

博士学位論文

サルを用いた

肝有機アニオン輸送ポリペプチド 1B

を介する薬物動態学的相互作用の

評価法に関する研究

令和元年度

高橋 剛視

## 目次

序論 .....	1
第 I 章 サル肝細胞および組換えタンパク質発現細胞を用いたサル OATP1B の機能評価 4	
第 1 節 緒言 .....	4
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	6
I-2-i 実験材料および試薬 .....	6
I-2-ii mRNA の定量 .....	6
I-2-iii 変異解析 .....	7
I-2-iv 発現コンストラクトの調製 .....	9
I-2-v 組換えサル OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, および遺伝子多型を有する OATP1B1 の発現細胞を用いた取り込み実験 .....	12
I-2-vi サルおよびヒト凍結肝細胞を用いた取り込み実験 .....	14
I-2-vii データ解析 .....	14
I-2-viii 統計学的解析 .....	16
第 3 節 結果 .....	16
I-3-i 肝臓におけるサル OATP mRNA の発現 .....	16
I-3-ii 組換えサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の基質認識性 .....	17
I-3-iii 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞への <sup>[3H]</sup> ピタバスタチンの取り込み .....	20
I-3-iv サルおよびヒト凍結肝細胞への <sup>[3H]</sup> ピタバスタチンの取り込み .....	22
I-3-v 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な <sup>[3H]</sup> ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A のプレインキュベーション時間の影響 .....	24
I-3-vi 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な <sup>[3H]</sup> ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A およびリファンピシンの影響, およびそのプレインキュベーション効果 .....	25
I-3-vii サル OATP1B1 の遺伝子多型の種類および頻度 .....	28
I-3-viii サル OATP1B1 の遺伝子多型の機能解析 .....	29
第 4 節 考察 .....	31
第 5 節 小括 .....	38
第 II 章 サル個体を用いた <i>in vivo</i> 肝 OATP1B を介する薬物相互作用試験 .....	39
第 1 節 緒言 .....	39
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	41
II-2-i 試薬 .....	41
II-2-ii 動物 .....	41
II-2-iii 動物実験 .....	41

II-2-iv	分析法	42
II-2-v	データ解析	43
II-2-vi	静的モデルによる薬物動態学的相互作用の評価	45
II-2-vii	OATP1B1 阻害率の時間推移	46
II-2-viii	統計学的解析	47
第3節	結果	47
II-3-i	サルにおけるピタバスタチンの薬物動態	47
II-3-ii	サルにおけるピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A とリファンピシンの影響	49
II-3-iii	サルにおけるシクロスポリン A の薬物動態	51
II-3-iv	静的モデルによる薬物動態学的相互作用の評価	52
II-3-v	OATP1B1 阻害率の時間推移	53
第4節	考察	54
第5節	小括	61
総括		62
本論文内容の誌上発表		65
謝辞		66
参考文献		67

略号

$AUC$	area under the drug concentration <i>versus</i> time curve
BCRP	breast cancer resistance protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
$C_{max}$	the maximum concentration of the drug
$CL_{total}$	total clearance
$C_{u, inlet}$	unbound concentration at the inlet to the liver
CYP	individual form of cytochrome P450
DNA	deoxyribonucleic acid
$E_H$	hepatic extraction ratio
$F$	bioavailability
$F_A$	fraction absorbed
$f_e$	urinary excretion rate
$F_G$	fraction escaping gut clearance
$F_H$	fraction escaping hepatic clearance
$f_{uB}$	fraction unbound in blood
$IC_{50}$	half maximal inhibitory concentration
$I_0$	maximum remaining ratio
$I_{max}$	maximum inhibitory effect, or maximum inhibitor concentration in circulating blood
$I_{u, inlet, max}$	maximum unbound inhibitor concentration at the inlet to the liver
i.v.	intravenous
$k_a$	absorption rate constant
$k_{el}$	elimination rate constant
$K_i$	inhibition constant

$K_m$	Michaelis constant
LC	liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
M	mol/L
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRP	multidrug resistance-associated protein
<i>MRT</i>	mean residence time
OATP	organic anion transporting polypeptide
P450	general term for cytochrome P450 (EC.1.14.14.1)
PCR	polymerase chain reaction
$P_{dif}$	passive diffusion coefficient
P-gp	p-glycoprotein
p.o.	oral
pH	power of hydrogen
$Q_H$	hepatic blood flow rate
$R_B$	blood-to-plasma partition ratio
RI	radioisotope
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	standard deviation
SE	standard error
$t_{1/2}$	elimination half life
$T_{max}$	time to peak concentration
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase
$v$	velocity

$V$	volume of distribution
$V_{\max}$	maximum velocity
$V_{ss}$	volume of distribution at steady state

## 序論

安全性の高い医薬品の創製は最重要の課題である。安全性を損なう要因として医薬品を併用することによって生じる薬物相互作用がある。医薬品は患者に単独で使用されるよりも他の医薬品と併用されることが多いため、新規医薬品開発においては相互作用リスクの低い化合物の選抜が望まれる。薬物相互作用は薬力学的相互作用と薬物動態学的相互作用に大別される。薬力学的相互作用は併用薬が同じ薬理効果、もしくは反対の効果を示す場合に効果が増強もしくは減弱する作用である。薬物動態学的相互作用は併用薬が体内動態（吸収・分布・代謝・排泄）の機序に作用し、被相互作用薬の血漿中濃度もしくは臓器中濃度が変化する作用であり、本相互作用によって薬理効果の増強や減弱、もしくは副作用等の有害事象を引き起こす場合がある。薬物の体内動態に関連する機能タンパクの中には活性変化をもたらす遺伝子多型が存在し、患者の遺伝的要因が薬物相互作用を増強する可能性があるため注意が必要である。

薬物の体内動態には種々の輸送体（トランスポーター）がその生体膜透過過程に関与している。これらの薬物トランスポーターの阻害によって引き起こされる薬物動態学的相互作用は、薬物代謝酵素の阻害によって引き起こされる場合と同様に、併用薬の血漿中濃度もしくは臓器中濃度を変化させ有害事象を引き起こす危険性がある。近年、ヒトにおける薬物トランスポーターの阻害に起因する薬物動態学的相互作用の報告が相次いでおり、大きな注目を集めている (Gessner et al., 2019; Giacomini et al., 2010; Mizuno et al., 2003)。特に、肝臓に主に発現する有機アニオン輸送ポリペプチド (organic anion transporting polypeptide, 以下 OATP と記す) 1B 分子は相互作用によってその基質となる薬物の体内動態が大きく変化する事例が報告されており、注意が必要である (Kalliokoski and Niemi, 2009; Maeda, 2015)。ヒト肝臓に最も多く発現する OATP1B は OATP1B1 であり、次いで OATP1B3 である (Hirano et al., 2004)。OATP1B1 および OATP1B3 は肝細胞の類洞膜に発現し、これらの基質薬物の血漿中から肝細胞中への取り込みに重要な役割を果たす (Giacomini et al., 2010)。OATP1B の基質になるスタチン系のコレステロール合成阻害薬に、OATP1B の阻害

薬であるシクロスポリン A やリファンピシンを併用すると、スタチン系のコレステロール合成阻害薬の血漿中濃度が上昇する (Mück et al., 1999; Maeda, 2015). *OATP1B1* には機能不全を伴う遺伝子多型が報告されており (Niemi et al., 2011), このような遺伝子多型を有する患者に相互作用が加わると、循環血中に極めて高濃度となったスタチン系薬物は、時に致死性の横紋筋融解症を発症させると推察される. 近年, スタチン系薬物の他にも *OATP1B* の基質となる医薬品が報告されはじめており (Kalliokoski and Niemi, 2009), 新規医薬品の開発においては *OATP1B* の阻害リスクを評価する必要がある旨, 厚生労働省が 2018 年 7 月に発信した「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」(<https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T180724I0150.pdf>, 以下薬物相互作用ガイドラインと記す) に記載されている. 米国および欧州においてもそれぞれ同様のガイダンス案およびガイドラインがそれぞれ 2017 年 10 月および 2012 年 6 月に発信されている (<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM581965.pdf>, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf)).

これまで, *OATP1B* 阻害リスクの評価方法はヒト由来肝細胞や組換え *OATP1B* 発現細胞を用いた *in vitro* 試験とその結果から阻害ポテンシャルを評価する方法が報告されており, 日米欧の薬物相互作用ガイドライン/ガイダンス案に記載されている. しかしながら, 既報は阻害ポテンシャルの評価に留まり, 被相互作用薬の血漿中濃度が定量的にどの程度上昇するかは予測できない. すなわち, 現状では医薬候補品を非臨床段階で選抜および評価する際に *OATP1B* 阻害作用のリスクについて精度の高い定量的な予測情報を得ることは困難である. このように非臨床段階でリスクの定量的な判断ができず, 臨床試験で重大な相互作用を引き起こすリスクが明らかになると開発を中止せざるを得ない場合があり, 大きな投資の損失につながる. さらに, 非臨床段階でリスクを過大評価して臨床開発ステージへの移行を断念することは有用な新規医薬品の上市機会を失うこと, あるいは遅延に繋がりが患者の不利益になるため, 非臨床段階での確度の高い定量的な評価系の構築が望まれ



る。

カニクイザル (*Macaca fascicularis*, サル) はマウス, ラット, およびイヌと共に非臨床段階の新規医薬品開発で薬物動態試験および安全性試験に広く使用されている。実験動物を使用する利点は, *in vivo* 試験が可能であり医薬候補品の血漿中濃度が経時的に変化したときの薬物相互作用を評価でき, *in vitro* 試験との比較検証ができる点である。特にサルはマウス, ラット, およびイヌと比較して進化的にヒトに近く, 解剖学的, 生理学的にヒトとの類似性が高いことから, *in vivo* でヒトの薬物代謝酵素を介した薬物相互作用を再現した例が報告されている (Ogasawara et al., 2009; Ohtsuka et al., 2010)。さらに, サルはヒト OATP1B を介した薬物相互作用を予測評価するモデルとして注目されている (Shen et al., 2015; Watanabe et al., 2015)。このような状況下, サルを用いたヒト肝臓の OATP1B を介した薬物相互作用の定量的な評価方法は未だ確立していない。

そこで, 本研究ではサルを用い, 遺伝的多型性を示す OATP1B を介した医薬候補品の相互作用の *in vitro* および *in vivo* を統合する定量的評価系を構築することを目的とした。第 I 章では, サル肝細胞および組換えタンパク質発現細胞を用いたサル OATP1B の機能評価を行い, サルとヒトの類似性, およびピタバスタチンをプローブ基質に用いることの有用性を明らかにした。さらに, サル OATP1B1 の遺伝子多型を同定し機能変化を伴う遺伝子多型が存在するかを明らかにし, サル *in vivo* 薬物相互作用試験の実施にあたりサル個体の OATP1B1 遺伝子多型を予め判定する必要性の有無を明らかにした。第 II 章では, サルを用い, ピタバスタチンの静脈内投与と経口投与を組み合わせる阻害薬の併用効果を検討することにより, ヒト肝の OATP1B 阻害リスクを予め非臨床段階で定量的に評価しうることを明らかにした。以上, 非臨床段階の *in vitro* 評価にて, 評価対象医薬開発候補品の潜在的なヒトあるいはサル OATP1B 阻害ポテンシャルが予想された場合, その程度に応じてサルを用いた *in vivo* 薬物相互作用試験の適用が, 創薬効率化推進に有用であるとの新知見を得たので以下に詳述する。

## 第 I 章 サル肝細胞および組換えタンパク質発現細胞を用いたサル OATP1B の機能評価

### 第 1 節 緒言

サルはマウス、ラット、およびイヌと並んで医薬品開発に汎用される動物種である。サルはヒトと同様に 2 つの OATP1B ファミリーである OATP1B1 および OATP1B3 を有し、ヒトとのアミノ酸配列相同性はそれぞれ 92% および 94% と高いことが報告されている (Shen et al., 2013)。一方で、マウス、ラット、およびイヌは OATP1B ファミリーとして一つの分子のみを有しており、それぞれ Oatp1b2 (マウスとラット) および Oatp1b4 であり、ヒト OATP1B1 とのアミノ酸配列相同性はそれぞれ 65%, 64%, および 69% である (Gui and Hagenbuch, 2010; Hagenbuch and Meier, 2004)。したがって、サルを使用して OATP1B の評価系を構築することは、他の動物種の使用に比べ、基質特異性や阻害プロファイルがヒトと類似していることが期待できる。サルおよびヒト肝細胞の類洞膜に存在する OATP ファミリーとして OATP2B1 も知られており、基質認識性が共通している薬物がある (Hirano et al., 2006; Tamai et al., 2001)。ヒトの肝臓においては、これら 3 つの分子種の中で OATP1B1 の発現量が最も多く、次いで OATP1B3, OATP2B1 の順であることが報告されており、いずれの OATP 基質にもなるピタバスタチンについて各 OATP の発現量を加味して肝臓における基質輸送の寄与率が考察されている (Hirano et al., 2004; 2006)。一方、サル肝臓における OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の発現量に関する情報は限られている。ヒト OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の基質情報は多く報告されているが、各サル OATP の基質情報はピタバスタチンを含めて限られている。サル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の肝臓での発現量比、および基質認識性を検討しそれらのヒトとの類似性を考察することにより、肝臓における基質輸送の寄与率を考慮した、本研究で用いる適切なプローブ基質を選択することが可能となる。

近年、*in vitro* での OATP1B 阻害試験系において、基質薬を加える前の一定時間、阻害薬であるシクロスポリン A や一部の抗ウイルス薬を前添加（プレインキュベーション）することにより、ヒト OATP1B の阻害強度が阻害薬のプレインキュベーション時間依存的に増加することが報告された (Amundsen et al., 2010; Shitara et al., 2013; Shitara et al., 2012). 同様の作用を示す OATP1B 阻害薬は少なく、この作用機序の詳細は不明であるが、臨床における重大な薬物相互作用事例の発生と関連する可能性が示唆されている。

薬物代謝酵素の一つである CYP2C9 および CYP2C19 はヒトにおいてその遺伝子多型が個体間変動の主要な原因の一つになることが知られている (家入, 2014). サルにおいても遺伝子多型により基質薬の代謝活性に個体差があることが報告されており (Uno et al., 2015; Uno et al., 2014), *in vivo* で CYP2C19 の基質薬の体内動態が大きく影響を受ける. このため、サル CYP2C19 基質薬のサル *in vivo* 試験の前には、必要に応じて CYP2C19 の遺伝子型を判定することが推奨されている (Utoh et al., 2015). 一方、OATP1B1 の遺伝子多型は、ヒトにおいてスタチン系薬物等の OATP1B1 基質薬の血漿中濃度に対する個体間変動因子の 1 つであることが報告されているが (Niemi et al., 2011), サルにおける研究報告は無い。

