蛍光測定用黒色プレート (CorningTM 96-well Solid Black Polystyrene Microplates, Corning Inc.) に分取後、Multi-Mode Microplate Reader (Power Scan[®] HT, BioTek Japan) を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm にて蛍光強度を測定することで定量した。

2) アトルバスタチンの定量

アトルバスタチンの定量は、Ayad らの報告⁶²⁾ に準じて行った。検体 400 μ L に内標準物質である 2 nM テルミサルタン含有アセトニトリル 1,200 μ L を添加し⁶³⁾、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μ L を分取後、窒素気流下にて 40°C で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40) 150 μ L を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 μm , 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長260 nm, 蛍光波長300 nm
カラム槽温度	: 40°C
保持時間	: アトルバスタチン13分, テルミサルタン6分

3) SN-38 の定量

SN-38 の定量は、Katsube らの報告¹⁹⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 1.25 ng/mL カンプトテシン含有 50% メタノール水溶液 100 μL およびアセトニトリル 1,300 μL を順次添加し、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした上清 1,600 μL を分取後、すべてラクトン体にするために上清に 0.2 M HCl 100 μL を加え^{19,39)}、窒素気流下にて 40°C で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル = 75 : 25) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 μm , 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.02 Mクエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル = 75 : 25
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長370 nm, 蛍光波長530 nm
カラム槽温度	: 40°C

4) バルサルタンの定量

バルサルタンの定量は Rao の方法⁶⁴⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 50 nM ロサルタン含有アセトニトリル 1,200 μL を順次添加し⁶⁵⁾、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μL を分取後、窒素気流下にて 40°C で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.0) : アセトニトリル = 55 : 45) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 µm, 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 2.0): アセトニトリル = 55:45
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長270 nm, 蛍光波長380 nm
カラム槽温度	: 40°C
保持時間	: バルサルタン14分, ロサルタン7分

5) レンバチニブの定量

レンバチニブの定量は、Prashanthi らの報告⁹²⁾ に準じて行った。検体 400 µL に内標準物質である 200 nM アムロジピン含有アセトニトリル 1,300 µL および 50% メタノール水溶液 100 µL を添加し⁹³⁾、1 分間攪拌後、15,000×g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,700 µL を分取後、窒素気流下にて 40°C で蒸発乾固し、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0): アセトニトリル = 67:33) 200 µL を添加し溶解した。その混合物を再度 15,000×g で 10 分間遠心分離することで不溶性異物を除去したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu System Controller SCL-10Avp (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-10ADvp (島津製作所)
ポンプ	: LC-10AD (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径5 µm, 長さ25 cm×内径4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0): アセトニトリル = 67:33
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: SPD-20A (島津製作所)
検出波長	: 吸光度波長240 nm
カラム槽温度	: 40°C
オンラインデガッサ	: DGU-12A (島津製作所)
保持時間	: レンバチニブ11分, アムロジピン15分

6) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BSA を標準タンパク質とした Lowly らの方法⁶⁶⁾ に準じて行った。サンプル 200 µL に対して 2 w/v % Na₂CO₃ 含有 0.1 M NaOH 水溶液と 0.5% CuSO₄·5H₂O 含有 1 w/v % 酒石酸カリウム水溶液を 50:1 で混合した溶液 1 mL を添加後、直ちに攪拌した。10 分間静置後に、UPW で 2 倍希釈したフェノール試薬 100 µL を添加し、直ちに攪拌した。30 分間静置したものを Multi-Mode Microplate

Reader (Power Scan[®] HT, BioTek Japan) を用いて、検出波長 750 nm にて吸光度を測定した。

9. データ解析

1) 統計学的解析

OATP1B1 特異的な基質の取り込み速度は、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み速度から、HEK/Mock 細胞における取り込み速度を差し引いて算出した。得られた測定値は、すべて平均値±標準誤差 (S.E.) (n = 4) または算出値 (95%信頼区間 (平均値±1.96×S.E.)) (n = 4) で表示した。統計学的検定として、三群間以上の多群間の比較には non-repeated measures a one-way ANOVA に続く Dunnett's test を適応した。その際、危険率 5%未満 (両側) を有意差ありとした。また、輸送パラメータの比較は、両群の 95%信頼区間が重ならない場合を有意差ありとした。統計学的解析には、統計解析ソフト SPSS II version 24.0. (IBM) を用いた。

2) 速度論的解析

OATP1B1 の輸送パラメータである V_{max} および K_m 、非線形最小二乗法プログラム (MULTI program) を用いて⁹⁴⁾、HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞において基質濃度依存性実験から得られたデータに式 (2-1, 2-2) を当てはめることで算出した。

HEK/OATP1B1 細胞の場合：

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \times [S]} + P_{dif} \times [S] \dots\dots\dots (2-1)$$

HEK/Mock 細胞の場合：

$$v = P_{dif} \times [S] \dots\dots\dots (2-2)$$

ここで、 v 、 $[S]$ および P_{dif} は、それぞれ取り込みの初速度 (initial uptake velocity)、基質濃度、非特異的取り込みクリアランス (non-saturable uptake velocity) を示す。

OATP1B1 を介した基質輸送に対する分子標的薬の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は、MULTI program を用いて⁹¹⁾、得られたデータに式 (2-3, 2-4) を当てはめることにより算出した^{68,95)}。

$$uptake (\% \text{ of control}) = P \times \left(1 - \frac{[I]}{IC_{50} + [I]} \right) \dots\dots\dots (2-3)$$

$$\text{uptake (\% of control)} = P \times \left(1 - \frac{[I]}{IC_{50} + [I]} \right) + P_0 \dots\dots\dots (2-4)$$

ここで、 P 、 P_0 および $[I]$ は、それぞれ阻害コンポーネント、非阻害コンポーネントおよび分子標的薬の濃度を示す。なお、最適適合モデルは、Akaike information criterion (AIC) の値が最も低値したものを選択した⁹⁶⁾。

また、分子標的薬の OATP1B1 輸送活性に対する阻害定数 (K_i) は、競合阻害を仮定した式 (2-5) を用いて算出した⁹⁷⁾。なお、SN-38 の $[S]$ は K_m 値よりも十分に低いと推測されたので、SN-38 の K_i 値は IC_{50} とほぼ同一であるとした。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)} \dots\dots\dots (2-5)$$

3) 薬物相互作用指数予測

OATP1B1 の直接的阻害を介した DDI の可能性を予測するために、OATP に関する FDA のドラフトガイダンスに従い⁸⁷⁾、それぞれの分子標的薬の臨床推定用量における定常状態の総 C_{max} および非結合形薬物の門脈血中最高濃度 ($[I]_{u,inlet,max}$) 並びに本研究で得られた各基質を用いた際における K_i 値を用いて、式 (2-6) から薬物相互作用指数 (R 値：特定の取り込み反応に対する被験薬の存在下と非存在下の OATP1B1 を介した輸送における基質の固有クリアランス値の比) を算出した。OATP1B1 の機能評価は、FDA では、 $[I] = C_{max}$ を用いた場合と $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を用いた場合の 2 段階⁸⁷⁾、本邦においては $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を用いた場合の 1 段階で行われている⁸⁹⁾ (Figure 2-1)。

$$R = 1 + \frac{[I]}{K_i} \dots\dots\dots (2-6)$$

なお、 $[I]$ には、 $[I]_{u,inlet,max}$ または C_{max} を代入した。FDA のドラフトガイダンスに従い、式 (2-7) に $[I] = C_{max}$ を代入した場合は $R = 1.1$ を、 $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を代入した場合は $R = 1.25$ を、それ以上の値を示せば薬物相互作用が生じうるしきい値とした。 $[I]_{u,inlet,max}$ は、式 (2-7) を用いて算出した⁹⁸⁾。

$$[I]_{u,inlet,max} = f_u \times \left(C_{max} + \frac{k_a \times Dose \times F_a \times F_g}{Q_h} \right) \dots\dots\dots (2-7)$$

ここで、 f_u は血中非結合率、 k_a は分子標的薬の吸収速度定数、 $Dose$ は分子標的薬の一回投与量、 $F_a \times F_g$ は分子標的薬の消化管アベイラビリティ、 Q_h は総肝血流量 (97 L/hr) を示す。本研究では、既報に基づき、偽陰性の予測リスクを避けるために $k_a=0.1$ および $F_a \times F_g=1$ に設定した⁹⁸⁾。

第3節 結果

1. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすレンバチニブの濃度依存的な影響

レンバチニブは、OATP1B1 を介した FL、DCF、アトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンの取り込みを濃度依存的に低下させた (Figure 2-2)。

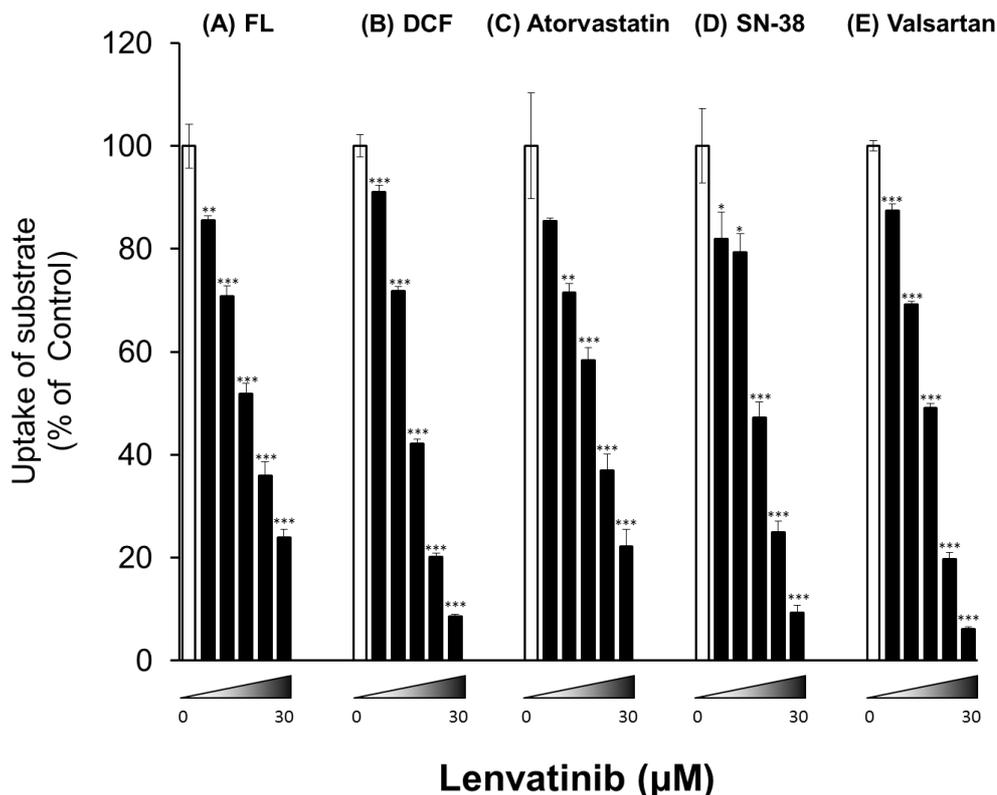


Figure 2-2. Concentration-dependent effects of lenvatinib on OATP1B1-mediated uptake of substrates.

Uptake experiments with substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (A, 3 μ M), DCF (B, 1 μ M), atorvastatin (C, 0.5 μ M), SN-38 (D, 1 μ M), and valsartan (E, 1 μ M) in the absence (Control) or presence of presence of lenvatinib (0.3–30 μ M) at 37 $^{\circ}$ C for 2 min (FL, DCF, atorvastatin, and valsartan) or 0.5 min (SN-38) after 10 min of pre-incubation. Each point represents mean \pm S.E. (n = 4). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein. Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 6".

2. 薬物相互作用指数予測

Table 2-1 に、Figure 2-2 から算出した IC_{50} 値および既報から算出した R 値を示す。

OATP1B1 を介した FL、DCF、アトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンの輸送におけるレンバチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 1.86 μ M、2.35 μ M、2.68 μ M、3.21 μ M および 2.62 μ M であった。また、FL、DCF、アトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタンを基質とした際のレンバチニブの R 値は、レンバチニブの濃度が C_{max} で想定した場合はそれぞれ 1.71、1.57、1.81、1.38 および 1.48 であり、全ての基質でカットオフ値を満たした。しかしながら、レンバチニブの濃度が $[I]_{u,inlet,max}$ で想定した場合はそれぞれ 1.09、1.08、1.11、1.05 および 1.06 であり、全ての基質でカットオフ値を満たさなかった。

Table 2-1. IC_{50} and R values of lenvatinib inhibition of OATP1B1 activity.