以上のことから本章ではサル肝臓における OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の mRNA を定量し、これらの発現量比を明らかにした. サル組換え OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 遺伝子を発現する細胞系を作製し、日米の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案に示された 4 つの典型的基質を含む 11 のヒト OATP1B 基質薬の基質認識性を調べ、その類似性を明らかにした. 次に、サルおよびヒト由来肝細胞を用い、両動物種における OATP1B の良好な基質であることが示唆されたピタバスタチンの能動的な取り込みと、典型的 OATP 阻害薬であるシクロスポリン A およびリファンピシンの作用をプレインキュベーション効果を含めて調べ、サルにおける *in vivo* OATP1B プローブ基質としてピタバスタチンが有用であるかを明らかにした. 加えてカニクイザル 64 匹およびアカゲザル 32 匹を用いて OATP1B1 の遺伝子多型を調査した. 見出した非同義遺伝子変異の組

換えタンパク質発現細胞を作成してその機能変化を検討し、サル個体を用いた *in vivo* 薬物相互作用試験を実施するにあたり、*OATP1B1* 遺伝子多型を予め判定する必要があるかを明らかにした。

## 第2節 実験材料および実験方法

### I-2-i 実験材料および試薬

ピタバスタチンは田辺三菱製薬にて合成した。[<sup>3</sup>H]ピタバスタチン (5 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) から入手した。プラバスタチン、ロスバスタチン、テルミサルタン、アトルバスタチン、ボセンタン、エトボシド、フェキソフェナジン、フルバスタチン、グリベンクラミド、シメプレビルは富士フイルム和光純薬, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada), 東京化成, およびフナコシのいずれかから入手した。シクロスポリン A およびリファンピシンはそれぞれ富士フイルム和光純薬および Sigma-Aldrich から入手した。オリゴヌクレオチドはグライナー・ジャパンにて委託合成した。ヒト (1 ドナー) およびカニクイザル (3 動物個体のプール) 由来の凍結保存肝細胞は Sekisui XenoTech (Lenexa, KS)から入手した。その他の試薬は市販品の分析グレードのものを使用した。

### I-2-ii mRNA の定量

サル *OATP1B1*, *OATP1B3*, および *OATP2B1* mRNA の発現量は、肝臓から抽出した total RNA を用いて既報に従いリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (real-time RT-PCR) により測定した (Uno et al., 2006)。逆転写反応は 1  $\mu$ g の total RNA, オリゴ (dT), および SuperScript III RT 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を含む混合溶液中で 50 °C, 1 時間行い, その 25 分の 1 をその後の PCR に使用した。PCR は SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用い, ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)

でメーカーのプロトコールに従って実施した。プライマーの配列は次に示した。OATP1B1 は 5'-CAATCATGGACCAAAATAAACATTTGGA-3' および 5'-TTTCTCCCCTTAATAATGTGTTTCACTATCTG-3' , OATP1B3 は 5'-CAGCAATTA AAAACGTTTCACATGGTATCTGTAG-3' および 5'-GTTAGTTGGCAGCAGCATTGTCTTG-3' , OATP2B1 は 5'-GTCTGGAGCTCCCACCATTATTGC-3' および 5'-GTGGAGGAGCCAGAATGGAACACA-3'。相対的発現量を決定するため、18S リボソーム RNA 量でノーマライズした。

### I-2-iii 変異解析

ゲノム DNA は Puregene DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、メーカーの示す方法に従いカニクイザル 64 頭 (インドシナ産 32 頭およびインドネシア産 32 頭, 4~5 歳, 体重 3~5 kg) およびアカゲザル 32 頭 (中国産, 7 歳, 体重 3~5 kg) の血液から調製した。これらのゲノム試料を用いて OATP1B1 の遺伝子名である *SLCO1B1* のエクソン 2~15 についてダイレクトシーケンスを実施した。PCR は各反応液 20  $\mu$ L 中にゲノム DNA 1 ng, フォワードおよびリバースプライマー 5 pmol, および ExTaq HS ポリメラーゼ (タカラ) 1 単位を含有した。増幅は次のサーマルサイクラー条件下で行った。初期変性 95  $^{\circ}$ C, 2 分; 変性 95  $^{\circ}$ C, 20 秒, アニーリング 58  $^{\circ}$ C, 30 秒, 伸長 72  $^{\circ}$ C, 30-60 秒を 35 サイクル; さらに最終伸長 72  $^{\circ}$ C, 10 分。エクソン 6~7 については 60  $^{\circ}$ C でアニーリングを実施し、シーケンスは ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて実施した。配列データは、DNASIS Pro (日立ソフトウェア) および Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) を用いて解析した。遺伝子多型はカニクイザル *SLCO1B1* の cDNA 配列 (GenBank 登録番号 NM\_001284540) と比較することにより検出した。使用したプライマーを Table 1-1 に示した。

**Table 1-1. Primers used for identification genetic variants.**

Exons		Sequence (5' → 3')	
2	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int1a)	TGTGTCCAGCATTGATCTAGCA
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int2a)	GATTAAGAGACTGGTTGAAATGAAGGT
3	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int2a)	TGGTAAGAGGGAAAATAAGTATGG
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int3a)	GTCCAGTTATGACAACCAAAAATGT
	S	<i>mmSLCO1B1</i> (5int2b)	CTAAGTATGGTTTTTAAGATACAAATAATG
4	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int3a)	CAGTGAGTGGTCTAATGTAGGTGAA
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int4a)	TGAAAGCTATGATAAAGTGATTATGTAGAC
5	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int4a)	ACTTTTACCCATCACATCTCTTAAAAC
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int5a)	ATGTCTGTAAGAGTCAAATGTTTTTCC
	S	<i>mmSLCO1B1</i> (5int4b)	CTGGGAAATTGACAGAAAGGA
6-7	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int5a)	GAGTAGAGTAAGAGTTAAGTAGTTGAATTTGT
	RS	<i>mmSLCO1B1</i> (3int7a)	TTGTTTACATTCTCTCATTTTACTTAGC
8	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int7a)	CATGTCTTGAATTGAGGAAATTTAG
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int8b)	TCTTCCACTTGTTATGTGCTCAAG
9	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int8a)	CTCACTCTTGCATTGTGTGTTTATAG
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int9a)	AGAGCAATAATGACATCACAAGTTTC
10	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int9a)	CATGTATCCCAGAACTTAAAGTGAAA
	RS	<i>mmSLCO1B1</i> (3int10a)	GTTTGGGGTCTTAAGAAACAGATATT
11	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int10a)	GATGGAGAGCATAAAATAAATAAGCACT
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int11a)	CTTTTAATTGGCGTCCTTACAGTTTAC
	S	<i>mmSLCO1B1</i> (3int11b)	CTTACAGTTTACAGTTACAGAAAGATTTGG
12	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int11a)	GTTTGAACAAGTGAGACTTTACTGGATA
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int12a)	TTATGGCCTTGAGAGTTCATAGTAAT
13	FS	<i>mmSLCO1B1</i> (5int12a)	ATTGTTATTATTGCTGAAGTGTTTGC
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int13a)	GGTCACTCAATTTTACTCTGTCTCTTA
14	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int13b)	CATCAATGACATTACTACATGATTTCG
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int14a)	CATAGTGCCTGCAAAGTAAGTTTC
	S	<i>mmSLCO1B1</i> (5int13a)	CCTTTATTATTGGGTAGATGTAGAACAAA
15	F	<i>mmSLCO1B1</i> (5int14b)	CTCAGTTTCTCCTCCCAACTGTA
	R	<i>mmSLCO1B1</i> (3int15a)	CATCGGCTTATTAATACTTTACCATA
	S	<i>mmSLCO1B1</i> (5int14c)	CTATTAATATCTATCATTATGCCCAATAC

F, forward primer; R, reverse primer; S, sequence primer

## I-2-iv 発現コンストラクトの調製

発現コンストラクトを調製するため、サル OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 の cDNA を、RT-PCR により前述の肝臓 total RNA から調製した。SuperScript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific) およびオリゴ (dT) プライマーを用いてメーカーのプロトコールに従って逆転写反応を行った。得られた第一鎖 DNA を鋳型とし、KOD-Plus-Neo DNA ポリメラーゼ (東洋紡) を用い、ABI GeneAmp PCR システム 9700 サーマサイクラー (Applied Biosystems) にてメーカーのプロトコールに従って PCR 反応を行った。増幅は次のサーマルサイクラー条件下で行った。初期変性 94 °C, 2 分; 変性 98 °C, 10 秒, アニーリング 65 °C, 30 秒, 伸長 68 °C, 1 分を 35 サイクル; さらに最終伸長 68 °C, 5 分。使用したプライマーの配列を次に示した。OATP1B1 は (5rt2) 5'-GCTGTAGGATTCTAAGTCCAGGTGATTG-3' および (3rt1) 5'-TTTCTCCCCTTAATAATGTGTTTCACTATCTG-3' , OATP1B3 は (5rt1) 5'-CAGCAATTA AAAACGTTTCACATGGTATCTGTAG-3' および (3rt1) 5'-GTTAGTTGGCAGCAGCATTGTCTTG-3' , OATP2B1 は (5rt1) 5'-GTCTGGAGCTCCCACCATTATTGC-3' および (3rt1) 5'-GTGGAGGAGCCAGAATGGAACACA-3'。増幅した PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific) を用いてメーカーのプロトコールに従って pCR4 ベクタークローニングした。インサートの配列の確認は ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) にてメーカーのプロトコールに従って実施した。先に示した KOD-Plus-Neo DNA ポリメラーゼにて増幅した各 cDNA の PCR 産物を制限酵素 (XhoI または HindIII) を用いて pcDNA5/FRT ベクター (Thermo Fisher Scientific) にサブクローニングした。プライマーの配列を次に示した。OATP1B1 は (5exp1) 5'-ATCATGGACCAAATAAACATTTGGATAAAAACAG-3' および (3exp1) 5'-CCGCTCGAGTTAATAATGTGTTTCACTATCTGCCCCAGCA-3' , OATP1B3 は 5'-

ATCATGGGCCAACATCAACATTTGAATA-3' および (3exp1) 5'-  
CCGCTCGAGTTAGTTGGCAGCAGCATTGTCTTG-3', OATP2B1 は 5'-  
CCCAAGCTTGTCATGGGACCCAGGATAGGG-3' および (3exp1) 5'-  
CTCACACTCGGGAATCCTCCGGCTTCTTC-3'. 挿入した配列は先に示した方法にて確認  
した. OATP1B1 発現コンストラクトへの変異導入用プライマーの配列は Table 1-2 に示し  
た.



**Table 1-2. Primers used for site-directed mutagenesis.**

Variants		Sequence (5' → 3')	
c.13A>C	F	<i>mfSLCO1B1</i> c13A_C (5qc1)	TTCTGCAGATATCATGGACCAAAATcAACATTTGGATAAAACAGCA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c13A_C (3qc1)	TGCTGTTTTATCCAAATGTTgATTTTGGTCCATGATATCTGCAGAA
c.403T>G	F	<i>mfSLCO1B1</i> c403T_G (5qc1)	ATTCTAAAGAAATTAATATTGATTCATCAGAAAATgCAACATCGACCTTATCCAC
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c403T_G (3qc1)	GTGGATAAGGTCGATGTTGcATTTTCTGATGAATCAATATTAATTTCTTTAGAAT
c.445T>G	F	<i>mfSLCO1B1</i> c445T_G (5qc1)	CCTTATCCACCTGTTTAATTAATCAAATTGTAgCACTCAATAGAACATCA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c445T_G (3qc1)	TGATGTTCTATTGAGTGcTACAATTTGATTAATTAACAGGTGGATAAGG
c.874G>T	F	<i>mfSLCO1B1</i> c874G_T (5qc1)	AAATAAACCCACAAAAAGAAAGAAAAcTTCATTATCTTTGCCTGTGTTGG
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c874G_T (3qc1)	CCAACACAGGCAAAGATAATGAAGaTTTTCTTTCTTTTTGTGGTTTATTT
c.937A>T	F	<i>mfSLCO1B1</i> c937A_T (5qc1a)	CAGCTAATTTGACCiGTCGAGGAAAAAAATTACC
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c937A_T (3qc1a)	GGTAATTTTTTTTCCTCGACaGGTCAAATTAGCTG
c.980G>A	F	<i>mfSLCO1B1</i> c980G_A (5qc1)	CAAAAATGTGACTGGTTTTTTTCCaGTCTTTTAAAAAGCATCCTTACTA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c980G_A (3qc1)	TAGTAAGGATGCTTTTTAAAAGACtGGAAAAAACAGTCACATTTTTG
c.1000A>G	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1000A_G (5qc1)	CGGTCTTTTAAAAGCATCCTTgCTAATCCCCTGTATGTTGTAT
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1000A_G (3qc1)	ATACAACATACAGGGGATTAGcAAGGATGCTTTTTAAAAGACCG
c.1036C>G	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1036C_G (5qc1)	ATGTTGTATTTGTGCTTTTGACGgTGTTACAAATAAGCAGCTATATT
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1036C_G (3qc1)	AATATAGCTGCTTATTTGTAACaCGTCAAAAGCACAAATACAACAT
c.1243G>A	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1243G_A (5qc1)	AATTGCCAAATTCTCATTTTTTACTaCTGTGCATGTCATTGTTCTTTTACC
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1243G_A (3qc1)	GGTAAAAGAACAATGACATGACAGtAGTAAAAAATGAGAATTTGGCAATT
c.1366C>T	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1366C_T (5qc1)	GACATCTCATAGAGATGTACCAtTTTCTTATTGCAACTCAGACTG
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1366C_T (3qc1)	CAGTCTGAGTTGCAATAAGAAAaTGGTACATCTCTATGAGATGTC
c.1558C>T	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1558C_T (5qc1)	GAACAGAAATTACTCAGCCtATTTGGGTGAATGCCCAAG
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1558C_T (3qc1)	CTTGGGCATTACCCAAATaGGCTGAGTAATTTCTGTTC
c.1582G>A	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1582G_A (5qc1)	GGGTGAATGCCCAAGAAGTaATGCTTGTCTAACGAAATT
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1582G_A (3qc1)	AATTTTCGTTAGACAAGCATtACTCTTGGGCATTACCC
c.1595C>T	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1595C_T (5qc1)	CCCAAGAAGTGATGCTTGTCTAAtGAAATTTTACTTTTTTGTGGCAA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1595C_T (3qc1)	TTGCAACAAAAAAGTAAATTTCaTTAGACAAGCATCACTTCTTGGG
c.1841G>A	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1841G_A (5qc1)	GTGGCACACGTGGGTCATGTAAgATATATAATTCCACATTATTT
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1841G_A (3qc1)	AAATAATGTGGAATTATATATCtTACATGACCCACGTGTGCCAC
c.1924A>G	F	<i>mfSLCO1B1</i> c1924A_G (5qc1)	CAGTGTTAAGAGTCTCATCACTTGTTTTATATATTgTATTAATTTATGCCATGAAG AAA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c1924A_G (3qc1)	TTTCTTCATGGCATAAAATTAATAcAATATATAAAACAAGTGATGAGACTCTTAAC ACTG
c.2003C>A	F	<i>mfSLCO1B1</i> c2003C_A (5qc1)	GAAAATGGAAGTGTCATGGATGAAGaAAACTTAGAATCCTTAAATAACAATA
	R	<i>mfSLCO1B1</i> c2003C_A (3qc1)	TATTGTTATTTAAGGATTCTAAGTTTtCTTCATCCATGACACTTCCATTTTC

F, forward primer; R, reverse primer

The nucleotides to be changed are indicated in lower case.

I-2-v 組換えサル OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, および遺伝子多型を有する OATP1B1  
の発現細胞を用いた取り込み実験

Human embryonic kidney 293 (HEK293) に組換えサル OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, および遺伝子多型を有する OATP1B1 を一過性に発現させた細胞, もしくは模擬コンストラクトをトランスフェクションした細胞 (Mock) を実験に用いた. 細胞はウシ胎児血清 10% (v/v)、ペニシリン (最終濃度 100 Unit/mL), およびストレプトマイシン (最終濃度 100 µg/mL) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Thermo Fisher Scientific) を用いて 37 °C および 5% CO<sub>2</sub> 下, 加湿インキュベーター中で培養した. 細胞を播種する際は細胞をトリプシン処理し目的の容量の培地中に均一に懸濁させて 5×10<sup>5</sup> cells/mL の細胞懸濁液を調製した. 次に 0.5 mL の細胞懸濁液をポリ D リジンコーティング 24 ウェルプレート (Corning, Corning, NY) の各ウェルに添加し, 細胞に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用い, 各タンパク質発現コンストラクトを用いてメーカーのプロトコールに従ってトランスフェクションした. 手順を以下に示した. 1 ウェル当たりそれぞれのコンストラクト 0.4 µg を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 25 µL に希釈した (溶液 A). 別に, 1 ウェル当たり 1 µL の Lipofectamine 2000 を Opti-MEM 25 µL に希釈し (溶液 B), 溶液 A および B を穏やかに混合して室温で 5 分間静置後, 各ウェルにそれぞれのコンストラクト混合物 50 µL を添加した. トランスフェクションの 1 日後に培地を 5 mM 酪酸ナトリウム (和光純薬) を含む培地に交換してトランスポーター発現を誘導し, その後 1 日間培養し取り込み実験に供した.

取り込み実験の前に細胞を 37 °C の緩衝液で 2 回洗浄した. 特に記載しない場合, 緩衝液は DMEM (培養時に添加した血清および抗生物質は不含) を用いた. 次に先の緩衝液を吸引除去し, [<sup>3</sup>H]ピタバスタチンもしくは基質認識性評価を実施した RI 非標識化合物を含む 37 °C の緩衝液 (阻害薬併用実験ではさらに阻害薬を含む) で置換することにより取り込みを開始した. 一定時間静置後, 緩衝液を吸引し, 細胞を氷冷した緩衝液で 2 回洗浄した. プレインキュベーション効果の検討はこれまでの報告を参考に若干の変更を加えて次

に示す方法で実施した (Amundsen et al., 2010). 一過性発現細胞を調製後, 取り込み実験の前に細胞を 37 °C の緩衝液で 2 回洗浄した. 次に先の緩衝液を吸引除去し, 細胞に阻害薬含有もしくは不含の緩衝液を添加し 37 °C で 1~3 時間プレインキュベーションした. プレインキュベーション処理後, 緩衝液を吸引除去し, 細胞を<sup>3</sup>H]ピタバスタチンおよび阻害薬を含む緩衝液で置換することにより取り込みを開始した. 一定時間静置後, 緩衝液を吸引し, 細胞を氷冷した緩衝液で 2 回洗浄した. 基質認識性検討 (テルミサルタンおよびシメプレビルを除く) および遺伝子多型の機能解析時は緩衝液に 20 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) 含有 Hank's balanced salt solution (HBSS, Thermo Fisher Scientific)を用いた. テルミサルタンおよびシメプレビルの基質認識性評価の際は緩衝液に 0.3%ウシ血清アルブミンおよび 20 mM HEPES 含有 HBSS を使用した. 細胞中の<sup>3</sup>H]ピタバスタチンもしくは RI 非標識化合物の定量は次に示す別々の方法で実施した.

<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの定量方法を次に示した. 氷冷した緩衝液 (DMEM もしくは 20 mM HEPES 含有 HBSS) で 2 回洗浄後, 0.15 mL の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液で細胞を溶解した. 0.15 mL の 1 M 塩酸を添加した後, 一部をバイアルに移し, Hionic Fluor (PerkinElmer, Waltham, MA) を添加して液体シンチレーションカウンターにて放射能を測定した. 細胞溶解液の一部を分取し, BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) にてメーカーのプロトコールに従って可溶性タンパク質量を測定した. RI 非標識化合物の定量方法を次に示した. 氷冷した緩衝液 (20 mM HEPES 含有 HBSS, もしくは 0.3%ウシ血清アルブミンおよび 20 mM HEPES 含有 HBSS) で 2 回洗浄後, 細胞表面に内標準物質として 0.01 μM ベラパミルを含む 80%アセトニトリル水溶液を添加し, よくピペッティングした後に回収した. 回収した溶液の遠心上清を LC-MS/MS 分析に供した. Xevo-TQS 質量分析計 (Waters, Milford, MA) を備えた Waters Acquity システムを用いた. 移動相は 0.025% ギ酸 (A, フェキソフェナジンを除く) およびアセトニトリル (B) を用い, ACQUITY PLC BEH C18 カラム (2.0 × 30 mm, 粒径 1.7 μm, Waters) を用いて逆相クロマトグラフィーにて分離した.

フェキソフェナジンの分析には溶媒 (A) として 10 mM 酢酸アンモニウムを用いた。カラム温度は 50 °C に保った。LC グラジエント条件を次に示した。流速は 0.5 mL/min で実施した。2%-95% B (0-2.2 min) → 95% B (2.2-2.7 min) → 2% B (2.7-3.0 min)。質量分析計はエレクトロスプレーイオン化後、multiple reaction monitoring 法で分析した。内標準物質に対する RI 非標識化合物のピーク面積比を測定した。

#### I-2-vi サルおよびヒト凍結肝細胞を用いた取り込み実験

サルおよびヒトの凍結保存肝細胞を解凍し、Krebs-Henseleit 緩衝液に懸濁して  $2.0 \times 10^6$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。取り込み実験を開始する前に細胞懸濁液を 37 °C で 2 分間保温した。取り込み実験は細胞懸濁液に<sup>3</sup>H]ピタバスタチンを含有する緩衝液（さらにシクロスポリン A もしくはリファンピシンを含有、もしくは不含）を同量添加して開始した。37 °C で一定時間静置後、混合液 100 μL を採取し、予め用意した上層にキットの油液 100 μL (Hepatocyte Transporter Suspension Assay Kit; BD Biosciences, San Jose, CA), 下層に 2 M 水酸化ナトリウム水溶液 100 μL を重層したマイクロチューブの最上層に滴下し、遠心分離して肝細胞を分離した。この過程で、肝細胞は油層を通過して 2 M 水酸化ナトリウム水溶液の層に入った。肝細胞を溶解するために 2 M 水酸化ナトリウム水溶液で一晩静置した後、マイクロチューブを油層で切断し、各部分をシンチレーションバイアルに移した。細胞溶解液を含む部分を 100 μL の 2 M 塩酸で中和し、シンチレーションカクテルと混合した後、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### I-2-vii データ解析

取り込み量 (μL/mg protein) は、細胞溶解液中の<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの放射能量もしくは細胞上清の有機溶媒抽出液中の RI 非標識化合物の量 (dpm/well もしくは pmol/well, 肝細胞の場合は dpm/tube) を添加濃度 (dpm/μL もしくは μM) および可溶性タンパク質含量 (mg protein/well) もしくは肝細胞量 ( $10^6$  cells/tube) で除して算出した。トランスポ

ーター依存的な取り込みはトランスポーター発現細胞への取り込みから Mock 細胞への取り込みを差し引いた。1-1 式を用いて薬物速度論パラメータを得た。

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

$v$  は $^{[3]H}$ ピタバスタチンの取り込み速度 (pmol/2 min/mg protein ; 取り込み量 (μL/mg protein) に作用濃度を乗じた。キネティクスパラメータを求める実験では取り込み時間 2 分で実施した),  $[S]$  は $^{[3]H}$ ピタバスタチンの作用濃度,  $K_m$  はミカエリス定数 (μM), および  $V_{\max}$  は最高取り込み速度 (pmol/2 min/mg protein) を表す。遺伝子多型の機能解析検討の際は Mock 細胞を用いた検討をせず, 1-1 式右辺に受動拡散に関するパラメータを加えた 1-2 式を用いた。

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

$P_{\text{dif}}$  は受動拡散クリアランス (μL/2 min/mg protein) を表す。肝細胞を用いた試験における阻害薬の  $IC_{50}$  値は 1-3 式を用いて算出した。トランスポーター発現細胞を用いた試験における阻害薬の  $IC_{50}$  値は 1-3 式の Uptake に $^{[3]H}$ ピタバスタチンのトランスポーター依存的な取り込みに対する阻害効果の % of control 値を用い, 右辺に 100 を乗じて算出した。

$$\text{Uptake} = I_0 - \frac{I_{\max} \times I^c}{I^c + IC_{50}^c} \quad \dots (1-3)$$

$I_0$  は阻害薬の存在下での最大残存率,  $I$  は阻害薬濃度,  $I_{\max}$  は最大阻害効果, および  $C$  は Hill 定数を表す。フィッティングは Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation as part of

Certara, St Louis, MO) もしくは Prizm 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いて非線形最小二乗法により実施した。

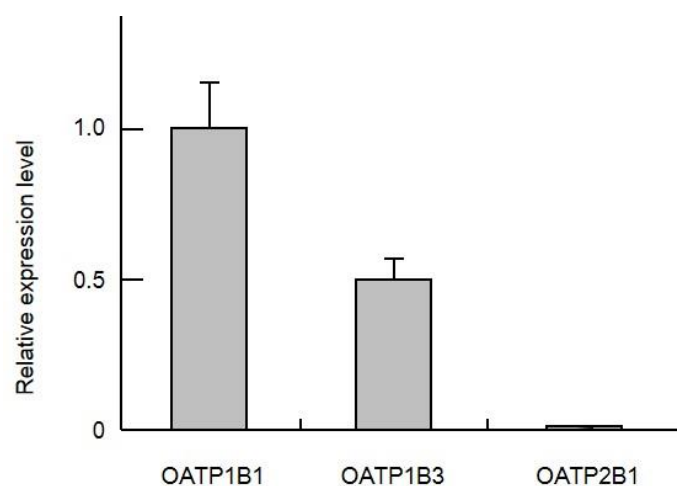
#### I-2-viii 統計学的解析

統計学的有意差はスチューデントの *t* 検定を実施した。有意差の水準は *p* 値<0.05 とした。

### 第3節 結果

#### I-3-i 肝臓におけるサル OATP mRNA の発現

肝臓におけるサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 mRNA を定量し, 各 OATP の相対的な発現量を評価した。Real-time RT-PCR の結果から, OATP1B1 が最も高く, 次に OATP1B3 であり, これらの発現量は OATP2B1 より顕著に高かった (Fig. 1-1)。



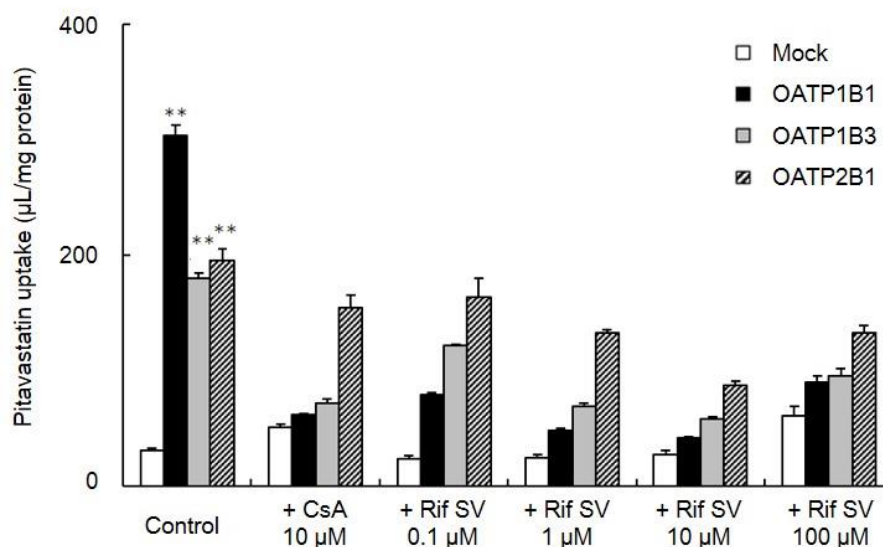
**Fig. 1-1. Expression of cynomolgus monkey OATP mRNAs in liver.**

Cynomolgus monkey OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1 mRNAs were quantified in liver. Expression level of each OATP mRNA was normalized to the 18S rRNA level and is represents the mean  $\pm$  SD (n=3). Expression value of OATP1B1 mRNA was adjusted to 1, to which all other expression levels were adjusted accordingly.