Molecular-targeted agents	Substrate	IC_{50} (μ M)	K_i (μ M)	C_{max} (μ M)	$[I]_{u,inlet,max}$ (μ M)	R value	
						$[I] = C_{max}$	$[I] = [I]_{u,inlet,max}$
	FL	1.86 \pm 0.15	1.72 \pm 0.14			1.71	1.09
	DCF	2.35 \pm 0.05	2.12 \pm 0.05			1.57	1.08
lenvatinib	atorvastatin	2.68 \pm 0.40	1.49 \pm 0.22	1.21	0.16	1.81	1.11
	SN-38	3.21 \pm 0.25	3.21 \pm 0.25			1.38	1.05
	valsartan	2.62 \pm 0.06	2.50 \pm 0.06			1.48	1.06

Each column represents the estimated mean \pm S.E. obtained using MULTI software based on eq (3-3-3-7) as described in the Experimental Section. Dosage and plasma concentration information obtained from cited pharmacokinetics studie⁷⁹⁾. Values of f_u , $Dose$ were set to 0.034, 24 mg (lenvatinib). C_{max} , steady-state total plasma concentration; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein; f_u , unbound fraction in blood; $[I]_{u,inlet,max}$, estimated maximum unbound concentration of molecular-targeted agent at the inlet to the liver; IC_{50} , Half-maximal inhibitory concentration; K_i , inhibition constant.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Table 1".

3. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響に関する速度論的解析

Figure 2-3 には、レンバチニブ共存下における基質濃度依存の検討結果を示す。また、Table 2-2 には、速度論的解析の結果を示す。

レンバチニブ (3 μM) 存在下における FL および DCF の V_{max} 値は、コントロールと比較して 22% および 15% 有意に低値を示したが、アトルバスタチンおよびバルサルタンの V_{max} 値に有意な変動は認められなかった。一方、レンバチニブ存在下における FL、DCF、アトルバスタチンおよびバルサルタンの K_m 値は、コントロールと比較して 28%、187%、99% および 62% 有意に高値を示した。

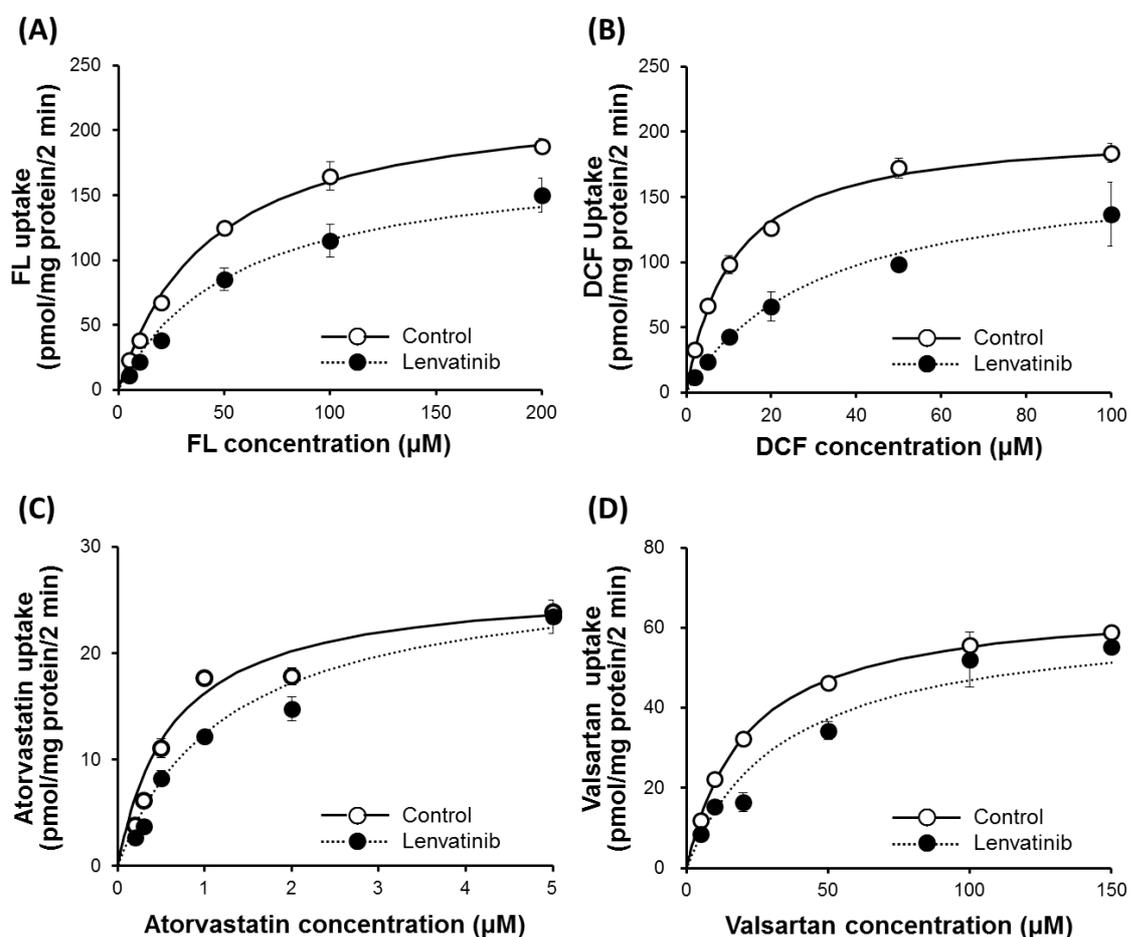


Figure 2-3. Concentration dependence of OATP1B1-mediated transport of substrates in the absence or presence of lenvatinib.

Uptake experiments of (A) FL, (B) DCF, (C) atorvastatin and (D) valsartan in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (5–200 μM), DCF (2–100 μM), atorvastatin (0.2–5 μM), and valsartan (5–150 μM) in the absence (open circles) or presence of lenvatinib (3 μM , closed circles) at 37°C for 2 min after 10 min before incubation. Fitted lines obtained using nonlinear least-squares regression analysis based on eq (2-1, 2-2) are shown as Michaelis-Menten plots; each point represents mean \pm S.E. (n = 4). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein.

Table 2-2. Kinetic parameters of OATP1B1 activity in the absence or presence of lenvatinib

Substrate	Molecular-targeted agents	V_{max}	K_m
	(3 μ M)	($\text{p mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 2 \text{ min}^{-1}$)	(μ M)
FL	Control	230 (222–238)	43.2 (39.0–47.4)
	lenvatinib	180 (173–187) *	55.5 (51.8–59.1) *
DCF	Control	203 (198–208)	10.8 (10.1–11.6)
	lenvatinib	173 (167–179) *	31.1 (27.0–35.1) *
atorvastatin	Control	26.6 (24.7–28.4)	0.63 (0.52–0.74)
	lenvatinib	28.0 (25.4–30.6)	1.25 (1.01–1.49) *
valsartan	Control	66.8 (65.8–67.9)	21.1 (20.1–22.0)
	lenvatinib	63.0 (58.6–67.4)	34.2 (28.4–40.0) *

Uptake experiments of substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (5–200 μ M), DCF (2–100 μ M), atorvastatin (0.2–5 μ M), and valsartan (5–150 μ M) in the absence or presence of lenvatinib (3 μ M) at 37°C for 2 min after 10 min before incubation. Each column represents estimated mean (95% confidence intervals) value ($n = 4$) obtained using MULTI software based on eq (2-1, 2-2) as described in Experimental Section. *Non-overlapping 95% confidence intervals, vs. Control. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein; K_m , Michaelis-Menten constant; V_{max} , maximum uptake. Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Table 2".

4. HEK/Mock 細胞および HEK/OATP1B1 細胞におけるレンバチニブの細胞内取り込み

HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞におけるレンバチニブの取り込み量は時間依存的に増加し、HEK/OATP1B1 細胞におけるレンバチニブの取り込み量は HEK/Mock 細胞における取り込み量と比較して、軽微であるが有意に増大した (Figure 2-4A)。また、レンバチニブの OATP1B1 を介した輸送は濃度依存的な増加し、飽和性が認められた。速度論的解析から得られたレンバチニブの OATP1B1 を介した輸送における V_{max} 値および K_m 値は、それぞれ 146 (106-186) pmol/mg protein/2 min、2.77 (1.37-4.18) μ M であった (Figure 2-4B)。

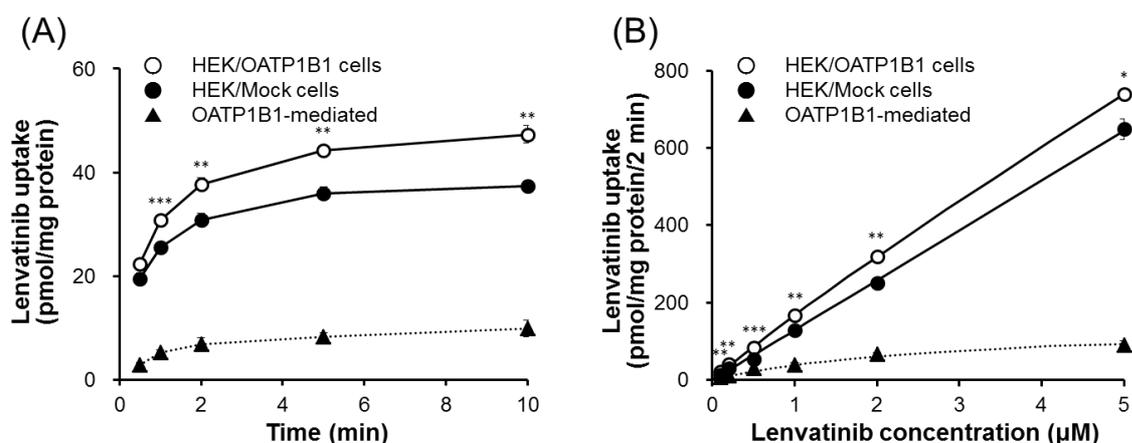


Figure 2-4. Cellular uptake of lenvatinib in HEK/OATP1B1 and HEK/Mock cells.

(A) Uptake experiment to determine potential time-dependent effects of lenvatinib in HEK/OATP1B1 (open circles) and HEK/Mock (closed circles) cells was performed in HEPES-HBSS containing lenvatinib (0.2 μ M) at 37°C for 0.5–10 min after 10 min pre-incubation. (B) Uptake experiment to determine potential concentration-dependence of lenvatinib in HEK/OATP1B1 (open circles) and HEK/Mock (closed circles) cells was performed in HEPES-HBSS containing lenvatinib (0.1–5 μ M) at 37°C for 2 min after 10 min pre-incubation. OATP1B1-mediated points (closed triangle) representing specific contribution of OATP1B1 to observed transport of lenvatinib were calculated by subtracting intracellular accumulation of lenvatinib in HEK/Mock cells from that in HEK/OATP1B1 cells. Fitted lines obtained using nonlinear least-squares regression analysis based on eq (2-1, 2-2) are shown as Michaelis-Menten plots; each point represents mean \pm S.E. (n = 4). The significance of any differences between means was determined using unpaired Student's t-test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001).

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 7".