### I-3-ii 組換えサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の基質認識性

組換えサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 発現細胞を用いて, 日米の薬物相互作用ガイドライン/ガイダンス案に典型的な OATP1B1 および/もしくは OATP1B3 の基質として記載されている化合物を含む 11 化合物の基質認識性を検討した. サル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 発現細胞へのピタバスタチンの取り込みは Mock 細胞への取り込みと比較して有意に大きかった (Fig. 1-2). ヒト OATP の典型的な阻害薬として知られているシクロスポリン A は 10  $\mu\text{M}$  の濃度でピタバスタチンと同時に作用させることにより OATP1B1 および OATP1B3 依存的なピタバスタチン取り込みを大きく阻害した. ヒト OATP の典型的な阻害薬として知られているリファマイシン SV はサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 依存的なピタバスタチン取り込みを濃度依存的に阻害した. 阻害薬無作用時の OATP2B1 依存的なピタバスタチン取り込みは 160  $\mu\text{L}/\text{mg protein}$  であり, 10  $\mu\text{M}$  シクロスポリン A および 100  $\mu\text{M}$  リファマイシン SV よってその取り込みはそれぞれ 100 および 71  $\mu\text{L}/\text{mg protein}$  に低下した. 本研究では以降の基質認識性評価時の阻害薬として 100  $\mu\text{M}$  リファマイシン SV を用いることとした. プラバスタチンのサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 発現細胞への取り込みは Mock 細胞への取り込みと比較して有意に大きく, リファマイシン SV によってサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的なプラバスタチンの取り込みは阻害された (Fig. 1-3A). ロスバスタチンのサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 発現細胞への取り込みは Mock 細胞への取り込みと比較して有意に大きく, リファマイシン SV によってサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 依存的なロスバスタチンの取り込みは阻害された (Fig. 1-3B). テルミサルタンのサル OATP1B3 および OATP2B1 発現細胞への取り込みは Mock 細胞への取り込みと比較して有意に大きく, リファマイシン SV によってサル OATP1B3 および OATP2B1 依存的なテルミサルタンの取り込みは阻害された (Fig. 1-3C). アトルバスタチン, ボセンタン, エトポシド, フェキソフェナジン, フルバスタチン, グリベンクラミド, およびシメプレビルのサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 発現細胞への取り込みは 2 つ以上のサ

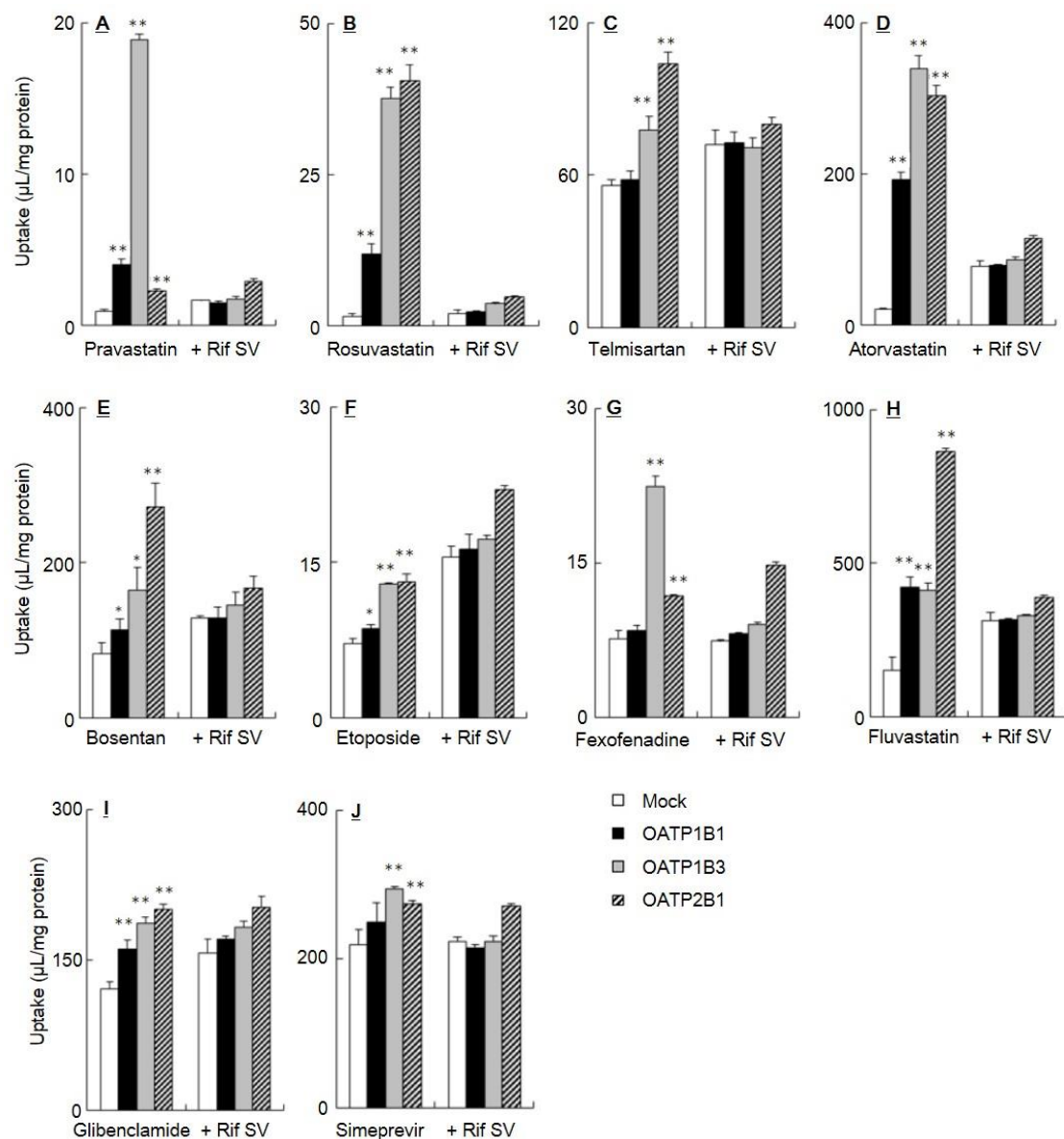
ル OATP 発現細胞で Mock 細胞への取り込みと比較して有意に大きく、多くの場合リファンマイシン SV によってそれらのサル OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 依存的な取り込みは阻害された (Fig. 1-3D~1-3J).



**Fig. 1-2. Recombinant monkey OATP1B1- OATP1B3- and OATP2B1-mediated uptake of pitavastatin.**

The cells were simultaneously incubated with 0.10 µM pitavastatin in the absence and presence of cyclosporine A (CsA) or rifamycin SV (Rif SV) for 10 min to investigate the capacity of OATP-dependent transport. Each column represents the mean ± SD (n = 3). \*\*Indicates significant difference ( $p < 0.01$ ) from mock cells in the control group.



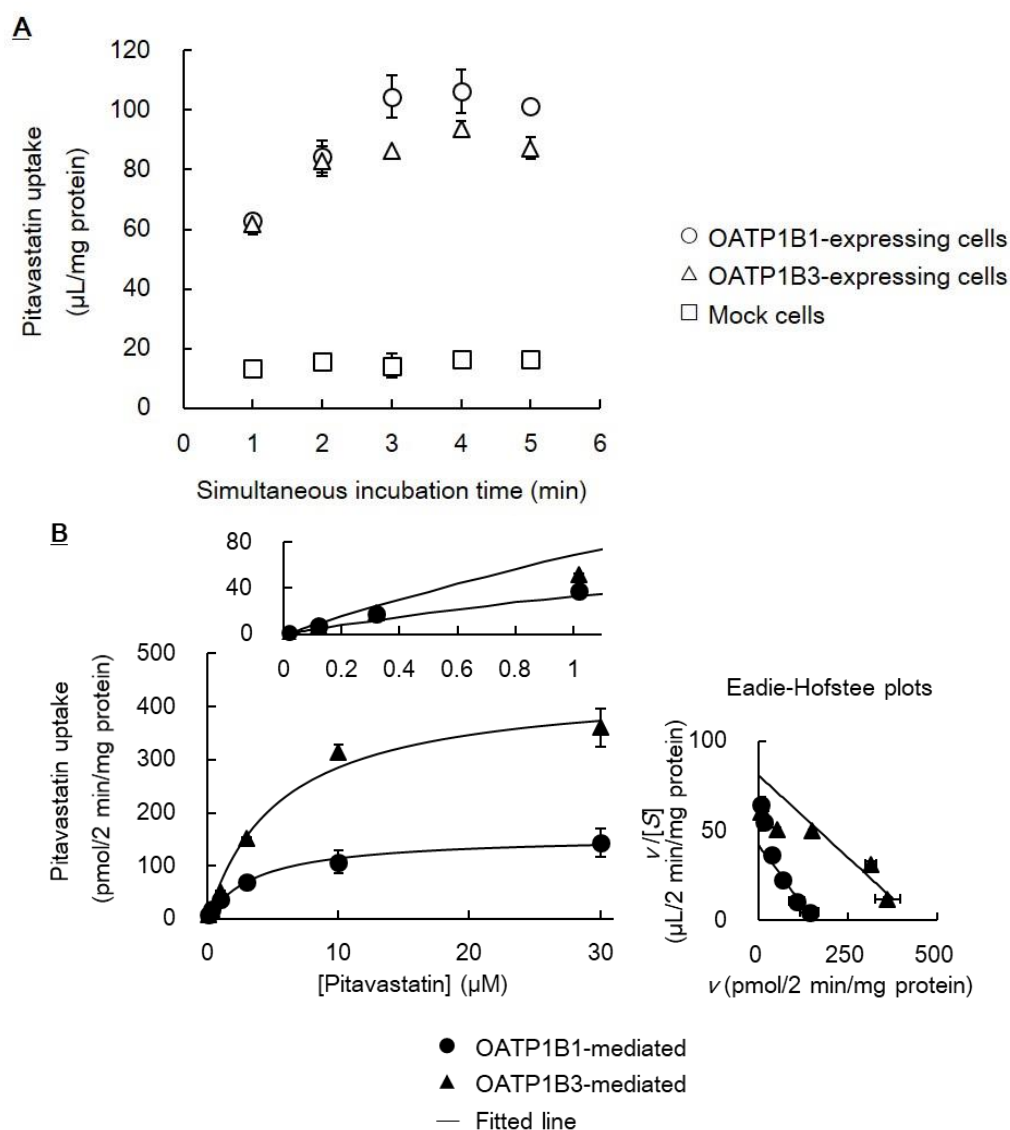


**Fig. 1-3. Recombinant monkey OATP1B1-, OATP1B3- and OATP2B1-mediated uptake of 10 OATP substrates.**

The cells were simultaneously incubated with pravastatin (A), rosuvastatin (B), telmisartan (C), atorvastatin (D), bosentan (E), etoposide (F), fexofenadine (G), fluvastatin (H), glibenclamide (I), or simeprevir (J) for 10 min in the absence and presence of 100 µM rifamycin SV (Rif SV) to investigate the capacity of OATP dependent transport. Concentration of the substrates was 0.10 µM (B–E, G, H, J), 1.0 µM (I), 10 µM (A), or 20 µM (F). Telmisartan (C) and simeprevir (J) were used with 0.3% bovine serum albumin. Each column represents the mean ± SD (n = 3). \*\*, \*Indicate significant differences respectively ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ) from mock cells in the absence of Rif SV group.

### I-3-iii 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞への<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの取り込み

組換えサル OATP1B1, OATP1B3 発現細胞, および Mock 細胞への<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの取り込みにおける経時変化を検討した (Fig. 1-4A). サル OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞への<sup>3</sup>H]ピタバスタチン取り込みは Mock 細胞に比べて顕著に高く, <sup>3</sup>H]ピタバスタチンの作用時間と共に増加した. サル OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞の取り込み活性は, それぞれの基質と報告されており (Shen et al., 2013), ヒト OATP1B1 および OATP1B3 のそれぞれの典型的な基質である<sup>3</sup>H]エストラジオール-17 $\beta$ -D-グルクロニドおよび<sup>3</sup>H]コレシストキニンオクタペプチドの取り込みから十分な活性を有することを確認した. 次に, 作用時間 2 分までは<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの取り込みに線形性があると判断し, 作用時間 2 分にてサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な <sup>3</sup>H]ピタバスタチン取り込みにおける濃度依存性を検討したところ, <sup>3</sup>H]ピタバスタチンの作用濃度の増加に伴い取り込みが飽和した (Fig. 1-4B). サル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な<sup>3</sup>H]ピタバスタチン取り込みの親和性を示す  $K_m$  値はそれぞれ  $3.7 \pm 0.5$  および  $5.5 \pm 1.0$   $\mu\text{M}$  であり,  $V_{\max}$  値はそれぞれ  $156 \pm 6$  pmol/2 min/mg protein および  $443 \pm 27$  pmol/2 min/mg protein であった. ヒト OATP1B1 および OATP1B3 のピタバスタチンの  $K_m$  値はそれぞれ  $0.81 \sim 4.8$   $\mu\text{M}$  および  $3.2$   $\mu\text{M}$  と報告されており (Hirano et al., 2004; Izumi et al., 2015; Vildhede et al., 2016), サル OATP1B1 および OATP1B3 の  $K_m$  値はそれぞれヒト OATP1B1 および OATP1B3 の  $K_m$  値と同等であった.

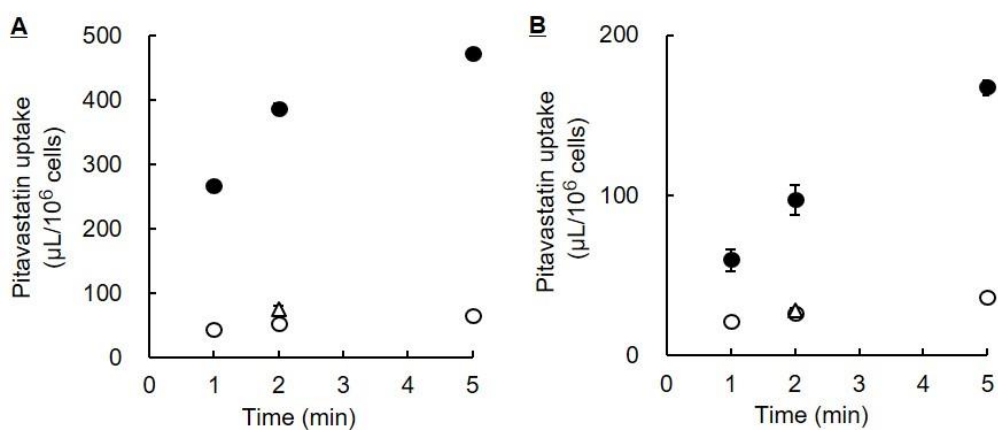


**Fig.1-4. Time profiles of [<sup>3</sup>H]pitavastatin (0.02 μM) uptake into cynomolgus monkey OATP1B1- and OATP1B3-expressing and mock cells (A), and concentration-dependence of the recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin for 2 min (B).**

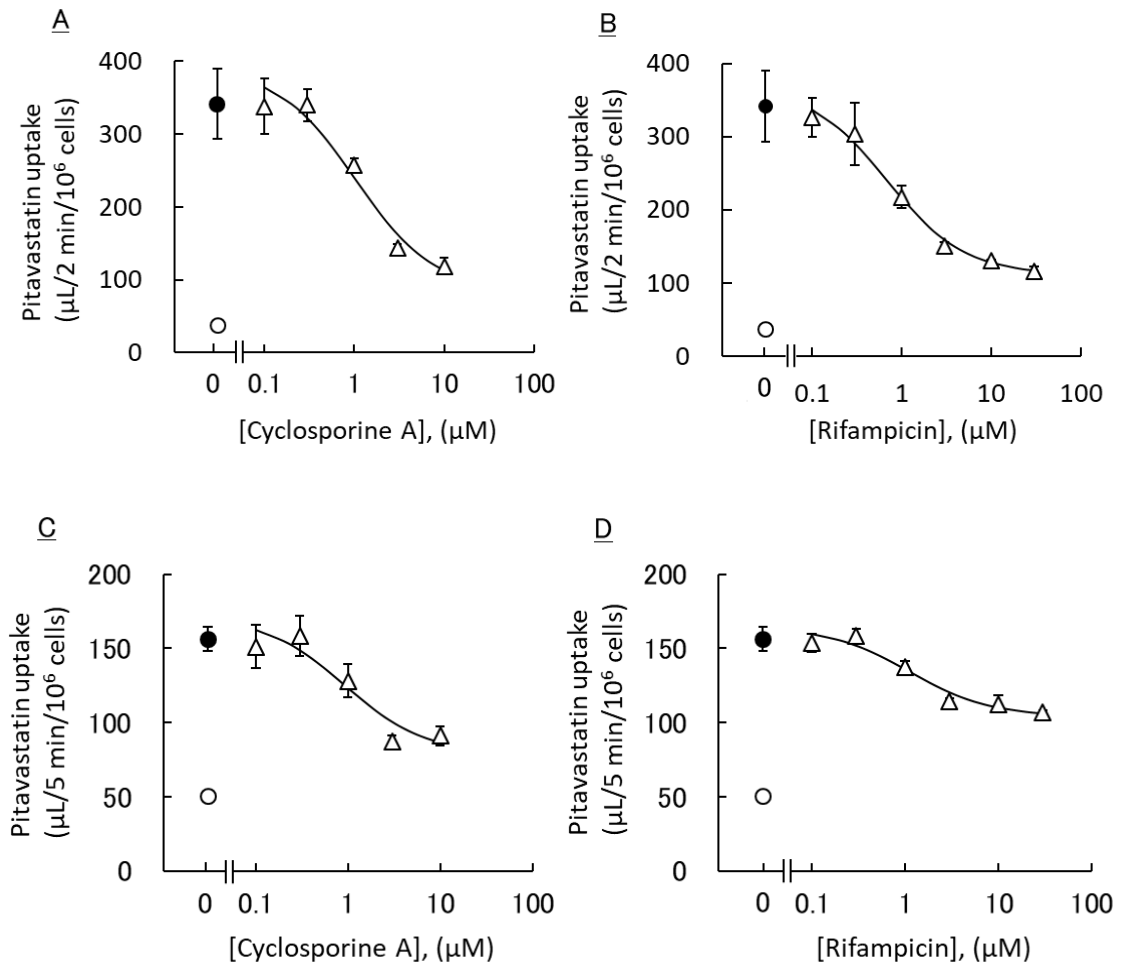
The recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- and OATP1B3-mediated [<sup>3</sup>H]pitavastatin uptake was obtained by subtracting the uptake into mock cells from that into transporter-expressing cells.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were obtained by fitting the substrate concentration–velocity plots with a nonlinear least-squares method based on the Equation 1-1, and the fitted lines were described. The lines in the Eadie-Hofstee plots were described based on the obtained  $K_m$  and  $V_{max}$  values with the above. The recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin (0.02 μM) for 2 min were 63.8 and 69.0 μL/2 min/mg, respectively. Each point represents the mean ± SD (n = 3). The time point of 3 min of recombinant cynomolgus monkey OATP1B3 represents the mean (n = 2).

### I-3-iv サルおよびヒト凍結肝細胞への $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込み

サルおよびヒトの凍結肝細胞を用いて、 $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みにおける経時変化を検討した (Fig. 1-5).  $37^\circ\text{C}$  での $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みはサルおよびヒトで経時的に増加した. 対照的に, 氷冷下での取り込みはいずれの種でも  $37^\circ\text{C}$  と比較して顕著に低く,  $37^\circ\text{C}$  での取り込みは過剰濃度のピタバスタチンによって阻害された. サルおよびヒト凍結肝細胞の OATP1B 活性は, ヒト OATP1B の典型的な基質として知られている  $[^3\text{H}]$ エストラジオール- $17\beta$ -D-グルクロニドの取り込みから十分な活性を有することを確認した. サルおよびヒトの凍結肝細胞への $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みはそれぞれ 2 分および 5 分までは線形であると判断した. 次に, サルおよびヒトの凍結肝細胞を用いてそれぞれ作用時間 2 分および 5 分にて $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みにおけるシクロスポリン A およびリファンピシンの影響を検討したところ,  $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みを濃度依存的に阻害した (Fig. 1-6). 阻害強度 (50%阻害濃度,  $IC_{50}$  値) に種差は認められなかった (Table 1-3).



**Fig.1-5. Time profiles of  $[^3\text{H}]$ pitavastatin uptake into monkey (A) and human (B) hepatocytes.** The uptake was determined at two concentrations (●,  $0.2 \mu\text{M}$ ; ○,  $1 \text{ mM}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  and  $0.2 \mu\text{M}$  at ice-cold temperature ( $\Delta$ ). Each point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). The time point of 5 min at  $0.2 \mu\text{M}$  represents the mean ( $n = 2$ ).



**Fig.1-6. Inhibitory effect of cyclosporine A (A, C) and rifampicin (B, D) on the uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin into monkey hepatocytes (A, B) for 2 min and human hepatocytes (C, D) for 5 min (●, 0.2  $\mu\text{M}$  pitavastatin; ○, 1 mM pitavastatin; Δ, 0.2  $\mu\text{M}$  pitavastatin with inhibitor). The  $IC_{50}$  values were estimated by a nonlinear least-squares method based on Equation 1-3, and the fitted lines were described. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3 or 4).**

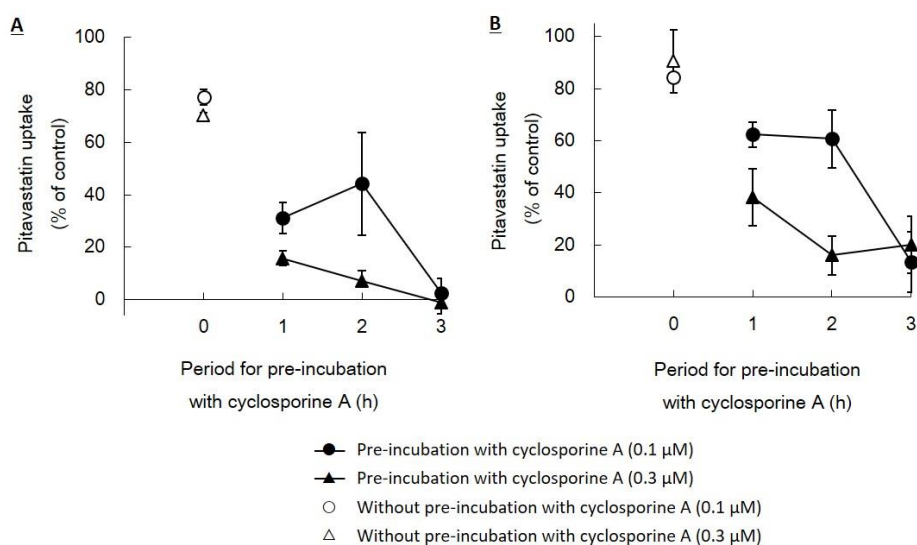
**Table 1-3.  $IC_{50}$  values of cyclosporine A and rifampicin on the uptake of [ $^3H$ ]pitavastatin into monkey and human hepatocytes.**

	Monkey	Human
Cyclosporine A ( $\mu M$ )	1.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.5
Rifampicin ( $\mu M$ )	0.7 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.4

The  $IC_{50}$  values were estimated by a nonlinear least-squares method based on Equation 1-3. Each value represents the mean  $\pm$  computersimulated SE.

I-3-v 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な [ $^3H$ ]ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A のプレインキュベーション時間の影響

組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な [ $^3H$ ]ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A の阻害作用は、シクロスポリン A を [ $^3H$ ]ピタバスタチンの添加前に細胞と 1~3 時間プレインキュベーションするとシクロスポリン A を含まないでプレインキュベーションした場合と比較して増強した (Fig. 1-7)。今回の検討ではより明確にプレインキュベーション効果を確認するため 3 時間のプレインキュベーション処理にて次の  $IC_{50}$  値の検討を実施した。サル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な [ $^3H$ ]ピタバスタチンの取り込みはシクロスポリン A を含まない 1~3 時間のプレインキュベーション処理では同等であった。



**Fig. 1-7. Pre-incubation time profiles of cyclosporine A on the inhibition of recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- (A) and OATP1B3-mediated (B) [<sup>3</sup>H]pitavastatin (0.02 μM) uptake.**

The cells were simultaneously incubated with [<sup>3</sup>H]pitavastatin and cyclosporine A for 2 min after 1–3 h pre-incubation with cyclosporine A, and simultaneously incubated with [<sup>3</sup>H]pitavastatin and cyclosporine A for 2 min without pre-incubation with cyclosporine A (cells were pre-incubated without cyclosporine A for 3 h). As a control of 1–3 h pre-incubation with cyclosporine A, the cells were incubated with [<sup>3</sup>H]pitavastatin without cyclosporine A for 2 min after 1–3 h pre-incubation without cyclosporine A (recombinant cynomolgus monkey OATP1B1-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin; 50.2, 60.3 and 46.8 μL/2 min/mg protein for 1, 2 and 3 h pre-incubation, respectively; recombinant cynomolgus monkey OATP1B3-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin; 43.8, 52.5 and 45.1 μL/2 min/mg for 1, 2 and 3 h pre-incubation, respectively). Each point represents the mean ± SD (n = 3).

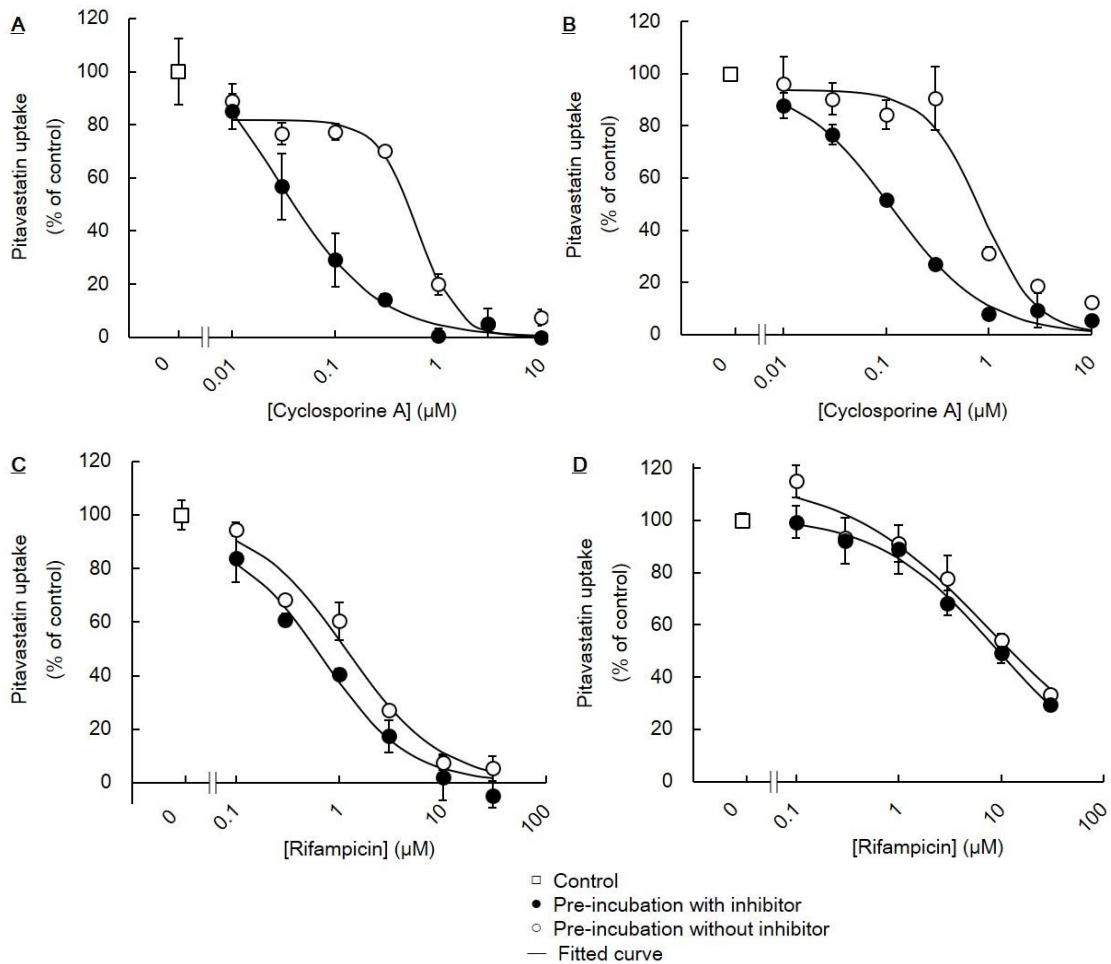
I-3-vi 組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な[<sup>3</sup>H]ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A およびリファンピシンの影響, およびそのプレインキュベーション効果

組換えサル OATP1B1 および OATP1B3 依存的な[<sup>3</sup>H]ピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A の阻害作用を検討した. シクロスポリン A 不含の緩衝液で 3 時間プレインキュベーションした後, シクロスポリン A を同時添加した際, 濃度依存的に阻害作用

は増強し, OATP1B1 および OATP1B3 の  $IC_{50}$  値は先に検討したサル肝細胞を用いた結果とほぼ同等であった (Fig. 1-8A および 1-8B, Table 1-3 および 1-4). これらの  $IC_{50}$  値はヒト肝細胞, ヒト OATP1B1, および OATP1B3 発現細胞を用いた検討結果ともほぼ同等であった (Table 1-3 および 1-4). [ $^3$ H]ピタバスタチンとシクロスポリン A を細胞に同時添加する前にシクロスポリン A と 3 時間プレインキュベーションすることによりシクロスポリン A の阻害作用は増強した (Fig. 1-8A および 1-8B, Table 1-4).