第4節 考察

レンバチニブは、OATP1B1 を介した 5 種全ての基質の輸送を濃度依存的に強力に阻害し、その K_i 値は 1.49-3.21 μM であった (Figure 2-2 および Table 2-1)。レンバチニブ反復投与時の C_{max} は 1.21 μM と報告されており⁷⁹⁾、算出された R 値はレンバチニブの濃度が C_{max} と想定した場合はいずれもカットオフ値を満たした。しかしながら、レンバチニブは血清タンパク結合率が 96.6% と非常に高いため、レンバチニブの濃度を $[I]_{\text{u,inlet,max}}$ (= 0.16 μM) と想定した場合は、いずれもカットオフ値を満たさなかった。この基準のみではより積極的な肝濃縮などの理由で生じる偽陰性を完全には否定できないものの⁹⁹⁾、レンバチニブが臨床において OATP1B1 の直接的阻害を介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

レンバチニブは、FL、DCF、アトルバスタチンおよびバルサルタンの K_m を増大させた一方で、 V_{max} にほとんど影響しなかった (Table 2-2)。加えて、HEK/OATP1B1 細胞におけるレンバチニブの取り込み量は、HEK/Mock 細胞における取り込み量と比較して有意に高値を示した (Figure 2-4)。さらに、速度論的解析にて算出された K_m 値は 2.77 (1.37-4.18) μM であり、レンバチニブの K_i 値 (1.49-3.21 μM) と一致していた (Table 2-1)。これらの結果から、レンバチニブは OATP1B1 の基質となることで、他の OATP1B1 基質の輸送を競合的に阻害することが考えられた。興味深いことに、レンバチニブと共通する 4-(4-aminophenoxy)-quinoline 骨格を有するカボザンチニブの代謝物 EXEL-1644 が、OATP1B1 の基質であり阻害薬となること⁷⁷⁾ が報告されている。したがって、OATP1B1 がレンバチニブを基質認識するには、4-(4-aminophenoxy)-quinoline 骨格が重要である可能性が考えられる。

第5節 小活

本章では、OATP1B1 による基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響について詳細な検討を行い、次の知見を得た。

1. レンバチニブはOATP1B1 を介した輸送において検討した4種全ての基質の K_m 値を増大させること
2. レンバチニブがOATP1B1 の基質となること
3. レンバチニブの C_{max} から得た相互作用指数 R 値はカットオフ値を満たしたものの、 $[I]_{u,inket,max}$ から得た R 値はカットオフ値を満たさないこと

以上の結果から、レンバチニブがOATP1B1 の基質となることで、他のOATP1B1 基質の輸送活性を強力に阻害するものの、その高いタンパク結合率のため臨床用量から想定される血中濃度域ではOATP1B1 の直接的阻害に基づく薬物相互作用を引き起こす可能性は低いことを明らかにした。

第3章 分子標的抗がん薬存在下での OATP1B1 基質輸送の速度論的解析

第1節 緒言

第1章では、複数の OATP1B1 基質を用いて OATP1B1 の機能に及ぼす分子標的の影響について評価した結果、アフーチニブ、セリチニブおよびニンテダニブが OATP1B1 基質の輸送を促進または阻害するなど、OATP1B1 基質の種類によって異なる影響を及ぼすことを明らかにした。すなわち、1) アフーチニブがアトルバスタチン、DCF およびバルサルタンの輸送にほとんど影響しないものの、FL および SN-38 の輸送を促進させること、2) セリチニブが FL、DCF、アトルバスタチンおよび SN-38 の輸送を低下させるものの、バルサルタンの輸送を促進すること、3) ニンテダニブがアトルバスタチン、DCF、および SN-38 の輸送にほとんど影響しないものの、FL およびバルサルタンの輸送を促進させることを示した。単に OATP1B1 上に複数の基質結合部位があり⁵⁵⁾、基質により結合部位が異なっている場合は、同一の経路で輸送される基質群は同じ挙動を示すと考えられる。しかしながら、取り込み促進を観察した基質がアフーチニブでは FL および SN-38、セリチニブではバルサルタン、ニンテダニブでは FL およびバルサルタンであり、取り込み阻害を観察した基質が、セリチニブでは FL、DCF、アトルバスタチンおよび SN-38、ニンテダニブでは DCF および SN-38 であるなど、促進または阻害作用を受ける基質が分子標的薬間で一致しないことも明らかである。以上のことから、OATP1B1 に複数の基質結合部位が存在するという仮説のみでは、これら分子標的薬による多様な影響を説明することは難しい。

そこで本章では、OATP1B1 輸送機能に及ぼすアフーチニブ、セリチニブおよびニンテダニブの影響における基質間の相違性の原因を明らかにする目的に、速度論的解析を用いて詳細に検討することとした。

第2節 実験方法

1. 試薬

アトルバスタチン、カンプトテシン、DCF、FL、SN-38、バルサルタン、テルミサルタン、ロスバスタチンおよび酪酸ナトリウムは、Tokyo Chemical Industry より、アフアチニブおよびセリチニブは MedChem Express より、ニンテダニブは LC Laboratories より、それぞれ購入した。その他の試薬は試薬特級グレードまたは HPLC グレードのものを使用した。

2. 細胞

HEK293 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。なお、実験には OATP1B1 を安定発現させた HEK293 細胞 (HEK/OATP1B1 細胞) および空のベクターが導入された HEK293 細胞 (HEK/Mock 細胞) をそれぞれ使用した¹⁹⁾。

3. 試薬の調製

1) 細胞培養液の調製

D-MEM (Life Technologies) 粉末培地および NaHCO₃ (終濃度 44.0 mM) を pf-UPW 1L に溶解した後、PS-mix (終濃度 Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, Nakalai Tesque) 10 mL および MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x) (終濃度 0.1 mM, Nakalai Tesque) 10 mL を添加した。この時、HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞では、G418 (終濃度 0.72 mM, Nakalai Tesque) を添加した。クリーンベンチ内で、その混合液を 0.22 µm のメンブランフィルターを用いて濾過滅菌した後、0.45 µm のメンブランフィルターを用いて濾過滅菌した非動化済みの FBS (終濃度 10%, Lot No. AXM56561 および AAJ208538, Thermo Fisher scientific K.K.) 100 mL を添加し、細胞培養液を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存し、細胞培養時には温浴で 37°C に加温したものを用いた。

2) HEPES-HBSS (HEPES-Hank's balanced salt solution buffer) の調製

NaCl 4.00 g, KCl 0.20 g, CaCl₂ 0.07 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, MgCl₂·6H₂O 0.05 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.054g, KH₂PO₄ 0.03g, NaHCO₃ 0.176 g, Glucose 0.50 g および HEPES 2.98 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、1M NaOH で pH 7.4 とし、HEPES-HBSS を調製した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

3) PBS (Phosphate-buffered saline) の調製

NaCl 4.00 g、KCl 0.10 g、KH₂PO₄ 0.10 g および Na₂HPO₄·12H₂O 1.448 g を pf-UPW で溶解後、500 mL にメスアップし、PBS (-) を調製した。この時、PBS (+) は CaCl₂ (終濃度 0.9 mM)、MgCl₂ (終濃度 0.5 mM) を添加した。滅菌 PBS (-) 調製の場合は、121 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。調製後は冷蔵庫にて 4°C で保存した。

4. 細胞の継代

あらかじめ細胞培養液および滅菌 PBS (-) 溶液は 37°C に加温し、Trypsin-EDTA 溶液は室温に戻した。10 cm ディッシュの細胞培養液を吸引除去後、滅菌 PBS (-) 溶液により 2 回洗浄した。Trypsin-EDTA 溶液 2 mL を添加して、37°C で数分間加温することでディッシュから細胞を剥離した。細胞培養液 8 mL を添加し、190×g で 6 分間遠心分離した。上清除去後に得られたペレットを細胞培養液 10 mL で懸濁し、10 cm ディッシュ (IWAKI AGC Techno glass Co., Ltd.) に播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。

5. コラーゲンコート法

細胞接着と伸展の促進を目的として、株式会社ニッピのコラーゲンコート培養方法に従って、24 穴細胞培養プレート (Corning Inc.) および 12 穴細胞培養プレート (Corning Inc.) にコラーゲン処理を行った。すなわち、ウシ真皮由来 I 型コラーゲン (3 mg/mL) に濾過滅菌済 5 mM 酢酸を加え 300 倍希釈した溶液 (10 µg/mL, 24 穴細胞培養プレート) または 150 倍希釈した溶液 (20 µg/mL, 12 穴細胞培養プレート) を、0.5 mL ずつ各穴に添加した。30 分静置後、内容液を吸引除去した。その後 30 分間風乾させ、PBS (-) 0.5 mL で 3 回洗浄し細胞播種に用いた。

6. 細胞播種

HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞をコラーゲン処置済 24 穴細胞培養プレート (0.5×10⁵ cells/mL/well) または 12 穴細胞培養プレート (1.5×10⁵ cells/mL/well) に播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。3 日間後、遺伝子発現を活性化させる目的でヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である酪酸ナトリウム (終濃度 5 mM) 含有細胞培養液に交換し、培養した⁵⁸⁾。翌日、細胞内取り込み実験を第 3 章第 2 節 7. に示すとおり行った。

7. 細胞内取り込み実験

細胞内取り込み実験は、第1章第2節7.と同様に行った。細胞は、37°Cに加熱した HEPES-HBSS 溶液 (pH 7.4) で2回洗浄し、加熱した HEPES-HBSS で10分間プレインキュベーションした。分子標的薬の濃度を変化させた OATP1B1 基質の輸送実験では、基質と同時に分子標的薬を添加した。試験溶液として、各種基質 (FL: 3 μ M, DCF: 1 μ M, アトルバスタチン: 0.5 μ M, SN-38: 1 μ M, バルサルタン: 1 μ M) のみを HEPES-HBSS に溶解したコントロール溶液、基質に各種分子標的薬 (アフアチニブ, セリチニブ, ニンテダニブ: 0.3-30 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液を調製した。なお、基質として SN-38 を用いる場合は、取り込み実験の前日に DMSO に溶解し、等量の 0.05 M NaOH を添加することで SN-38 を完全にカルボキシ体に変換したのを用い、取り込み実験開始3分前に試験溶液を調製した^{19, 39)}。

基質濃度を変化させた実験では、顕著な促進または阻害 ($IC_{50} < 30 \mu$ M) が認められた基質と分子標的薬の組み合わせを選択し、DCF と分子標的薬の組み合わせを比較対象とした。試験溶液として、各種基質 (FL: 5-200 μ M, DCF: 2-100 μ M, アトルバスタチン: 0.2-5 μ M, バルサルタン: 5-150 μ M) のみを HEPES-HBSS に溶解したコントロール溶液、基質に各種分子標的薬 (アフアチニブ, セリチニブ, ニンテダニブ: 30 μ M) を添加した HEPES-HBSS 溶液を調製した。なお、SN-38 の検討に関しては SN-38 の溶解度が低いため十分な濃度の取り込み実験が行えなかったことから、検討した濃度範囲内では輸送飽和性が確認できず、速度論的解析を行うための十分なデータを確保できなかった。取り込み実験は、37°Cに加熱した試験溶液 0.3 mL (24 穴細胞培養プレート) または 0.5 mL (12 穴細胞培養プレート) を添加することにより開始した。一定時間 (FL, DCF, アトルバスタチンおよびバルサルタン: 2 分, SN-38: 0.5 分) 経過後に、試験溶液を吸収除去することにより取り込みを停止した。その後、直ちに氷上に移し、氷冷 PBS (+) で細胞を3回ずつ素早く洗浄した。なお、OATP1B1 機能評価実験に先立ち、基質の細胞内取り込み量を経時的に測定したところ、FL、DCF およびアトルバスタチンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と5分間以降での定常状態が、バルサルタンでは2分間までの範囲内において時間依存的な増加と10分間以降での定常状態がそれぞれ観察されたため、基質の輸送実験は取り込み時間を2分間とした。一方、SN-38 では取り込み1分間までの範囲内において時間依存的な増加が観察されたものの、それ以降では速やかに定常状態に達したため、基質の輸送実験は取り込み時間を0.5分間とした。また、いずれの基質においても、分子標的薬の濃度を変化させた輸送実験は、基質濃度と細胞内取り込み量との間に線形性が成り立つ濃度範囲内において検討した。取り込み実験終了後、第3章第2節8.に示す細胞内薬物量の定量が行われるまで-80°Cにて保管した。

8. 細胞内薬物量の定量

基質として FL および DCF を用いた場合は、0.1 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解させた細胞溶液を、基質としてアトルバスタチンおよびバルサルタンを用いた場合は UPW 500 μ L で凍結融解した細胞懸濁液を、基質として SN-38 を用いた場合は 0.4 M NaOH 水溶液 350 μ L でアルカリ溶解後、0.4 M HCl 水溶液 350 μ L で中和させた細胞溶液をそれぞれ検体とし、以下に示す基質の細胞内蓄積量の定量を行った。なお、基質の取り込み量は、タンパク質の定量により単位タンパク質当たりの基質取り込み量とした。

1) FL および DCF の定量

FL および DCF は、Izumi らの報告⁶⁰⁾ に準じて行った。検体 200 μ L を 96 穴蛍光測定用黒色プレート (CorningTM 96-well Solid Black Polystyrene Microplates, Corning Inc.) に分取後、Multi-Mode Microplate Reader (Power Scan[®] HT, BioTek Japan) を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm にて蛍光強度を測定することで定量した。

2) アトルバスタチンの定量

アトルバスタチンの定量は、Ayad らの報告⁶²⁾ に準じて行った。検体 400 μ L に内標準物質である 2 nM テルミサルタン含有アセトニトリル 1,200 μ L を添加し⁶³⁾、1 分間攪拌後、15,000 \times g で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μ L を分取後、窒素気流下にて 40 $^{\circ}$ C で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40) 150 μ L を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径 5 μ m, 長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) : アセトニトリル = 60 : 40
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長 260 nm, 蛍光波長 300 nm
カラム槽温度	: 40 $^{\circ}$ C
保持時間	: アトルバスタチン 13 分, テルミサルタン 6 分

3) SN-38 の定量

SN-38 の定量は、Katsube らの報告¹⁹⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 1.25 ng/mL カンプトテシン含有 50% メタノール水溶液 100 μL およびアセトニトリル 1,300 μL を順次添加し、1 分間攪拌後、15,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離することで除タンパクした上清 1,600 μL を分取後、すべてラクトン体にするために上清に 0.2 M HCl 100 μL を加え^{19,39)}、窒素気流下にて 40 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル = 75 : 25) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径 5 μm , 長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル = 75 : 25
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長 370 nm, 蛍光波長 530 nm
カラム槽温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$

4) バルサルタンの定量

バルサルタンの定量は Rao の方法⁶⁴⁾ に準じて行った。検体 400 μL に内標準物質である 50 nM ロサルタン含有アセトニトリル 1,200 μL を順次添加し⁶⁵⁾、1 分間攪拌後、15,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 1,500 μL を分取後、窒素気流下にて 40 $^{\circ}\text{C}$ で蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.0) : アセトニトリル = 55 : 45) 150 μL を添加し溶解したものを下記の HPLC 分析条件にて定量した。

使用機器	: Shimadzu CBM-20A Prominence Communications Bus Module (島津製作所)
オートインジェクタ	: SIL-20A (島津製作所)
ポンプ	: LC-20AT (島津製作所)
カラム	: Inertsil ODS-III (粒子径 5 μm , 長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社)
移動相	: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.0) : アセトニトリル = 55 : 45
流速	: 1.0 mL/min
検出器	: RF-20Axs (島津製作所)
検出波長	: 励起波長 270 nm, 蛍光波長 380 nm
カラム槽温度	: 40 $^{\circ}\text{C}$
保持時間	: バルサルタン 14 分, ロサルタン 7 分

5) タンパク質の定量

タンパク質の定量は、BSA を標準タンパク質とした Lowly らの方法⁶⁶⁾ に準じて行った。サンプル 200 μL に対して 2 w/v % Na_2CO_3 含有 0.1 M NaOH 水溶液と 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 含有 1 w/v % 酒石酸カリウム水溶液を 50:1 で混合した溶液 1 mL を添加後、直ちに攪拌した。10 分間静置後に、UPW で 2 倍希釈したフェノール試薬 100 μL を添加し、直ちに攪拌した。30 分間静置したものを Multi-Mode Microplate Reader (Power Scan[®] HT, BioTek Japan) を用いて、検出波長 750 nm にて吸光度を測定した。

9. データ解析

1) 統計学的解析

OATP1B1 特異的な基質の取り込み速度は、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み速度から、HEK/Mock 細胞における取り込み速度を差し引いて算出した。得られた測定値は、すべて平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) ($n = 4$) または算出値 (95% 信頼区間 (平均値 $\pm 1.96 \times \text{S.E.}$)) ($n = 4$) で表示した。統計学的検定として、三群間以上の多群間の比較には non-repeated measures a one-way ANOVA に続く Dunnett's test を適応した。その際、危険率 5% 未満 (両側) を有意差ありとした。また、輸送パラメータの比較は、両群の 95% 信頼区間が重ならない場合を有意差ありとした。統計学的解析には、統計解析ソフト SPSS II version 24.0. (IBM) を用いた。

2) 速度論的解析

OATP1B1 の輸送パラメータである V_{\max} および K_m は、MULTI program を用いて⁹¹⁾、HEK/OATP1B1 細胞および HEK/Mock 細胞において基質濃度依存性実験から得られたデータに式 (3-1, 3-2) を当てはめることで算出した。

HEK/OATP1B1 細胞の場合：

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m \times [S]} + P_{\text{dif}} \times [S] \quad \dots\dots\dots (3-1)$$

HEK/Mock 細胞の場合：

$$v = P_{\text{dif}} \times [S] \quad \dots\dots\dots (3-2)$$

ここで、 v 、 $[S]$ および P_{dif} は、それぞれ取り込みの初速度 (initial uptake velocity)、基質濃度、非特異的取り込みクリアランス (non-saturable uptake velocity) を示す。

OATP1B1 を介した基質輸送に対する分子標的薬の IC_{50} 、50%促進濃度 (EC_{50}) および最大促進作用 (E_{max}) は、MULTI program を用いて⁹⁴⁾、得られたデータに式 (3-3-3-6) を当てはめることにより算出した^{72,95)}。

阻害作用の場合：

$$uptake (\% \text{ of control}) = P \times \left(1 - \frac{[I]}{IC_{50} + [I]} \right) \dots\dots\dots (3-3)$$

$$uptake (\% \text{ of control}) = P \times \left(1 - \frac{[I]}{IC_{50} + [I]} \right) + P_0 \dots\dots\dots (3-4)$$

促進作用の場合：

$$uptake (\text{fold increase}) = \frac{E_{max} \times [I]}{EC_{50} + [I]} \dots\dots\dots (3-5)$$

$$uptake (\text{fold increase}) = \frac{E_{max} \times [I]^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + [I]^{\gamma}} \dots\dots\dots (3-6)$$

ここで、 γ は、シグモイド定数 (sigmoidal constant) を示す。なお、最適適合モデルは、AIC の値が最も低値したものを選択した⁹⁶⁾。

また、分子標的薬の OATP1B1 輸送活性に対する K_i は、競合阻害を仮定した式 (3-7) を用いて算出した⁹⁷⁾。なお、SN-38 の $[S]$ は K_m 値よりも十分に低いと推定されたので、SN-38 の K_i 値は IC_{50} とほぼ同一であるとした。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)} \dots\dots\dots (3-7)$$

3) 薬物相互作用指数予測

OATP1B1 の直接的阻害を介した DDI の可能性を予測するために、OATP に関する FDA のドラフトガイダンスに従い⁸⁷⁾、それぞれの分子標的薬の臨床推定用量における定常状態の C_{max} および $[I]_{u,inlet,max}$ 並びに本研究で得られた各基質を用いた際における K_i 値を用いて、式 (3-8) から薬物相互作用指数 (R 値：特定の取り込み反応に対する被験薬の存在下と非存在下の OATP1B1 を介した輸送における基質の固有クリアランス値の比) を算出した。OATP1B1 の機能評価は、FDA では、 $[I] = C_{max}$ を用いた場合と $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を用いた場合の 2 段階⁸⁷⁾、本邦においては $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を用いた場合の 1 段階で行われ

ている⁸⁹⁾(Figure 2-1)。

$$R = 1 + \frac{[I]}{K_i} \dots\dots\dots (3-8)$$

なお、 $[I]$ には、 $[I]_{u,inlet,max}$ または C_{max} を代入した。FDA のドラフトガイダンスに従い、式 (3-9) に $[I] = C_{max}$ を代入した場合は $R = 1.1$ を、 $[I] = [I]_{u,inlet,max}$ を代入した場合は $R = 1.25$ を、それ以上の値を示せば薬物相互作用が生じうるしきい値とした。 $[I]_{u,inlet,max}$ は、式 (7) を用いて算出した⁹⁸⁾。

$$[I]_{u,inlet,max} = f_u \times \left(C_{max} + \frac{k_a \times Dose \times F_a \times F_g}{Q_h} \right) \dots\dots\dots (3-9)$$

ここで、 f_u は血中非結合率、 k_a は分子標的薬の吸収速度定数、 $Dose$ は分子標的薬の一回投与量、 $F_a \times F_g$ は分子標的薬の消化管アベイラビリティ、 Q_h は総肝血流量 (97 L/hr) を示す。本研究では、既報に基づき、偽陰性の予測リスクを避けるために $k_a = 0.1$ および $F_a \times F_g = 1$ に設定した⁹⁸⁾。

第3節 結果

1. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすアファチニブの濃度依存的な影響

アファチニブは、OATP1B1 を介した FL の取り込みをアファチニブ処置濃度 30 μM まで濃度依存的に有意に促進させた。また、アファチニブは、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みをアファチニブ処置濃度 3 μM まで濃度依存的に増大させ、それ以上の濃度では一定となった。一方で、OATP1B1 を介した DCF、アトルバスタチンおよびバルサルタンの取り込みに及ぼすアファチニブの影響は軽微であった (Figure 3-1)。

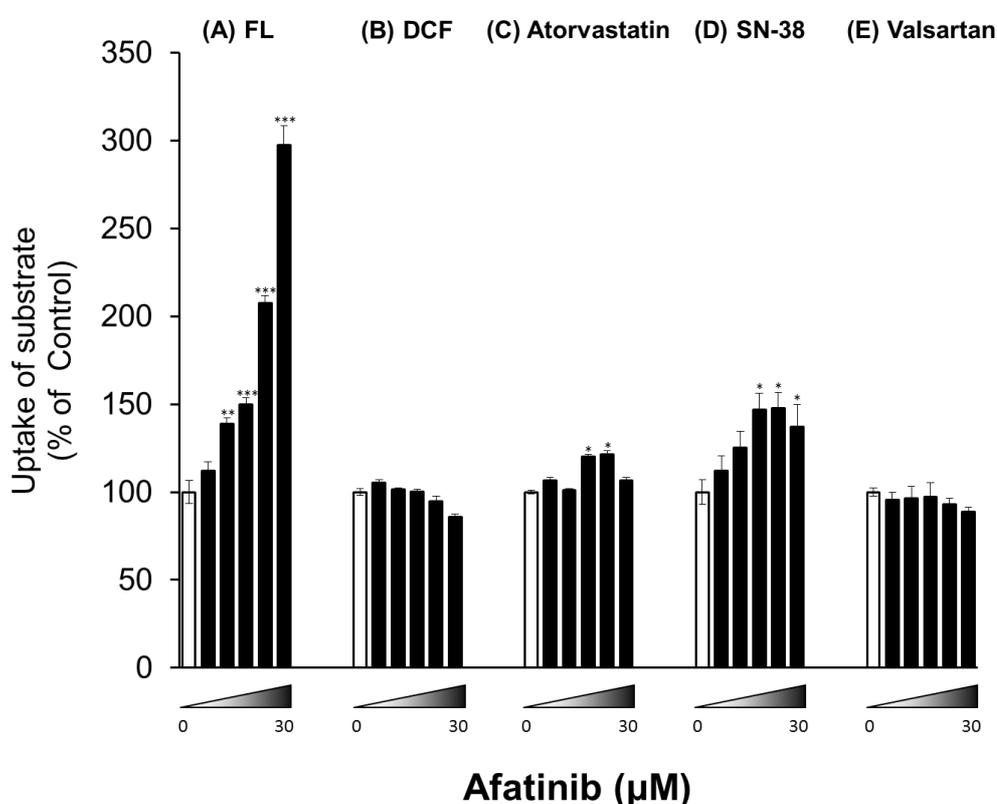


Figure 3-1. Concentration-dependent effect of afatinib on OATP1B1-mediated uptake of substrates.

Uptake experiments with substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (A, 3 μM), DCF (B, 1 μM), atorvastatin (C, 0.5 μM), SN-38 (D, 1 μM), and valsartan (E, 1 μM) in the absence (Control) or presence afatinib (0.3–30 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min (FL, DCF, atorvastatin, and valsartan) or 0.5 min (SN-38) after 10 min of pre-incubation. Each point represents mean \pm S.E. (n = 4). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 6".

2. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすセリチニブの濃度依存的な影響

セリチニブは、OATP1B1 を介した FL、DCF、アトルバスタチンおよび SN-38 の取り込みを濃度依存的に低下させた。一方で、セリチニブは OATP1B1 を介したバルサルタンの取り込みを濃度依存的に増大させ、その影響はセリチニブ処置濃度 3 μM 以降で一定となった (Figure 3-2)。

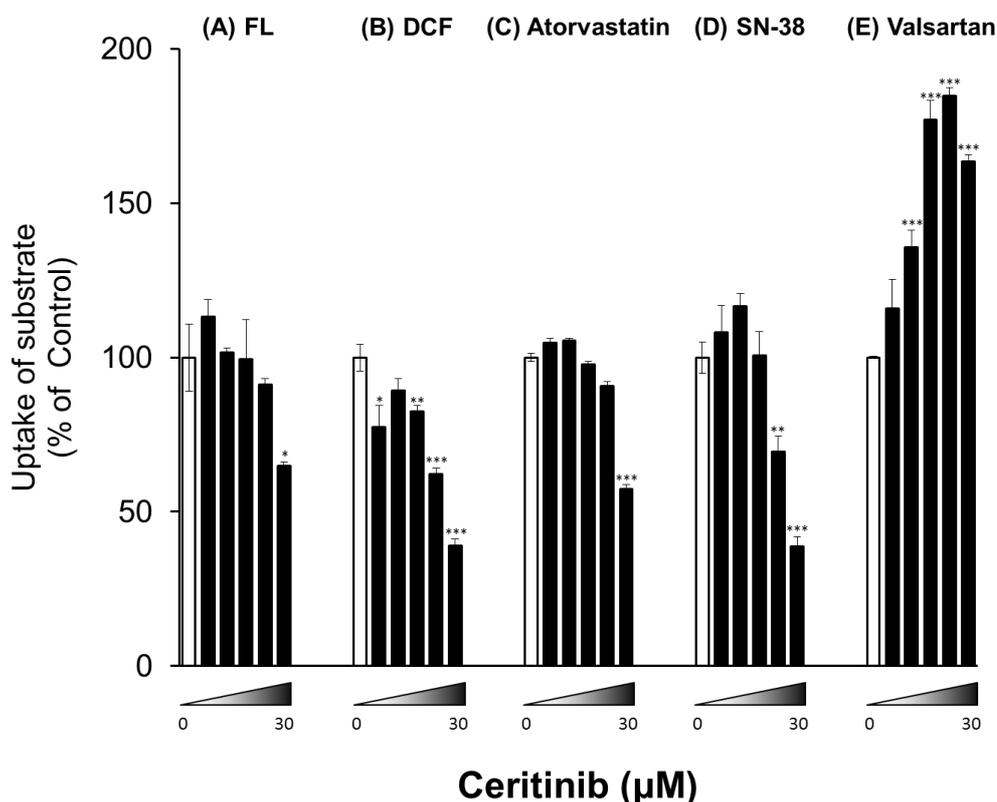


Figure 3-2. Concentration-dependent effect of ceritinib on OATP1B1-mediated uptake of substrates.