リファンピシン不含の緩衝液で 3 時間プレインキュベーションした後, [ $^3$ H]ピタバスタチンとリファンピシンを同時添加した際, 濃度依存的に阻害作用は増強した (Fig. 1-8C および 1-8D). リファンピシンのサル OATP1B1 に対する  $IC_{50}$  値は先に検討したサル肝細胞を用いた結果とほぼ同等であった (Table 1-3 および 1-4). これらの  $IC_{50}$  値はヒト肝細胞およびヒト OATP1B1 発現細胞を用いた結果ともほぼ同等であった. シクロスポリン A とは異なり, リファンピシンはサル OATP1B1 および OATP1B3 阻害作用におけるプレインキュベーション効果はとても小さく, 無視できる程度であった.





**Fig. 1-8. Pre-incubation effects of cyclosporine A (A, B) and rifampicin (C, D) on the recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- (A, C) and OATP1B3-mediated (B, D) uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin (0.02 µM).**

The cells were simultaneously incubated with [<sup>3</sup>H] pitavastatin and inhibitor for 2 min after 3 h pre-incubation with or without inhibitor. As a control, the cells were incubated with [<sup>3</sup>H]pitavastatin without inhibitor for 2 min after 3 h pre-incubation without inhibitor (the recombinant transporter-mediated uptake of [<sup>3</sup>H]pitavastatin: 60.6, 58.8, 30.4 and 39.5 µL/2 min/mg protein for A, B, C and D, respectively). The lines represent fitted curves for simultaneous incubation with [<sup>3</sup>H]pitavastatin and inhibitor after 3 h pre-incubation with or without inhibitor, that were obtained by a nonlinear least-squares method based on Equation 1-3. Each point represents the mean ± SD (n = 3)

**Table 1-4.  $IC_{50}$  values of cyclosporine A and rifampicin on the recombinant cynomolgus monkey OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of [ $^3H$ ]pitavastatin (0.02  $\mu M$ ) after preincubation with or without inhibitors.**

			Pre-incubation without inhibitor	Pre-incubation with inhibitor
Cyclosporine A ( $\mu M$ )	Monkey	OATP1B1	0.62 $\pm$ 0.09	0.027 $\pm$ 0.011
		OATP1B3	0.85 $\pm$ 0.21	0.11 $\pm$ 0.03
	Human	OATP1B1	0.24 (Hirano et al., 2006)	0.026 (Izumi et al., 2015)
		OATP1B3	0.42 (Chang et al., 2013)	Not reported
Rifampicin ( $\mu M$ )	Monkey	OATP1B1	1.2 $\pm$ 0.5	0.68 $\pm$ 0.25
		OATP1B3	7.6 $\pm$ 3.2	8.9 $\pm$ 1.1
	Human	OATP1B1	1.6 (Prueksaritanont et al., 2014)	Not affected (Shitara et al., 2013)
		OATP1B3	0.5 (Prueksaritanont et al., 2014)	Not reported

The  $IC_{50}$  values were estimated by a nonlinear least-squares method based on Equation 1-3. Each value represents the mean  $\pm$  computersimulated SE.

#### I-3-vii サル *OATP1B1* の遺伝子多型の種類および頻度

カニクイザル 64 頭（インドシナ産 32 頭およびインドネシア産 32 頭）およびアカゲザル 32 頭を用い *OATP1B1* の変異解析により計 16 の非同義置換を伴う遺伝子多型を見出した (Table 1-5)。これらの遺伝子多型のうち 6 つ (38%) はカニクイザルに特有であり、そのうち 1 つはインドシナ産に、4 つはインドネシア産に特有であった。8 つの遺伝子多型 (50%) はアカゲザルに特有であった。2 つの遺伝子多型 (13%) はカニクイザルとアカゲザルの両方に共通して存在していた。

**Table 1-5. Non-synonymous variants of OATP1B1 identified in cynomolgus and rhesus monkeys.**

Variant	Exon	Nucleotide change <sup>a</sup>	Amino acid change	Number of alleles		
				Cynomolgus		Rhesus
				Indochina	Indonesia	
c.13A>C	2	AAAAT(A>C)AACAT	K5Q	4/64	2/64	37/64
c.403T>G	5	AAAAT(T>G)CAACA	S135A	0/64	0/64	9/64
c.445T>G		TTGTA(T>G)CACTC	S149A	10/64	39/64	10/64
c.874G>T	8	GAAAA(G>T)CTTCA	A292S	0/64	0/64	3/64
c.937A>T		TGACC(A>T)GTCGA	S313C	0/64	2/64	0/64
c.980G>A	9	TTTCC(G>A)GTCTT	R327Q	0/64	2/64	0/64
c.1000A>G		TCCTT(A>G)CTAAT	T334A	0/64	0/64	1/64
c.1036C>G		TGACG(C>G)TGTTA	L346V	0/64	0/64	10/64
c.1243G>A	10	TTACT(G>A)CTGTC	A415T	0/64	0/64	1/64
c.1366C>T	11	TACCA(C>T)TTTCT	L456F	32/64	22/64	0/64
c.1558C>T	12	CAGCC(C>T)ATTTG	H520Y	0/64	10/64	0/64
c.1582G>A		GAAGT(G>A)ATGCT	D528N	0/64	0/64	3/64
c.1595C>T		TCTAA(C>T)GAAAT	T532M	0/64	0/64	3/64
c.1841G>A	14	ATGTA(G>A)GATAT	R614K	1/64	0/64	0/62
c.1924A>G	15	ATATT(A>G)TATTA	I642V	0/64	7/64	0/64
c.2003C>A		TGAAG(C>A)AAACT	A668E	0/64	0/64	1/64

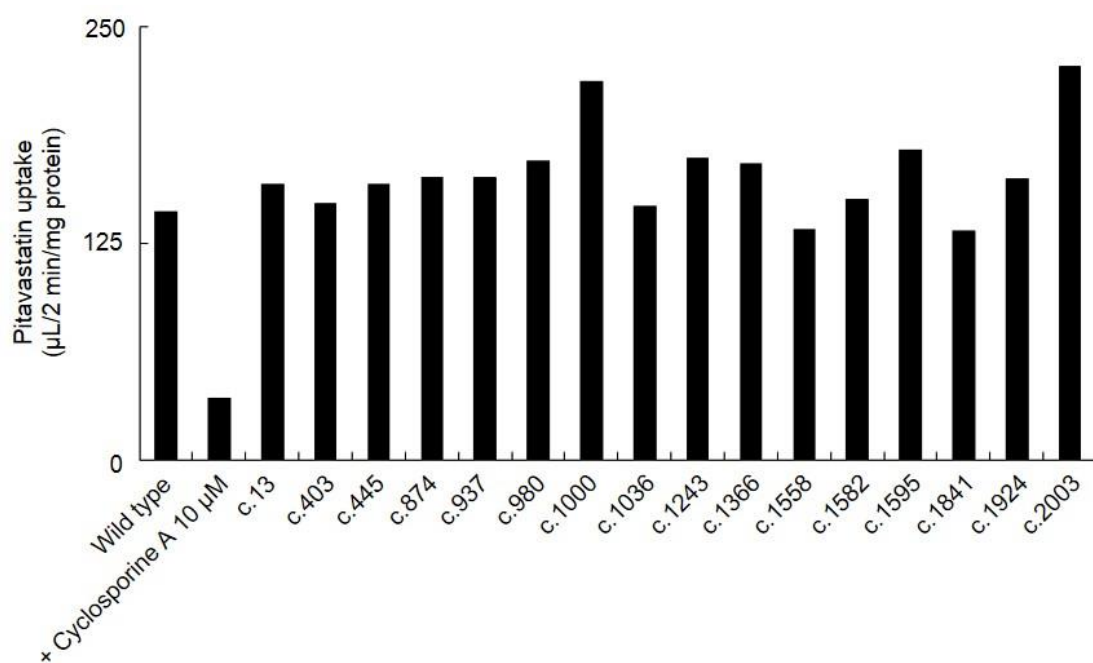
<sup>a</sup> Nucleotide changes were detected by comparing with cynomolgus *SLCO1B1* cDNA sequence (GenBank accession no. NM\_001284540).

### I-3-viii サル *OATP1B1* の遺伝子多型の機能解析

プローブ基質に<sup>3</sup>H]ピタバスタチンを用い、サル *OATP1B1* の遺伝子多型を有する組換えサル *OATP1B1* 発現細胞を用いて基質取り込み活性における機能変化を検討した。遺伝子多型を有するサル *OATP1B1* 発現細胞へのトレーサー濃度 (0.02 μM) の<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの取り込みは野生型の 92%~159%であった (Fig. 1-9)。アカゲザルで見出されたがカニクイザルでは見出されなかった 2 つのサル *OATP1B1* 遺伝子多型 (c.1000A>G および c.2003C>A) は高い取り込み活性を示した。

野生型および遺伝子多型を有する組換えサル *OATP1B1* 発現細胞への<sup>3</sup>H]ピタバスタチンの取り込みは作用濃度を上昇させると飽和した。野生型では 2 回の実験でピタバスタチン

ンの  $K_m$  値は 0.74 および 0.85  $\mu\text{M}$  であった (Table 1-6). 野生型のヒト OATP1B1 発現細胞へのピタバスタチン取り込みの  $K_m$  値は 0.81~4.8  $\mu\text{M}$  と報告されている (Hirano et al., 2004; Izumi et al., 2015; Vildhede et al., 2016). 野生型のサル OATP1B1 発現細胞へのピタバスタチン取り込みの  $K_m$  値は低かったが, ヒト OATP1B1 での報告値の範囲内であった. 遺伝子多型を有するサル OATP1B1 発現細胞への $[^3\text{H}]$ ピタバスタチンの取り込みにおける  $K_m$  値,  $V_{\text{max}}$  値, および  $V_{\text{max}}/K_m$  値は, それぞれ野生型の 36%~255%, 57%~268%, および 91%~161%であった (Table 1-6) .



**Fig. 1-9. Pitavastatin uptake mediated by recombinant monkey OATP1B1 wild type and its 16 variants.**

The cells were incubated with 0.020  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ pitavastatin for 2 min to investigate kinetically. Each column represents the mean of duplicated determination. Effects of cyclosporine A on  $[^3\text{H}]$ pitavastatin uptake mediated by wild-type OATP1B1 were confirmed.

**Table 1-6. Kinetic parameters for recombinant monkey OATP1B1-dependent [<sup>3</sup>H]pitavastatin uptake.**

Variant	$K_m$		$V_{max}$		$V_{max}/K_m$		$P_{dif}$
	( $\mu$ M)	% of wild	(pmol/2 min/mg protein)	% of wild	( $\mu$ L/2 min/mg protein)	% of wild	(pmol/2 min/mg protein)
Wild type	0.74 ± 0.08	100	94.0 ± 9.2	100	127	100	30.2 ± 1.4
	0.85 ± 0.17		95.2 ± 16.5		112		25.5 ± 3.0
c.13A>C	0.78 ± 0.17	98	99.8 ± 19.1	106	128	107	32.8 ± 3.7
c.403T>G	0.50 ± 0.12	63	61.5 ± 11.9	65	123	103	33.8 ± 3.1
c.445T>G	0.74 ± 0.15	93	96.8 ± 16.5	102	131	109	31.4 ± 2.6
c.874G>T	0.63 ± 0.09	79	89.5 ± 11.2	95	142	119	29.4 ± 2.4
c.937A>T	0.53 ± 0.04	67	73.3 ± 4.8	78	138	116	30.2 ± 1.2
c.980G>A	0.57 ± 0.04	72	78.9 ± 5.4	83	138	116	39.5 ± 1.3
c.1000A>G	0.29 ± 0.04	36	53.9 ± 5.9	57	186	155	39.9 ± 2.2
c.1036C>G	0.63 ± 0.07	79	74.6 ± 6.8	79	118	99	35.5 ± 1.5
c.1243G>A	0.40 ± 0.07	50	54.3 ± 8.2	57	136	114	42.6 ± 2.6
c.1366C>T	0.75 ± 0.13	94	103.7 ± 15.7	110	138	116	34.1 ± 2.4
c.1558C>T	0.50 ± 0.14	63	54.2 ± 13.3	57	108	91	35.2 ± 3.6
c.1582G>A	0.69 ± 0.13	87	89.8 ± 14.4	95	130	109	27.7 ± 3.0
c.1595C>T	0.66 ± 0.10	83	98.4 ± 12.8	104	149	125	28.4 ± 2.6
c.1841G>A	2.03 ± 0.55	255	253.3 ± 74.5	268	125	104	14.6 ± 7.7
c.1924A>G	0.66 ± 0.13	83	92.6 ± 16.4	98	140	117	31.1 ± 3.5
c.2003C>A	0.60 ± 0.03	75	115.7 ± 4.9	122	193	161	40.1 ± 1.1

$K_m$  and  $V_{max}$  values were obtained by fitting the substrate concentration–velocity plots with a nonlinear least-squares method based on the Equation 1-2.

#### 第4節 考察

サル肝臓における mRNA の相対的な発現量は、OATP1B1 が最も高く、次に OATP1B3 であり、これらの発現量は OATP2B1 より顕著に高かった (Fig. 1-1)。ヒト肝細胞を用いた

過去の報告では、ヒト OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 タンパク質の相対的な発現量に同様の傾向が認められている (Hirano et al., 2004; 2006). したがって、肝臓におけるこれら OATP の相対的な発現量はサルとヒトで類似していることが示唆された.

組換えサル OATP 発現細胞を用いた基質認識性の検討にて、被験化合物の OATP 発現細胞への取り込みが Mock 細胞と比較して有意に大きい場合に基質であるとした. 加えて、OATP 依存的な取り込みがシクロスポリン A もしくはリファマイシン SV よって半分程度以下に低下することも判断材料とした. ピタバスタチン, プラバスタチン, およびロスバスタチンは典型的な OATP1B1 および OATP1B3 の基質として日米の薬物相互作用ガイドライン/ガイダンス案に記載されている. ピタバスタチン, プラバスタチン, およびロスバスタチンはヒトと同様にいずれもサル OATP1B1 および OATP1B3 の基質であった (Fig. 1-2, 1-3A および 1-3B, および Table 1-7). ピタバスタチンおよびロスバスタチンはヒト OATP2B1 の基質としても報告されており (Hirano et al., 2006; Shen et al., 2013), サルでも同様に OATP2B1 の基質であった. プラバスタチンは今回検討した中性付近の pH ではヒト OATP2B1 の基質にならないと報告されている (Nozawa et al., 2004). 今回の検討にてプラバスタチンは有意にサル OATP2B1 発現細胞に取り込まれたものの, その OATP2B1 依存的な取り込みはリファマイシン SV の併用で半分以下に低下しなかった. 化合物のトランスポーター阻害能は基質によって異なる例が報告されている (Izumi et al., 2015). すなわちリファマイシン SV の阻害作用は各々の基質に依存する可能性があることに留意する必要がある. したがって, 単独の OATP 阻害薬であるリファマイシン SV が被験化合物の OATP 依存的な取り込みに及ぼす阻害効果を観察するのみでは基質にならないとの判定は困難であった. 以上から, プラバスタチンはサル OATP2B1 の基質であると考えた.