Uptake experiments with substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (A, 3 μM), DCF (B, 1 μM), atorvastatin (C, 0.5 μM), SN-38 (D, 1 μM), and valsartan (E, 1 μM) in the absence (Control) or presence ceritinib (0.3–30 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min (FL, DCF, atorvastatin, and valsartan) or 0.5 min (SN-38) after 10 min of pre-incubation. Each point represents mean \pm S.E. (n = 4). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 6".

3. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼすニンテダニブの濃度依存的な影響

ニンテダニブは、OATP1B1 を介した FL およびバルサルタンの取り込みは濃度依存的に増大させ、その影響はニンテダニブ処置濃度 10 μM 以降で一定となった。一方で、ニンテダニブは OATP1B1 を介した DCF、アトルバスタチンおよび SN-38 の取り込みを軽微に低下させた (Figure 3-3)。

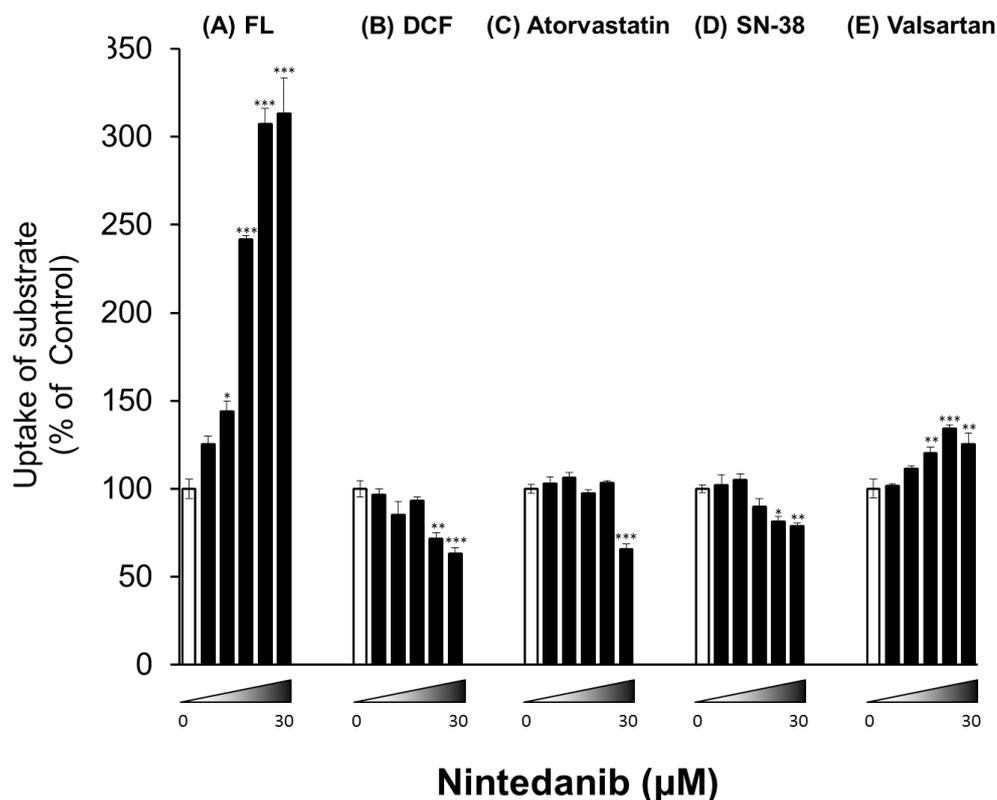


Figure 3-3. Concentration-dependent effect of nintedanib on OATP1B1-mediated uptake of substrates.

Uptake experiments with substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (A, 3 μM), DCF (B, 1 μM), atorvastatin (C, 0.5 μM), SN-38 (D, 1 μM), and valsartan (E, 1 μM) in the absence (Control) or presence of nintedanib (0.3–30 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min (FL, DCF, atorvastatin, and valsartan) or 0.5 min (SN-38) after 10 min of pre-incubation. Each point represents mean \pm S.E. (n = 4). The significance of any differences from Control were determined using analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test (* p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein. Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Figure 6".

4. 薬物相互作用指数予測

Table 3-1 には、Figure 3-2 から算出した IC_{50} 値並びに既報から算出された R 値を示す。

OATP1B1 を介した DCF および SN-38 の輸送におけるセリチニブの IC_{50} 値はそれぞれ $20.4 \mu\text{M}$ および $18.0 \mu\text{M}$ であった。また、FL、DCF、アトルバスタチンおよび SN-38 を基質とした際のセリチニブの R 値は、濃度が C_{max} を想定した時、それぞれ < 1.07 、 1.10 、 < 1.11 、 1.10 であり、濃度が $[I]_{\text{u,inlet,max}}$ を想定した時、それぞれ < 1.09 、 1.14 、 < 1.15 および 1.14 であった。

Table 3-1. IC_{50} and R values of ceritinib inhibition of OATP1B1 activity.

Molecular-targeted agents	Substrate	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	C_{max} (μM)	$[I]_{\text{u,inlet,max}}$ (μM)	R value	
						$[I] = C_{\text{max}}$	$[I] = [I]_{\text{u,inlet,max}}$
ceritinib	FL	> 30	> 27.7			< 1.07	< 1.09
	DCF	20.4 ± 1.3	18.4 ± 1.2	1.81	2.55	1.10	1.14
	atorvastatin	> 30	> 16.7			< 1.11	< 1.15
	SN-38	18.0 ± 1.8	18.0 ± 1.8			1.10	1.14

Each column represents the estimated mean \pm S.E. obtained using MULTI software based on eq (3-3, 3-4, 3-7–3-9) as described in the Experimental Section. Dosage and plasma concentration information obtained from cited pharmacokinetics studies⁷¹⁾. Values of f_u , Dose were set to 0.03, 750 mg. C_{max} , steady-state total plasma concentration; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein; f_u , unbound fraction in blood; $[I]_{\text{u,inlet,max}}$, estimated maximum unbound concentration of molecular-targeted agent at the inlet to the liver; IC_{50} , Half-maximal inhibitory concentration; K_i , inhibition constant.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Table 1".

Table 3-2 には、Figure 3-1-3-3 から算出した EC_{50} 値および E_{max} 値を示す。

OATP1B1 を介した SN-38 の輸送におけるアフアチニブの EC_{50} 値および E_{max} 値はそれぞれ 0.61 μ M および 0.46 であった。また、OATP1B1 を介したバルサルタンの輸送におけるセリチニブの EC_{50} 値および E_{max} 値はそれぞれ 0.96 μ M および 0.77 であった。さらに、OATP1B1 を介した FL およびバルサルタンの輸送におけるニンテダニブの EC_{50} 値はそれぞれ 2.11 μ M および 1.72 μ M、 E_{max} 値はそれぞれ 2.20 および 0.32 であった。

Table 3-2. EC_{50} and E_{max} of afatinib, ceritinib, nintedanib stimulation of OATP1B1 activity.

Molecular-targeted agents	Substrate	EC_{50}	E_{max}	C_{max}	$[I]_{u,inlet,max}$
		(μ M)	(Fold increase)	(μ M)	(μ M)
afatinib ⁷⁰⁾	SN-38	0.61 \pm 0.23	0.46 \pm 0.03	0.17	0.26
ceritinib ⁷¹⁾	valsartan	0.96 \pm 0.08	0.77 \pm 0.02	1.81	2.55
nintedanib ¹⁰⁰⁾	FL	2.11 \pm 0.13	2.20 \pm 0.05	0.07	0.38
	valsartan	1.72 \pm 0.42	0.32 \pm 0.02		

Each column represents the estimated mean \pm S.E. obtained using MULTI software based on eq (3-3-9) as described in the Experimental Section. Dosage and plasma concentration information obtained from cited pharmacokinetics studies^{70,71,100)}. Values of f_u , Dose were set to 0.05, 40 mg (afatinib), 0.03, 750 mg (ceritinib), and 0.022, 150 mg (nintedanib). C_{max} , steady-state total plasma concentration; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; EC_{50} , half-maximal effective concentration; E_{max} , maximal effect; FL, fluorescein; f_u , unbound fraction in blood; $[I]_{u,inlet,max}$, estimated maximum unbound concentration of molecular-targeted agent at the inlet to the liver.

Cited from "Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Table 1".

5. OATP1B1 を介した基質輸送に及ぼす分子標的薬の影響に関する速度論的解析

Figure 3-4 には、分子標的薬共存下における基質濃度依存実験の結果を示す。また、Table 3-3 には、および速度論的解析の結果を示す。

アフアチニブ およびニンテダニブ (30 μM) 存在下における FL の V_{max} 値は、コントロールと比較してそれぞれ 56% および 75% 有意に高値を示した。一方、ニンテダニブ存在下における FL の K_m 値は、コントロールと比較して 39% 有意に低値を示した。加えて、アフアチニブ存在下における FL の K_m 値はコントロールと比較して有意な差は認められなかった。

アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブ (それぞれ 30 μM) 存在下における DCF の V_{max} 値は、コントロールと比較してそれぞれ 16%、30% および 31% 有意に低値を示した。一方、セリチニブ存在下における DCF の K_m 値は、コントロールと比較して 253% 有意に高値を示した。加えて、アフアチニブおよびニンテダニブ存在下における DCF の K_m 値はコントロールと比較して有意な差は認められなかった。

セリチニブ (30 μM) 存在下におけるバルサルタンの V_{max} 値は、コントロールと比較してそれぞれ 14% 有意に低値を示した。一方、セリチニブ存在下におけるバルサルタンの K_m 値は、コントロールと比較して 54% 有意に低値を示した。

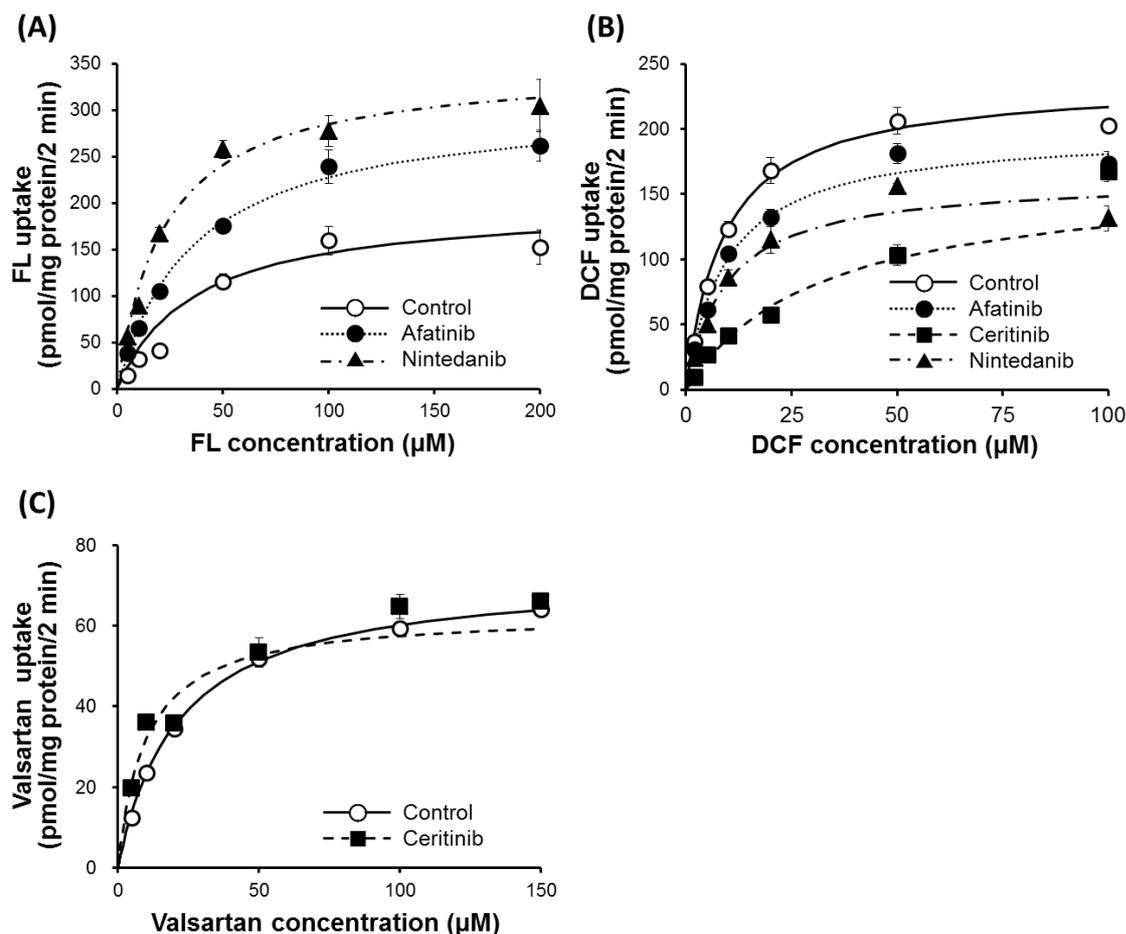


Figure 3-4. Concentration dependence of OATP1B1-mediated transport of substrates in the absence or presence of afatinib, ceritinib, and nintedanib.