テルミサルタンは OATP1B1 と比較して OATP1B3 選択的な基質として日米の薬物相互作用ガイドライン/ガイダンス案に記載されており, サルでも同様の特徴を示した (Fig. 1-3C および Table 1-7). テルミサルタンはヒトにおいて OATP2B1 の基質でもあることが報告されており, ヒト肝臓における OATP1B3 タンパク質発現量は OATP2B1 と比較して

高いことから肝細胞への取り込みには主に OATP1B3 が寄与すると示唆されている (Ishiguro et al., 2006). テルミサルタンは組換えサル OATP1B3 および OATP2B1 の基質であったが、サル肝臓における OATP2B1 の mRNA 発現量は OATP1B3 よりも顕著に低いことを考慮すると、テルミサルタンはサル *in vivo* において OATP1B3 を介した相互作用の選択的基質として使用できる可能性が示唆された. アトルバスタチン, ポセンタン, エトポシド, フェキソフェナジン, フルバスタチン, グリベンクラミド, およびシメプレビルの評価結果を含め、サルとヒトの OATP1B1, OATP1B3, および OATP2B1 の基質認識性にはいくつかの違いがあったが、概ね同等であることが明らかとなった (Fig. 1-3D~1-3J および Table 1-7).

今回基質認識性を評価した化合物のうち、ピタバスタチンは組換えサル OATP1B1 発現細胞への取り込みの Mock 比が大きい化合物の一つであった. ピタバスタチンのサル OATP1B1 および OATP1B3 への取り込みについてさらに詳細に検討した. ピタバスタチンのヒト肝細胞への取り込みには主に OATP1B が寄与することが報告されており (Hirano et al., 2006), ピタバスタチンはヒトにおいて OATP1B の阻害により引き起こされる相互作用を評価するためのプローブ基質の代表例として記載されている (薬物相互作用ガイドライン). サル OATP1B1 および OATP1B3 によるピタバスタチン取り込みの  $K_m$  値は、それぞれヒト OATP1B1 および OATP1B3 の  $K_m$  値とほぼ同等であった (Fig. 1-4). 加えて、サルおよびヒトの肝細胞にピタバスタチンを取り込む能動輸送が機能していると示唆されたこと (Fig. 1-5), および肝臓におけるこれら OATP の相対的な mRNA 発現レベルはサルとヒトで同等であったことから、ピタバスタチンはサルにおいても OATP1B の阻害により引き起こされる相互作用を評価するためのプローブ基質として用いることができると示唆された.

**Table 1-7. Summary for monkey OATP1B1, OATP1B3 and/or OATP2B1 substrates determined in the present study and reported information on 11 OATP substrates**

Compound	Monkey OATP			Human OATP			Reference
	1B1	1B3	2B1	1B1	1B3	2B1	
Pitavastatin	+	+	+	+	+	+	(Hirano et al., 2004; 2006)
Pravastatin	+	+	+/-	+	+	-	(Kunze et al., 2014; Nozawa et al., 2004)
Rosuvastatin	+	+	+	+	+	+	(Shen et al., 2013)
Telmisartan	-	+	+	-	+	+	(Ishiguro et al., 2006)
Atorvastatin	+	+	+	+	+	+	(Karlgrén et al., 2012)
Bosentan	+	+	+	+	+	+	(Treiber et al., 2007)
Etoposide	+	+	+/-	+	+	+	(Fahrmayr et al., 2012)
Fexofenadine	-	+	+/-	+/-	+	+/-	(Izumi et al., 2015; Ming et al., 2011; Shimizu et al., 2005)
Fluvastatin	+	+	+	+	-	+	(Noe et al., 2007)
Glibenclamide	+	+	+	+	+/-	-	(Schwabedissen et al., 2014; Varma et al., 2014)
Simeprevir	-	+	+/-	+	+	+	(PMDA)

In monkeys, recognized (+) and non-recognized (-) as substrate for the uptake of test compounds into recombinant OATP-expressing cells was significantly greater than or similar to that of mock cells in the control (Fig. 1-2) or in the absence of rifamycin SV (Fig. 1-3) in the primary evaluation for substrate specificity. In addition, effects that the apparent recombinant monkey OATP-mediated test compounds uptake was suppressed to almost less than half by 100 µM rifamycin SV in the secondary evaluation for substrate determinations. It is shown as (+/-), when the test drug uptake into recombinant OATP-expressing cells may not be significantly greater than that of mock cells in the absence of rifamycin SV group, but the uptake by apparent recombinant monkey OATP was not suppressed to almost half by 100 µM rifamycin SV. In humans, it is shown as (+) and (-), when the test drug was found to be a substrate of OATPs or not a substrate, respectively. It is shown as (+/-) with fexofenadine in human OATP1B1 and OATP2B1, and glibenclamide in human OATP1B3, because it had been reported as a substrate in one report, whereas in other reports, it had been reported as not a substrate. Substrate information reported for human OATP was at neutral pH.



シクロスポリン A およびリファンピシンはヒト OATP1B の典型的阻害薬として知られている。ピタバスタチンをプローブ基質として、サルおよびヒト肝細胞ならびにサル OATP1B1 および OATP1B3 発現細胞を用い、これら典型的阻害薬の阻害強度を検討した (Fig. 1-6 および 1-8, Table 1-3 および 1-4)。報告されているヒト OATP1B の結果と比較すると、シクロスポリン A の  $IC_{50}$  値はサルおよびヒト肝細胞、ならびにサルおよびヒト OATP1B1 (および OATP1B3) の間ではほぼ同等であり、リファンピシンの  $IC_{50}$  値はサルおよびヒト肝細胞、ならびにサルおよびヒト OATP1B1 の間ではほぼ同等であった。したがって、ピタバスタチンはヒトと同様にサル肝細胞へ OATP1B を介して取り込まれることが示唆された。OATP1B3 を介したピタバスタチンの取り込みにおけるリファンピシンの  $IC_{50}$  値はサルとヒトでそれぞれ 7.6 および 0.5  $\mu\text{M}$  であり、種差がある可能性が示唆された (Prueksaritanont et al., 2014)。

薬物代謝酵素の阻害の場合、直接的な阻害作用の他にメカニズムベース阻害とも表現される時間依存的に作用が増強する阻害様式がある。メカニズムベース阻害とは、薬物が代謝酵素により代謝される過程において、反応性の高い中間代謝物が酵素タンパク質と共有結合を形成して代謝機能を不活化させる現象である。メカニズムベース阻害が起きると、新たな酵素が生合成されて代謝機能が回復するまでに時間がかかるため、*in vivo* において長時間にわたり阻害作用が持続する。ヒト OATP1B1 阻害試験において、プローブ基質の取り込みに対するシクロスポリン A の阻害作用は、シクロスポリン A をプローブ基質の添加前に細胞とプレインキュベーションすると時間依存的に増強することが報告されており、臨床におけるシクロスポリン A の重大な薬物相互作用事例の発生と関連する可能性が示唆されている (Amundsen et al., 2010; Shitara et al., 2012)。OATP1B1 は代謝酵素ではないため、プレインキュベーション時に反応性の高い中間代謝物は生成せず、メカニズムベース阻害とは異なる機序で時間依存的な阻害作用の増強が起きていると推察されるが、作用機序の詳細は明らかになっていない。ヒト OATP1B1 における検討にて、シクロスポリン A のプレインキュベーション効果は 0.5~1 時間で最大化されることが報告されている

(Shitara et al., 2012). サル OATP1B1 を用いた検討では、シクロスポリン A を 3 時間プレインキュベーションした際の阻害強度は、1 および 2 時間と比較して大きい傾向があった (Fig. 1-7). したがって、今回の検討では、より明確にプレインキュベーション効果を確認するため、プレインキュベーション時間を 3 時間として  $IC_{50}$  値を算出した. サル OATP1B1 を介したピタバスタチンの取り込みに対するシクロスポリン A の  $IC_{50}$  値は 3 時間のプレインキュベーション処理で 0.62 から 0.027  $\mu\text{M}$  へ低下した (Fig. 1-8 および Table 1-4). ヒト OATP1B1 を介したピタバスタチンの取り込みに対するシクロスポリン A の  $IC_{50}$  値は 1 時間のプレインキュベーション処理で 0.102 から 0.026  $\mu\text{M}$  へ低下することが報告されており (Izumi et al., 2015), プレインキュベーション時間は異なるものの、プレインキュベーション処理後の  $IC_{50}$  値は近似した.

ヒト OATP1B1 の検討において、シクロスポリン A とは異なり、リファンピシンの阻害作用は、リファンピシンをプローブ基質の添加前に細胞と 0.5 時間プレインキュベーションしても影響は無いことが報告されている (Shitara et al., 2013). OATP1B1 に対するリファンピシンの阻害作用には、プレインキュベーション効果が認められなかった点でサルはヒトと同等であった.

以上の結果からサル肝細胞へのピタバスタチンの取り込みにはヒトと同様に OATP1B が主に寄与しており、OATP1B1 および OATP1B3 に対する阻害プロファイルは、プレインキュベーション効果を含め、サルとヒトで類似していることが明らかとなった.

サル *OATP1B1* の遺伝子多型の種類および頻度を検討したところ、サルのチトクロム P450 の遺伝子多型の報告と同様に (Uno et al., 2018), カニクイザルとアカゲザルとの間で遺伝子多型の分布に差異があること、カニクイザルの産地間で遺伝子多型の分布に差異があることが明らかとなった (Table 1-5). 今回同定されたサル *OATP1B1* の遺伝子多型は、ヒト *OATP1B1* c.1000A>T (機能変化に関する情報は無い) を除き、ヒト *OATP1B1* の遺伝子多型と同じアミノ酸残基に相当する遺伝子多型は無かった (Niemi et al., 2011). 本研究では一つの遺伝子中に複数の変異位置を有する遺伝子多型 (ハプロタイプ) は見出されな

かった。

ヒト *OATP1B1* の遺伝子多型のうち、*in vivo* 経口クリアランスの明らかな低下（経口投与後の血漿中濃度の明らかな上昇）を示すものとして *OATP1B1*\*5 (c.521T>C, V174A) および *OATP1B1*\*15 (c.388A>G および c.521T>C, それぞれ N130D および V174A) が報告されている (Niemi et al., 2011). さらに、ヒト *OATP1B1*\*5 および *OATP1B1*\*15 発現細胞へのプラバスタチンおよびアトルバスタチンの取り込みは野生型の 50%以下であり、 $K_m$  値が高くもしくは同等、 $V_{max}$  値が低く、 $V_{max}/K_m$  値が約 20%まで低下することが報告されている (Kameyama et al., 2005). 今回見出されたサル *OATP1B1* の遺伝子多型のうち、最も低いピタバスタチンの取り込みを示す多型でも野生型の 92%であり、 $V_{max}/K_m$  値が 91%であった (Fig. 1-9 および Table 1-6). したがって、本研究で見出されたいずれの遺伝子多型を有するサル個体においても、*OATP1B1* 基質を経口投与後の薬物動態は野生型の個体と比較して *OATP1B1* の著しい機能低下に伴う顕著な血漿中濃度の上昇は示さないと推察された。

しかしながら、それぞれの遺伝子多型を有するサル *OATP1B1* 発現細胞間でピタバスタチンの取り込みが 92%~159%、 $V_{max}/K_m$  値が 91%~161%であり、一定の差異が認められたため、*in vivo* で *OATP1B1* 基質を経口投与後の血漿中濃度の個体差の原因になる可能性があることに留意する必要がある。特に、アカゲザルで見出された c.1000A>G および c.2003C>A は高いピタバスタチンの取り込み（それぞれ野生型の 152%および 159%）を示し、高い  $V_{max}/K_m$  値（それぞれ野生型の 155%および 161%）を示した。すなわち、これらの *OATP1B1* 遺伝子多型は基質の取り込み活性が高く、*in vivo* で *OATP1B1* 基質を経口投与後の血漿中濃度が野生型の個体と比較して低値を示す可能性が示唆された。

## 第5節 小括

サル肝細胞および組換えタンパク質発現細胞を用いたサル OATP1B の機能評価を行った。サル肝臓における mRNA 発現量は、ヒトでの報告と同様に、OATP1B1 が最も高く、次に OATP1B3 であり、これらの発現量は OATP2B1 より顕著に高かった。OATP1B1 および OATP1B3 の 4 つの典型的基質を含む 11 化合物の取り込み活性を調査したところ、対応するヒト OATP1B とサル OATP1B の基質認識性は概ね同等であった。OATP1B1 および OATP1B3 の阻害プロファイルをピタバスタチンをプローブ基質に用いて検討した結果、シクロスポリン A およびリファンピシンの阻害強度およびそのプレインキュベーション効果を含め、サルとヒトで類似していることも明らかとなった。したがって、ピタバスタチンをプローブ基質に用いて評価することの妥当性、および OATP1B 阻害評価モデルとしてサルの有用性が示唆された。サルにおいても、*OATP1B1* 遺伝子に 16 の非同義置換を伴う遺伝子多型を見出した。これら組換えタンパク質の機能変化を *in vitro* で解析したところ、顕著な機能低下を伴う遺伝子多型は認められなかった。したがって、サル個体を用いた *in vivo* 薬物相互作用試験を実施するにあたり、*OATP1B1* 遺伝子多型を予め判定する必要性は低いことが示唆された。