Uptake experiments of (A) FL, (B) DCF, and (C) valsartan in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (5–200 μM), DCF (2–100 μM), and valsartan (5–150 μM) in the absence (open circles) or presence of afatinib (30 μM, closed circles), ceritinib (30 μM, closed squares), nintedanib (30 μM, closed triangles) at 37°C for 2 min after 10 min before incubation. Fitted lines obtained using nonlinear least-squares regression analysis based on eq (3-1, 3-2) are shown as Michaelis-Menten plots; each point represents mean ± S.E. (n = 4). DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein.

Table 3-3. Kinetic parameters of OATP1B1 activity in the absence or presence of afatinib, ceritinib, and nintedanib

Substrate	Molecular-targeted agents	V_{\max}	K_m
	(30 μM)	($\text{pmol}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot 2 \text{ min}^{-1}$)	(μM)
FL	Control	199 (178–220)	36.4 (25.5–47.4)
	afatinib	310 (297–323) *	36.1 (32.6–39.5)
	nintedanib	349 (331–366) *	22.2 (19.4–25.1) *
DCF	Control	236 (230–243)	8.98 (8.14–9.83)
	afatinib	198 (193–204) *	9.62 (8.83–10.4)
	ceritinib	165 (157–173) *	31.7 (28.1–35.4) *
	nintedanib	162 (153–172) *	9.47 (7.84–11.1)
valsartan	Control	73.2 (71.9–74.5)	21.6 (20.5–22.6)
	ceritinib	63.1 (61.1–65.1) *	9.83 (8.82–10.8) *

Uptake experiments of substrates in HEK293 cells were performed in HEPES-HBSS containing FL (5–200 μM), DCF (2–100 μM), and valsartan (5–150 μM) in the absence or presence of afatinib, ceritinib, nintedanib (30 μM each) at 37°C for 2 min after 10 min before incubation. Each column represents estimated mean (95% confidence intervals) value ($n = 4$) obtained using MULTI software based on eq. (3-1, 3-2) as described in Experimental Section. *Non-overlapping 95% confidence intervals, vs. Control. DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; FL, fluorescein; K_m , Michaelis-Menten constant; V_{\max} , maximum uptake.

Cited from “Koide H., et al., *Xenobiotica* Published Online: Nov 10, 2017; Table 2”.

第4節 考察

セリチニブは、OATP1B1 を介した FL、DCF、ATR および SN-38 の輸送を濃度依存的に阻害し、その K_i 値は $16.7 \mu\text{M}$ 以上であった (Table 3-1)。算出された R 値は、セリチニブの濃度を C_{max} ($=1.21 \mu\text{M}$) または $[I]_{\text{u,inlet,max}}$ ($=0.16 \mu\text{M}$) のどちらを想定した場合も相互作用が生じうるカットオフ値を満たさなかった。よって、セリチニブが、臨床用量内において OATP1B1 を直接的に阻害することで生じる薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

アフアチニブは、OATP1B1 を介した SN-38 の輸送を濃度依存的に促進させ (EC_{50} 値 $=0.61 \mu\text{M}$: Figure 3-1 および Table 3-2)、セリチニブは OATP1B1 を介したバルサルタンの輸送を濃度依存的に促進させた (EC_{50} 値 $=0.96 \mu\text{M}$: Figure 3-2 および Table 3-2)。トランスポーターの活性化を介した薬物相互作用のリスク評価に関しては R 値のような指標は知られていない。しかしながら、アフアチニブおよびセリチニブの EC_{50} 値は、それぞれ臨床用量を反復投与した場合に予測される C_{max} および $[I]_{\text{u,inlet,max}}$ と同程度であることから (Table 3-2)、これら分子標的薬は臨床的用量内で達し得る濃度で十分に OATP1B1 を介した SN-38 およびバルサルタンの輸送を促進することが考えられる。したがって、アフアチニブおよびセリチニブ服用中の患者において、それぞれ SN-38 およびバルサルタンの血中濃度が低下していることが危惧される。今後、ヒトヘパトサイトを用いた検討や臨床試験により、アフアチニブおよびセリチニブによる OATP1B1 輸送促進の臨床的意義が明らかになるだろう。

本検討において、アフアチニブおよびニンテダニブは FL の V_{max} を顕著に増大させる一方で、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは DCF の V_{max} を低下させた (Figure 3-4 および Table 3-3)。また、セリチニブは DCF の K_m を増大させたものの、バルサルタンの K_m を低下させた。すなわち、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは K_m または V_{max} を変動させ、その影響は基質の種類により大きく異なった。また、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、いずれも OATP1B1 の基質とならないことも報告されている⁷⁰⁻⁷²⁾。これらのことから、これら分子標的薬は、基質結合部位以外に作用し、OATP1B1 の基質に対する親和性および基質のトランスロケーションを制御していると考えられる。また、 E_2G と E_1S の両者は互いに競合的阻害することが報告されているが⁵⁷⁾、OATP1B1 のアミノ酸残基の機能解析により、たとえば R57A の突然変異は E_2G の K_m を顕著に増大させる一方で E_1S の K_m には影響を及ぼさない、K361A の突然変異は E_2G の K_m を顕著に増大させる一方で E_1S の V_{max} を顕著に低下させるなどアミノ酸突然変異の影響が E_2G と E_1S で異なることも報告されている¹⁰⁾。したがって、OATP1B1 上の基質結合部位が同一であったとしても、基質の結合過程または基質のトランスロケーション過程に重要なファーマコフォアは基質の種類によって異なるのかも知れない。

いずれにしても、基質によって変化する OATP1B1 輸送機能に及ぼすアフチニブ、セリチニブおよびニンテダニブの影響の相違性は、アロステリックな調節を介した基質の結合過程または基質のトランスロケーション過程への影響が基質の種類による異なることに起因していると推察される。OATP1B1 の基質認識機構または輸送機構を規定するアミノ酸領域の解析は、限定的であり¹⁰²⁻¹⁰⁴、OATP1B1 の結晶構造も明らかにされていない。今後、このような情報の蓄積により、基質の OATP1B1 を介した輸送に対するアフチニブ、セリチニブおよびニンテダニブの影響の全貌が明らかになることが期待される。

第5節 小活

本章では、分子標的薬存在下 OATP1B1 の基質輸送における速度論的解析について検討し、次の知見を得た。

1. アファチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、OATP1B1 を介した基質輸送において K_m 値や V_{max} 値を変動させること
2. アファチニブおよびセリチニブは、臨床濃度付近において、それぞれ OATP1B1 を介した SN-38 およびバルサルタンの輸送を促進させること

以上の結果から、アファチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、OATP1B1 の基質に対する親和性および基質のトランスロケーションを制御することで OATP1B1 輸送機能に対して多様な影響を及ぼし、その影響は実臨床においても生じるうる可能性が明らかとなった。

総括

本論文では、OATP1B1 安定発現 HEK293 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、分子標的薬が OATP1B1 輸送機能に及ぼす影響を複数の基質 (FL、DCF、アトルバスタチン、SN-38 およびバルサルタン) を用いて比較検討した。その結果、以下に示す知見を得ることができた。

第1章: OATP1B1 を介した基質の取り込みに及ぼす分子標的抗がん薬の影響

カボザンチニブ、セジラニブ、ネラチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、ソラフェニブおよびチバンチニブは、OATP1B1 を介した5種の基質の輸送にほとんど影響しないことが示された。一方で、ニコチニブはFL以外の基質の輸送を50%程度阻害し、レンバチニブは5種全ての基質の輸送を強力に阻害することが示された。また、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、OATP1B1 基質の輸送を促進または阻害するなど、基質の種類により大きく異なる影響を有することが明らかになった。以上の結果から、分子標的薬による OATP1B1 を介した薬物相互作用が疑われる場合には、実臨床で相互作用が疑われた OATP1B1 基質薬物を用いた評価が必要であると考えられた。

第2章: OATP1B1 による基質輸送に及ぼすレンバチニブの影響

レンバチニブは、OATP1B1 を介した輸送において検討した FL、DCF、アトルバスタチンおよびバルサルタンの K_m 値を増大させ、OATP1B1 発現細胞におけるレンバチニブの取り込み速度は非発現細胞よりも有意に高値であったことから、レンバチニブが OATP1B1 の基質となることで、他の OATP1B1 基質の輸送活性を強力に阻害することが明らかになった。一方で、レンバチニブの C_{max} から得た相互作用指数 R 値は相互作用が生じうるカットオフ値を満たしたものの、 $[I]_{u_{inlet,max}}$ から得た R 値はカットオフ値を満たさなかったことから、レンバチニブは臨床用量内では OATP1B1 を直接的に阻害することで生じる薬物相互作用を引き起こす可能性は低いことが明らかになった。

第3章: 分子標的薬存在下での OATP1B1 基質輸送の速度論的解析

アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブは、OATP1B1 を介した基質輸送において K_m 値や V_{max} 値を変動させたから、OATP1B1 の基質に対する親和性および基質のトランスロケーションを制御することで OATP1B1 輸送機能に対して多様な影響を及ぼすものと考えられた。また、アフアチニブおよびセリチニブは、臨床濃度付近において、それぞれ OATP1B1 を介した SN-38 およびバルサルタンの輸送を促進させたことから、これら分子標的薬の服用が SN-38 およびバルサルタンの血中濃度を

低下させる可能性が考えられた。

本研究により、レンバチニブが OATP1B1 の基質となることで、OATP1B1 輸送活性を強力に阻害することを明らかにした。一方で、アフアチニブ、セリチニブおよびニンテダニブが OATP1B1 輸送機能に対して基質ごとに異なる多様な影響を有することを示し、一部の分子標的薬では OATP1B1 を介する薬物相互作用の評価が単一の基質のみでは不適切である可能性を明らかにした。

以上の知見は、OATP1B1 を介した薬物相互作用について、*in vitro* 試験系を用いて評価を行う上で有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬物分野 西口工司 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査をして頂き、御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学薬物動態学分野 柴田敏之 教授ならびに京都薬科大学臨床薬学教育センター 矢野義孝 教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 辻本雅之 講師に衷心より深甚なる謝意を表します。

数々の有益な御助言を戴いた京都薬科大学臨床薬学分野 峯垣哲也 助教ならびに勝部友理恵 学士に深謝します。

実験の一部に御協力戴いた京都薬科大学臨床薬学分野 学部生 竹内あい さん、田中美優 さん、池上葉子 さん、田上真優 さん、阿部祥子 さん、橋本実季 さんに深く御礼申し上げます。

臨床研修の機会をご提供頂くとともに、臨床研究の御指導を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部 寺田智祐 教授、森田真也 准教授、平大樹 客員助教、池田義人 特任助教をはじめとする薬剤部の皆様に心より感謝申し上げます。

大学院生活を共に過ごした東和薬品 (株) 内山仁 修士、仁真会白鷺病院薬剤科 吉田拓弥 博士、京都薬科大学 臨床薬学分野 宮本恵輔 学士、卒業生の皆様ならびに学部生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念いたします。

最後に、常に私を支えて下さり、研究に専念できる自由を与えて下さった、家族に心より深く感謝致します。

引用文献

1. Kazuya Maeda, Yuichi Sugiyama. Transporter biology in drug approval: regulatory aspects. *Mol. Aspects Med.* **2013**, 34, 711-718.
2. Kazuya Maeda. Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Bio. Pharm. Bull.* **2015**, 38, 155–168.
3. A. Kalliokoski, M. Niemi. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 158, 693-705.
4. Takao Watanabe, Hiroyuki Kusuhara, Kazuya Maeda, Hiroshi Kanamaru, Yoshikazu Saito, Zhuohan Hu, Yuichi Sugiyama. Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, 38, 215-222.
5. Takao Watanabe, Hiroyuki Kusuhara, Tomoko Watanabe, Yasuyuki Debori, Kazuya Maeda, Tsunenori Kondo, Hideki Nakayama, Shigeru Horita, Brian W. Ogilvie, Andrew Parkinson, Zhuohan Hu, Yuichi Sugiyama. Prediction of the overall renal tubular secretion and hepatic clearance of anionic drugs and a renal drug-drug interaction involving organic anion transporter 3 in humans by in vitro uptake experiments. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 1031-1038.
6. Megumi Iwai, Hiroshi Suzuki, Ichiro Ieiri, Kenji Otsubo, Yuichi Sugiyama. Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics* **2004**, 14, 749-757.
7. M.K. Pasanen, H. Fredrikson, P.J. Neuvonen, M. Niemi. Different effects of *SLCO1B1* polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, 82, 726–733.
8. Ji-Youn Han, Hyeong-Seok Lim, Eun Soon Shin, Yeon-Kyeong Yoo, Yong Hoon Park, Jong-Eun Lee, Heung Tae Kim, Jin Soo Lee. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* **2008**, 59, 69–75.
9. The SEARCH Collaborative Group, E. Link, S. Parish, J. Armitage, L. Bowman, S. Heath, F. Matsuda, I. Gut, M. Lathrop, R. Collins. *SLCO1B1* variants and statin-induced myopathy —A genome-wide study. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 359, 789-799.
10. Mikko Niemi, Marja K. Pasanen, Pertti J. Neuvonen. *SLCO1B1* polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, 80, 356-366.

11. Zhang Huanian, He Xuelian, Li Jianxin, Wang Yang, Wang Cheng, Chen Yujun, Niu Changhe, Gao Ping. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **2014**, 52, 770-776.
12. Annikka Kalliokoski, Mikko Neuvonen, Pertti J. Neuvonen, Mikko Niemi. The effect of *SLCO1B1* polymorphism on repaglinide pharmacokinetics persists over a wide dose range. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 66, 818-825.
13. Wei Zhang, Yi-Jing He, Chun-Ting Han, Zhao-Qian Liu, Qing Li, Lan Fan, Zhi-Rong Tan, Wei-Xia Zhang, Bang-Ning Yu, Dan Wang, Dong-Li Hu, Hong-Hao Zhou. Effect of *SLCO1B1* genetic polymorphism on the pharmacokinetics of nateglinide. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2006**, 62, 567-572.
14. Mikko Niemi, Kari T. Kivistö, Ute Hofmann, Matthias Schwab, Michel Eichelbaum, Martin F. Fromm. Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the *SLCO1B1* gene (encoding OATP1B1). *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2005**, 59, 602-604.
15. Ken-ichi Fujita, Yu Sunakawa, Keisuke Miwa, Yuko Akiyama, Minako Sugiyama, Kaori Kawara, Hiroo Ishida, Keishi Yamashita, Keiko Mizuno, Shigehira Saji, Wataru Ichikawa, Wataru Yamamoto, Fumio Nagashima, Toshimichi Miya, Masaru Narabayashi, Yuichi Ando, Takashi Hirose, Yasutsuna Sasaki. Delayed elimination of SN-38 in cancer patients with severe renal failure. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 161-164.
16. Food and Drug Administration Home Page.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/21-366_Crestor_BioPharmr.pdf (Accessed Dec 22, 2017).
17. Thomas C. Marbury, Jon L. Ruckle, Vibeke Hatorp, Michael P. Andersen, Karin Kramer Nielsen, Won Chin Huang, Poul Strange. Pharmacokinetics of repaglinide in subjects with renal impairment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 67, 7-15.
18. Ken-ichi Fujita, Tomoko Sugiura, Hidenori Okumura, Saki Umeda, Noritaka Nakamichi, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato. Direct inhibition and down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38, an active metabolite of irinotecan, in humans. *Pharm. Res.* **2014**, 31, 204-215.
19. Yurie Katsube, Masayuki Tsujimoto, Hiroyoshi Koide, Megumi Ochiai, Ayako Hojyo, Kaori Ogawa, Kengo Kambara, Nao Torii, Daisuke Shima, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki, Kohshi Nishiguchi. Cooperative inhibitory effects of uremic toxins and other serum components on OATP1B1-mediated transport of SN-38. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783-789.
20. Judy A. Staffa, Jennie Chang, Lanh Green. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N. Engl. J. Med.*

- 2002, 346, 539-540.
21. Dina S.J. Alejandro, Jeffrey Petersen. Myoglobinuric acute renal failure in a cardiac transplant patient taking lovastatin and cyclosporine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1994**, 5, 153-160.
 22. Wai-Man Wong, Tony Wai-Hung Shek, Koon-Ho Chan, Elaine Chau, Kam-Chuen. Rhabdomyolysis triggered by cytomegalovirus infection in a heart transplant patient on concomitant cyclosporine and atorvastatin therapy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2004**, 19, 952-953.
 23. Yoshihisa Shitara, Tomoo Itoh, Hitoshi Sato, Albert P. Li, Yuichi Sugiyama. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 304, 610–616.
 24. Yoshihisa Shitara, Masaru Hirano, Hitoshi Sato, Yuichi 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.* **2004**, 311, 228-236.
 25. Food and Drug Administration Home Page.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/205123s001lbl.pdf. (Accessed Dec 22, 2017).
 26. Food and Drug Administration Home Page.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/205123Orig1s000ClinPharmR.pdf. (Accessed Dec 22, 2017).
 27. Sivi Ouwerkerk-Mahadevan, Jan Snoeys, Monika Peeters, Maria Beumont-Mauviel, Alexandru Simion. Drug-Drug Interactions with the NS3/4A Protease Inhibitor Simeprevir. *Clin. Pharmacokinet.* **2016**, 55, 197-208.
 28. M. Hermann, A. Åsberg, H. Christensen, H. Holdaas, A. Hartmann, J.L.E. Reubsæet. Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, 76, 388-391.
 29. 蓮沼智子, 中村正彦, 矢地孝, 有沢紀子, 福島邦昭, 飯島肇, 齋藤康. 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチン(NK-104)の薬物間相互作用 —シクロスポリンのピタバスタチン血漿中濃度に及ぼす影響—. *臨床医薬* **2003**, 19, 381-389.
 30. Mia Hedman, Pertti J. Neuvonen, Mikko Neuvonen, Christer Holmberg, Marjatta Antikainen. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin in pediatric and adolescent cardiac transplant recipients on a regimen of triple immunosuppression. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, 75, 101-109.

31. Steven G. Simonson, Ali Raza, Paul D. Martin, Patrick D. Mitchell, John A. Jarcho, Colin D. A. Brown, Amy S. Windass, Dennis, W. Schneck. Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, 76, 167-177.
32. Federico Innocenti, Samir D. Undevia, Jacqueline Ramírez, Sridhar Mani, Richard L. Schilsky, Nicholas J. Vogelzang, Marisol Prado, BA, Mark J. Ratain. A phase I trial of pharmacologic modulation of irinotecan with cyclosporine and phenobarbital. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, 76, 490-502.
33. R.I. Fox, S.L. Morgan, H.T. Smith, B.A. Robbins, M.G. Choc, J.E. Baggott. Combined oral cyclosporin and methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis elevates methotrexate levels and reduces 7-hydroxymethotrexate levels when compared with methotrexate alone. *Rheumatology (Oxford)* **2003**, 42, 989-994.
34. Lauri I. Kajosaari, Mikko Niemi, Mikko Neuvonen, Jouko Laitila, Pertti J. Neuvonen, Janne T. Backman. Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2005**, 78, 388-399.
35. Y. Akamine, M. Miura, N. Yasui-Furukori, I. Ieiri, T. Uno. Effects of multiple-dose rifampicin 450 mg on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in Japanese volunteers. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2015**, 40, 98-103.
36. 化学療法基盤支援活動 . "がん分子標的薬開発状況に関する情報":
<<https://scads.jfcr.or.jp/db/table.html>> (Accessed July 19, 2017).
37. K. Mross, S. Steinbild, F. Baas, D. Gmehling, M. Radtke, D. Voliotis, E. Brendel, O. Christensen, C. Unger. Results from an *in vitro* and a clinical/pharmacological phase I study with the combination irinotecan and sorafenib. *Eur. J. cancer*, **2007**, 43, 55–63.
38. B. Schultheis, G. Folprecht, J. Kuhlmann, R. Ehrenberg, U.T. Hacker, C.H. Köhne, M. Kornacker, O. Boix, J. Lettieri, J. Krauss, R. Fischer, S. Hamann, D. Strumberg, K.B. Mross. Regorafenib in combination with FOLFOX or FOLFIRI as first- or second-line treatment of colorectal cancer: results of a multicenter, phase Ib study. *Ann. Oncol.* **2013**, 24, 1560–1567.
39. Takashi Nozawa, Hironobu Minami, Shigeki Sugiura, Akira Tsuji, Ikumi Tamai. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, 33, 434–439.
40. Anne-Joy M. de Graan, Cynthia S. Lancaster, Amanda Obaidat, Bruno Hagenbuch, Laure Elens, Lena E.

- Friberg, Peter de Bruijn, Shuiying Hu, Alice A. Gibson, Gitte H. Bruun, Thomas J. Corydon, Torben S. Mikkelsen, Aisha L. Walker, Guoqing Du, Walter J. Loos, Ron H. N. van Schaik, Sharyn D. Baker, Ron H. J. Mathijssen, Alex Sparreboom. Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 4433-4440.
41. Jaafar Bennouna, Marion Deslandres, Helene Senellart, Cecile de Labareyre, Rodrigo Ruiz-Soto, Claire Wixon, Jeff Botbyl, A. Benjamin Suttle, Jean-Pierre Delord. A phase I open-label study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of pazopanib in combination with irinotecan and cetuximab for relapsed or refractory metastatic colorectal cancer. *Invest. New Drugs* **2015**, 33, 138-147.
 42. Patricia LoRusso, Anthony F. Shields, Shirish Gadgeel, Ulka Vaishampayan, Tina Guthrie, Thomas Puchalski, John Xu, Qi Liu. Cediranib in combination with various anticancer regimens: results of a phase I multi-cohort study. *Invest. New Drugs* **2011**, 29, 1395-1405.
 43. L.P. Martin, M.F. Kozloff, R.S. Herbst, T.A. Samuel, S. Kim, B. Rosbrook, M. Tortorici, Y. Chen, J. Tarazi, A.J. Olszanski, T. Rado, A. Starr, R.B. Cohen. Phase I study of axitinib combined with paclitaxel, docetaxel or capecitabine in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **2012**, 107, 1268-1276.
 44. P. Hamberg, R.H.J. Mathijssen, P. de Bruijn, C. Leonowens, D. van der Biessen, F.A.L.M. Eskens, S. Sleijfer, J. Verweij, M.J.A. de Jonge. Impact of pazopanib on docetaxel exposure: results of a phase I combination study with two different docetaxel schedules. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, 75, 365-371.
 45. Ahmad Awada, Alain Hendlisz, Olaf Christensen, Chetan D. Lathia, Sylvie Bartholomeus, Fabienne Lebrun, Dominique de Valeriola, Erich Brendel, Martin Radtke, Thierry Delaunoy, Martine Piccart-Gebhart, Thierry Gil. Phase I trial to investigate the safety, pharmacokinetics and efficacy of sorafenib combined with docetaxel in patients with advanced refractory solid tumours. *Eur. J. Cancer* **2012**, 48, 465-474.
 46. A.H. Awada, H. Dumez, A. Hendlisz, P. Wolter, T. Besse-Hammer, M. Uttenreuther-Fischer, P. Stopfer, F. Fleischer, M. Piccart, P. Schöffski. Phase I study of pulsatile 3-day administration of afatinib (BIBW 2992) in combination with docetaxel in advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **2013**, 31, 734-741.
 47. G. Bousquet, J. Alexandre, C. Le Tourneau, F. Goldwasser, S. Faivre, H. de Mont-Serrat, R. Kaiser, J.L. Misset, E. Raymond. Phase I study of BIBF 1120 with docetaxel and prednisone in metastatic chemo-naive hormone-refractory prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* **2011**, 105, 1640-1645.
 48. Toshihiro Sato, Hajime Ito, Ayaka Hirata, Takaaki Abe, Nariyasu Mano, Hiroaki Yamaguchi. Interactions of crizotinib and gefitinib with organic anion-transporting polypeptides (OATP)1B1, OATP1B3 and OATP2B1: gefitinib shows contradictory interaction with OATP1B3. *Xenobiotica* **2018**, 48, 73-78.

49. Varun Khurana, Mukul Minocha, Dhananjay Pal, Ashim K. Mitra. Inhibition of OATP-1B1 and OATP-1B3 by tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol. Drug interact.* **2014**, 29, 249–259.
50. S. Hu, R.H. Mathijssen, P. de Bruijn, S.D. Baker, A. Sparreboom. Inhibition of OATP1B1 by tyrosine kinase inhibitors: *in vitro-in vivo* correlations. *Br. J. cancer* **2014**, 110, 894–898.
51. Varun Khurana, Mukul Minocha, Dhananjay Pal, Ashim K. Mitra. Role of OATP-1B1 and/or OATP-1B3 in hepatic disposition of tyrosine kinase inhibitors. *Drug Metabol. Drug Interact.* **2014**, 29, 179-190.
52. Eric I. Zimmerman, Shuiying Hu, Justin L. Roberts, Alice A. Gibson, Shelley J. Orwick, Lie Li, Alex Sparreboom, Sharyn D. Baker. Contribution of OATP1B1 and OATP1B3 to the Disposition of Sorafenib and Sorafenib-Glucuronide. *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 1458-1466.
53. Hiroki Ohya, Yoshihiko Shibayama, Jiro Ogura, Katsuya Narumi, Masaki Kobayashi, Ken Iseki. Regorafenib is transported by the organic anion transporter 1B1 and the multidrug resistance protein 2. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, 38, 582–586.
54. Rosie A. Johnston, Tristan Rawling, Ting Chan, Fanfan Zhou, Michael Murray. Selective inhibition of human solute carrier transporters by multikinase inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, 42, 1851–1857.
55. Ikumi Tamai, Takashi Nozawa, Minako Koshida, Jun-ichi Nezu, Yoshimichi Sai, Akira Tsuji. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm. Res.* **2001**, 18, 1262–1269.
56. Johannes Noé, Renée Portmann, Marie-Elise Brun, Christoph 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.* **2007**, 35, 1308–1314.
57. Saki Izumi, Yoshitane Nozaki, Takafumi Komori, Kazuya Maeda, Osamu Takenaka, Kazutomi Kusano, Tsutomu Yoshimura, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi 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.* **2013**, 41, 1859–1866.
58. Yunhai Cui, Jörg König, Ulrike Buchholz, Herbert Spring, Inka Leier, Dietrich Keppler. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 55, 929–937.
59. Kazuya Maeda, Ichiro Ieiri, Kuninobu Yasuda, Akiharu Fujino, Hiroaki Fujiwara, Kenji Otsubo, Masaru Hirano, Takao Watanabe, Yoshiaki Kitamura, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama. Effects of organic anion

- transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, 79, 427–439.
60. Saki Izumi, Yoshitane Nozaki, Takafumi Komori, Osamu Takenaka, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama. Investigation of fluorescein derivatives as substrates of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 to develop sensitive fluorescence-based OATP1B1 inhibition assays. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 438–448.
 61. Maribel Reyes, Leslie Z. Benet. Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100, 3831–3842.
 62. Miriam F. Ayad, N. Magdy. Application of new spectrofluorometric techniques for determination of atorvastatin and ezetimibe in combined tablet dosage form. *Chem. Pharm. Bull.* **2015**, 63, 443–449.
 63. E. Cagigal, L.González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez. pK(a) determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 26, 477–486.
 64. R. Nageswara Rao, Sravan Bompelli, Pawan K. Maurya. High-performance liquid chromatographic determination of anti-hypertensive drugs on dried blood spots using a fluorescence detector—method development and validation. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, 25, 1252–1259.
 65. Noriko Daneshtalab, Richard Z. Lewanczuk, Fakhreddin Jamali. High-performance liquid chromatographic analysis of angiotensin II receptor antagonist valsartan using a liquid extraction method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2002**, 766, 345–349.
 66. Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, Rose J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265–275.
 67. Kristina Hacker, Renke Maas, Johannes Kornhuber, Martin F. Fromm, Oliver Zolk. Substrate-Dependent Inhibition of the Human Organic Cation Transporter OCT2: A Comparison of Metformin with Experimental Substrates. *PLoS One* **2015**, 10, e0136451. doi: 10.1371/journal.pone.0136451.
 68. Saki Izumi, Yoshitane Nozaki, Kazuya Maeda, Takafumi Komori, Osamu Takenaka, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi 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.* **2015**, 43, 235–247.
 69. Juergen Kindla, Fabian Müller, Maren Mieth, Martin F. Fromm, Jörg König. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 1047–1053.

70. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Home Page. <https://www.pmda.go.jp/files/000210320.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
71. Food and Drug Administration Home Page. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/205755Orig1s000ClinPharmR.pdf. (Accessed July 19, 2017).
72. Food and Drug Administration Home Page. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/205832Orig1s000ClinPharmR.pdf. (Accessed July 19, 2017).
73. Xiaodong Wang, Allan W. Wolkoff, Marilyn E. Morris. Flavonoids as a novel class of human organic anion-transporting polypeptide OATP1B1 (OATP-C) modulators. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, 33, 1666–1672.
74. Venkata V.V.R. Marada, Saskia Flörl, Annett Kühne, Gerhard Burckhardt, Yohannes Hagos. Interaction of human organic anion transporter polypeptides 1B1 and 1B3 with antineoplastic compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 92, 723–731.
75. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Home Page. <https://www.pmda.go.jp/files/000153553.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
76. Izabel Patik, Daniella Kovacsics, Orsolya Német, Melinda Gera, György Várady, Bruno Stieger, Bruno Hagenbuch, Gergely Szakács, Csilla Özvegy-Laczka. Functional expression of the 11 human organic anion transporting polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, 98, 649–658.
77. Steven Lacy, Bih Hsu, Dale Miles, Dana Aftab, Ronghua Wang, Linh Nguyen. Metabolism and disposition of cabozantinib in healthy male volunteers and pharmacologic characterization of its major metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, 43, 1190–1207.
78. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Home Page. <https://www.pmda.go.jp/files/000153351.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
79. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Home Page. <https://www.pmda.go.jp/files/000210264.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
80. Yoshihisa Shitara, Kumiko Takeuchi, Yoshiko Nagamatsu, Satomi Wada, Yuichi Sugiyama, Toshiharu Horie. Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2012**, 27, 368-378.

81. Yoshihisa Shitara, Kumiko Takeuchi, Toshiharu Horie. Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on OATP1B1-mediated uptake. *J. Pharm. Sci.* **2013**, 102, 3427-3435.
82. Hironobu Minami, Kimie Sai, Mayumi Saeki, Yoshiro Saito, Shogo Ozawa, Kazuhiro Suzuki, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Tetsuya Hamaguchi, Noboru Yamamoto, Kuniaki Shirao, Yasuhide Yamada, Hironobu Ohmatsu, Kaoru Kubota, Teruhiko Yoshida, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and *UGT1A* genetic polymorphisms in Japanese: roles of *UGT1A1**6 and *28. *Pharmacogenet. Genomics* **2007**, 17, 497-504.
83. John O. Miners, Nuy Chau, Andrew Rowland, Kushari Burns, Ross A. McKinnon, Peter I. Mackenzie, Geoffrey T. Tucker, Kathleen M. Knights, Ganessan Kichenadasse. Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes by lapatinib, pazopanib, regorafenib and sorafenib: Implications for hyperbilirubinemia. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, 129, 85-95.
84. ネクサバル®インタビューフォーム (改訂第 16 版), バイエル薬品株式会社, 2016
85. Anne-Charlotte Dubbelman, Hilde Rosing, Cynthia Nijenhuis, Alwin D. R. Huitema, Marja Mergui-Roelvink, Anubha Gupta, David Verbel, Gary Thompson, Robert Shumaker, Jan H. M. Schellens, Jos H. Beijnen. Pharmacokinetics and excretion of ¹⁴C-lenvatinib in patients with advanced solid tumors or lymphomas. *Invest. New Drugs* **2015**, 33, 233-240.
86. Robert C. Shumaker, Jagadeesh Aluri, Jean Fan, Gresel Martinez, Gary A. Thompson, Min Ren. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of lenvatinib in healthy adults. *Clin. Drug Investig.* **2014**, 34, 651-659.
87. Food and Drug Administration—Center for Drug Evaluation and Research Home Page. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm292362.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
88. European Medicines Agency Home Page. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf. (Accessed July 19, 2017)
89. Ministry of Health, Labor and Welfare Home Page. [https://www.solvobiotech.com/documents/Japanese_DDI_guideline_\(draft\)_2014Jan.pdf](https://www.solvobiotech.com/documents/Japanese_DDI_guideline_(draft)_2014Jan.pdf). (Accessed July 19, 2017).
90. Rommel G. Tirona, Brenda F. Leake, Allan W. Wolkoff, Richard B. Kim. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 304, 223-228.
91. Stephan R. Vavricka, Jessica Van Montfoort, Huy Riem Ha, Peter J. Meier, Karin Fatinge. Interactions of

- rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* **2002**, 36, 164-172.
92. Y. Prashanthi, Mohammed Asif Ahmed, K. Vijaya, Riyazuddin. Method development and validation of lenvatinib drug by RP-HPLC in pharmaceutical drug dosage form. *Indo American journal of pharmaceutical sciences* [online] **2016**, 3, 1078–1085. <http://oaji.net/articles/2016/1210-1477828898.pdf>. (Accessed 19 July 2017).
93. G.S. Talele, P.K. Porwal. Development of validated bioanalytical HPLC-UV method for simultaneous estimation of amlodipine and atorvastatin in rat plasma. *Indian J. Pharm. Sci.* **2015**, 77, 742–750.
94. Kiyoshi Yamaoka, Yusuke Tanigawara, Terumichi Nakagawa, Toyozo Uno. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **1981**, 4, 879-885.
95. Yaofeng Cheng, Li Ma, Shu-Ying Chang, W. Griffith Humphreys, Wenying Li. Application of static models to predict midazolam clinical interactions in the presence of single or multiple hepatitis C virus drugs. *Drug Metab. Dispos.* **2016**, 44, 1372–1380.
96. Kiyoshi Yamaoka, Terumichi Nakagawa, Toyozo Uno. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1978**, 6, 165–175.
97. Rune Amundsen, Hege Christensen, Behnaz Zabihyan, Anders Asberg. Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, 38, 1499–1504.
98. K. Ito, T. Iwatsubo, S. Kanamitsu, K. Ueda, H. Suzuki, Y. Sugiyama. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* **1998**, 50, 387–412.
99. Jayabharathi Vaidyanathan, Kenta Yoshida, Vikram Arya, Lei Zhang. Comparing various in vitro prediction criteria to assess the potential of a new molecular entity to inhibit organic anion transporting polypeptide 1B1. *J. Clin. Pharmacol.* **2016**, 56, S59-S72.
100. Pharmaceutical and Medical Devices Agency Home Page. <https://www.pmda.go.jp/files/000214531.pdf>. (Accessed July 19, 2017).
101. Yi M. Weaver, Bruno Hagenbuch. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates. *J. Membr. Biol.* **2010**, 236, 279–290.
102. Shuichi Ohnishi, Amanda Hays, Bruno Hagenbuch. Cysteine scanning mutagenesis of transmembrane domain 10 in organic anion transporting polypeptide 1B1. *Biochemistry* **2014**, 53, 2261-2270.

103. Weifang Hong, Zhixuan Wu, Zihui Fang, Jiujiu Huang, Hong Huang, Mei Hong. Amino Acid Residues in the Putative Transmembrane Domain 11 of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Dictate Transporter Substrate Binding, Stability, and Trafficking. *Mol. Pharm.* **2015**, 12, 4270-4276.
104. Moritz Gruetz, Heinrich Sticht, Hartmut Glaeser, Martin F. Fromma, Jörg König. Analysis of amino acid residues in the predicted transmembrane pore influencing transport kinetics of the hepatic drug transporter organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1). *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, 1858, 2894-2902.