## 第 II 章 サル個体を用いた *in vivo* 肝 OATP1B を介する薬物相互作用試験

### 第 1 節 緒言

これまで、OATP1B を介する相互作用のリスク評価法としては、ヒト由来肝細胞や OATP1B 発現細胞を用いた *in vitro* 試験系が報告されている (Giacomini et al., 2010; Vaidyanathan et al., 2016). しかしながら、既法は、いずれも阻害ポテンシャルの評価に留まっており、被相互作用薬の血中濃度がどの程度変動するかを定量的に評価することは困難である。一方、代表的な薬物代謝酵素であるチトクロム P450 の阻害に基づくリスクは、OATP1B 阻害リスクと同様の直接的な阻害のポテンシャル評価の他に、時間依存的な阻害および酵素誘導を加味した予測モデル式や、生理学的薬物速度論モデルに基づく高次の評価方法も日米欧の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案に記載されており、非臨床段階での阻害リスクの定量的評価法が進歩しつつある。チトクロム P450 の阻害リスク評価方法がトランスポーターのそれに比べて進歩している要因の一つとして、代謝酵素の場合には入手が容易な細胞分画を用いた試験が可能であり、現在までに多くの知見が集まっていることが挙げられる。一方、トランスポーターの阻害リスク評価には生細胞を用いる必要があり、受動拡散を含む細胞への薬物の取り込み量を評価する必要があるため煩雑である。さらに、トランスポーターを介する相互作用においては、時間依存的な阻害（プレインキュベーション効果）のメカニズムが未解明であることも、定量的な評価を困難にしている原因と推察される。このような現状を打開する方法の一つは、適切な動物モデルを用いた *in vivo* での評価であると考えられる。

近年、サル個体を用い、プローブ基質としてロスバスタチンを選択し *in vivo* で OATP1B 阻害を評価した事例が報告された (Shen et al., 2013). しかしながら、この報告はロスバスタチンおよび OATP1B 阻害薬をどちらも経口投与にて併用した場合のみ実施されている。経口投与された被相互作用薬であるロスバスタチンは、併用薬（作用薬）がもたらす消化

管を介した吸収の変化および／もしくは肝臓を介した消失の変化に伴い、その薬物動態が変化しうる。したがって、ロスバスタチンおよび OATP1B 阻害薬をどちらも経口投与にて併用後のロスバスタチンの薬物動態変化に占める肝臓の寄与がどの程度かは不明である。

肝 OATP1B 阻害による被相互作用薬の AUC 上昇率を簡易的に予測する方法として R 値が日米欧の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案に記載されており、阻害ポテンシャルの評価指標に用いられている。R 値を用いた評価方法は経口投与後の阻害薬が肝臓入口の血液に長時間、理論的最高濃度が維持される仮定をしており、静的モデルとも言われている。より確かに実際の薬物相互作用を解析するため、肝臓入口の阻害薬濃度の時間の経過を予測する方法が報告されている (Amundsen et al., 2010)。

以上の背景から、本章では被相互作用薬（プローブ基質）を消化管を介さない静脈内投与での相互作用試験を実施し、別に実施した経口投与での相互作用試験におけるプローブ基質の薬物動態変化に占める肝臓での寄与を明らかにした。なお、本章においてプローブ基質は、第 I 章の結果から、報告されているロスバスタチンと同様にサル個体を用いた OATP1B 阻害評価に使用可能であると示唆されたピタバスタチンを用いた。本章で用いる阻害薬には第 I 章の結果から OATP1B 阻害強度およびそのプレインキュベーション効果を含めサルとヒトで類似していることが示されたシクロスポリン A およびリファンピシンを用いた。OATP1B の阻害強度に時間依存性があるシクロスポリン A について、プレインキュベーション処理による  $IC_{50}$  値の変化が R 値に及ぼす影響を明らかにした。加えて、シクロスポリン A の肝臓入口の血液中濃度-時間推移を予測し、プレインキュベーション処理による  $IC_{50}$  値の変化が OATP1B 阻害率に及ぼす影響の時間的推移を解析することにより、*in vivo* で観測された AUC 上昇率をどちらの  $IC_{50}$  がより反映しているかを明らかにした。

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### II-2-i 試薬

ピタバスタチンは第 I 章で使用したものをを用いた。サルへ投与したシクロスポリン A (Neoral<sup>®</sup> Oral Solution) は Novartis Pharma (Basel, Switzerland) から購入した。分析に用いたシクロスポリン A は Sigma-Aldrich から購入し、シクロスポリン A の分析の内部標準物質として使用したシクロスポリン D は Toronto Research Chemicals から購入した。その他の試薬は市販品の分析グレードのものを使用した。

### II-2-ii 動物

動物実験は株式会社新日本科学にて動物倫理委員会の承認を得て実施した。サル (雄, 4~6 kg) は Guangxi Grandforest Science Primate Company (Guangxi, China) から入手した。サルは 12 時間の明暗周期で温度と湿度を制御した室内に収容した。動物には標準的な動物用飼料 (HF Primate 5K91 12G 5K9; Purina Mills, Vandalia, IL) を与え、投与前の一晚を除いて食物を自由摂取させた。一晚絶食させた場合は 4 時間の血液サンプルを採取した後に食物を与えた。

### II-2-iii 動物実験

ピタバスタチンの静脈内および経口投与液はそれぞれ生理食塩水および 0.5% (w/v) ヒドロキシプロピルセルロース水溶液を用いて調製した。シクロスポリン A の経口投与液は Neoral<sup>®</sup> Oral Solution (100 mg/mL) を用いた。リファンピシンの経口投与液は 10% (v/v) 0.1 M 塩酸生理食塩水で調製した。4 例にピタバスタチン 0.1, 0.3 mg/kg の静脈内投与, および 0.3 mg/kg の経口投与を各々 1 週間以上の休薬期間を設けて実施し, ピタバスタチンを単独投与後のベースラインの血漿中濃度推移を得た。サルへのピタバスタチンの経口投与用量は臨床用量でのヒトの血漿中濃度と同程度になるようにした (Hasunuma et al., 2003)。シク

ロスפורリン A を 75 mg/kg 経口投与した 4 時間後および 1 時間後、ピタバスタチンを 0.3 mg/kg それぞれ静脈内および経口投与した。リファンピシンも同様に、20 mg/kg 経口投与した 4 時間後および 1 時間後、ピタバスタチンを 0.3 mg/kg それぞれ静脈内および経口投与した。シクロスポリン A 投与の 2 週間後にピタバスタチンを単独経口投与し、ピタバスタチンの薬物動態パラメータがほぼベースラインレベルに戻ることを確認した。したがって、シクロスポリン A もしくはリファンピシンを投与後、動物を次の実験に使用する前に少なくとも 2 週間の休薬期間を設けた。すべての試験において、ピタバスタチン投与前、および投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 96, および 120 時間に大腿静脈からヘパリンを含むシリンジにて血液を採取した。ピタバスタチンを静脈内投与した場合は投与後 5 分にも採血した。血液の一部を分取し、シクロスポリン A の分析まで凍結保存した。血液の一部を遠心分離して血漿を分取し、ピタバスタチンの分析まで凍結保存した。ピタバスタチンを 0.3 mg/kg 単独静脈内投与後、氷上で 24 時間尿を採取した。採取した尿量を測定し、ピタバスタチンの分析まで尿を凍結保存した。

#### II-2-iv 分析法

血漿または尿試料中のピタバスタチン濃度の測定は次のように行った。血漿試料 100  $\mu$ L または尿試料 150  $\mu$ L に 50% (v/v) アセトニトリル水溶液 10  $\mu$ L および内標準溶液 (20 ng/mL アトルバスタチン含有アセトニトリル) 500  $\mu$ L を添加した。遠心分離後、上清 100  $\mu$ L を 10 mM ギ酸アンモニウム溶液 (pH 3.0) 100  $\mu$ L に添加した。ピタバスタチン濃度は LC10A クロマトグラフィーシステム (島津) および API3000 質量分析計 (サイエックス) を用いて測定した。移動相は 10 mM ギ酸アンモニウム pH 3.0 (A) およびアセトニトリル (B) を用い、CAPCELL PAK C18 MGII カラム (2.0  $\times$  150 mm, 粒径 5.0  $\mu$ m, 資生堂) を用いて逆相クロマトグラフィーにて分離した。カラム温度は 40  $^{\circ}$ C に保った。血漿試料分析の LC 条件を次に示した。85% B, 0.2 mL/min (0.0 - 4.0 min)  $\rightarrow$  100% B, 0.4 mL/min (4.0-6.0 min)  $\rightarrow$  85% B, 0.4 mL/min (6.0-8.0 min)。尿試料分析の LC グラジエント条件を次に示した。



流速は 0.4 mL/min で実施した。40% B (0.0-1.0 min) → 40%-75% B (1.0-7.0 min) → 100% B (7.0-10.0 min)。質量分析計はエレクトロスプレーイオン化後、multiple reaction monitoring 法で分析した。内標準物質に対するピタバスタチンのピーク面積比を測定した。

血液試料中のシクロスポリン A 濃度の測定は次のように行った。血液試料 30  $\mu$ L にメタノール/アセトニトリル (1:1, v/v) 30  $\mu$ L, 超純水 150  $\mu$ L, 0.1 M 硫酸亜鉛水溶液 150  $\mu$ L を添加した。十分に混合した後、内部標準溶液 (20 ng/mL シクロスポリン D 含有アセトニトリル) 300  $\mu$ L を添加した。遠心分離後、上清 40  $\mu$ L に超純水/メタノール/アセトニトリル (2:1:1, v/v/v) 200  $\mu$ L を添加した。シクロスポリン A は LC10A クロマトグラフィシステム (島津) および API4000 質量分析計 (サイエックス) を用いて測定した。移動相は 10 mM ギ酸アンモニウム pH 3.0 (A) およびメタノール (B) を用い、CP ChromSphera カラム (2.0  $\times$  150 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて逆相クロマトグラフィにて分離した。カラム温度は 65  $^{\circ}$ C に保ち、流速は 0.8 mL/min で実施した。LC グラジェント条件を次に示した。30% B (0.0-1.5 min) → 70% B (1.5-2.0 min) → 70%-97% B (2.0-2.1 min) → 97% B (2.1-3.5 min) → 97%-30% B (3.5-3.6 min) → 30% B (3.6-4.5 min)。質量分析計はエレクトロスプレーイオン化後、multiple reaction monitoring 法で分析した。内標準物質に対するシクロスポリン A のピーク面積比を測定した。

## II-2-v データ解析

最高血漿中濃度 ( $C_{\max}$ ) および最高血漿中濃度に達するまでの時間 ( $T_{\max}$ ) は測定結果から直接得た。消失速度定数 ( $k_{el}$ ) の推定は最終の 3 または 4 時点の濃度の対数線形回帰により算出した。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は 2-1 式を用いて算出した。

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_{el}} \quad \dots (2-1)$$

血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC$ ) は最後に測定可能な濃度まで台形則を用いて算出し、特に記載しない場合  $k_{el}$  値を用いて無限大に外挿した。全身血漿クリアランス ( $CL_{total}$ ) は静脈内投与量を静脈内投与後の  $AUC$  ( $AUC_{i.v.}$ ) で除した。静脈内投与では血漿中濃度推移の 1 次モーメントとして平均滞留時間 ( $MRT$ ) を定義し、定常状態分布容積 ( $V_{ss}$ ) は 2-2 式を用いて算出した。

$$V_{SS} = MRT \cdot CL_{total} \quad \dots (2-2)$$

バイオアベイラビリティ ( $F$ ) は  $0.3 \text{ mg/kg}$  を経口投与後の  $AUC$  ( $AUC_{p.o.}$ ) を  $0.3 \text{ mg/kg}$  を静脈内投与後の  $AUC_{i.v.}$  で除した。ピタバスタチンの全身血漿クリアランスに対する尿中排泄の寄与は無視できる程度であったため、肝クリアランスは全身血漿クリアランスに等しいと示唆された。肝抽出率 ( $E_H$ ) と肝アベイラビリティ ( $F_H$ ) をそれぞれ 2-3 および 2-4 式を用いて推定した。

$$E_H = \frac{CL_{total}}{R_B \cdot Q_H} \quad \dots (2-3)$$

$$F_H = 1 - E_H \quad \dots (2-4)$$

$R_B$  は血液/血漿濃度比であり  $0.74$  を用い (医薬品医療機器総合機構, [http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu\\_tenpu\\_base.html](http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)),  $Q_H$  は肝血流量でありサルは  $2640 \text{ mL/h/kg}$  を用いた (Hosea et al., 2009)。経口投与後のバイオアベイラビリティは吸収率 ( $F_A$ )、消化管初回代謝回避率 ( $F_G$ )、および  $F_H$  の積あり、2-5 式で表される。

$$F = F_A \cdot F_G \cdot F_H \quad \dots (2-5)$$

被相互作用薬の薬物動態学的相互作用の大きさは  $AUC$  比 ( $AUC'/AUC$ ,  $AUC'$ は併用薬投与時の  $AUC$ ) で表される。被相互作用の  $AUC$  比について、被相互作用の投与量 ( $Dose$ ) が同じであり、経口投与の場合は 2-6 式で表される。

$$\frac{AUC_{p.o.}'}{AUC_{p.o.}} = \frac{Dose' \cdot F_A' \cdot F_G' \cdot F_H'}{CL_{total}'} \times \frac{CL_{total}}{Dose \cdot F_A \cdot F_G \cdot F_H} = \frac{F_A'}{F_A} \cdot \frac{F_G'}{F_G} \cdot \frac{F_H'}{F_H} \cdot \frac{CL_{total}}{CL_{total}'} \quad \dots (2-6)$$

この式に基づいて、経口投与された被相互作用薬（プローブ基質）の  $AUC$  比に対する肝臓の寄与分の推定値を得るために、 $(F_H'/F_H) \cdot (CL_{total}/CL_{total}')$  の値を計算した。

#### II-2-vi 静的モデルによる薬物動態学的相互作用の評価

薬物動態学的相互作用の強度を評価するため静的モデルである  $R$  値を用いた。 $R$  値の算出方法を次に示した。

$$R = 1 + \frac{I_{u,inlet,max}}{K_i} \quad \dots (2-7)$$

$$I_{u,inlet,max} = \left( I_{max} + \frac{F_A \cdot F_G \cdot k_a \cdot Dose}{Q_H} \right) \cdot f_{uB} \quad \dots (2-8)$$

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \dots (2-9)$$

$I_{u, inlet, max}$  は肝臓入口の血液における推定最高非結合型阻害薬濃度、 $I_{max}$  は最高循環血中阻害薬濃度、 $k_a$  は吸収速度定数、 $Q_H$  は肝血流量（サルおよびヒトでそれぞれ 2640 および 1200 mL/h/kg）(Hosea et al., 2009)、 $f_{uB}$  は血中非結合型分率を表す。 $K_i$  は阻害定数を表し、競合

阻害と仮定した (Shitara et al., 2012). 後述する今回の検討結果より, サルではシクロスポリン A の  $I_{\max}$  は 921 ng/mL,  $k_a$  は  $0.67 \text{ h}^{-1}$ , ラグタイムは 0.92 h であった (Phoenix WinNonlin 6.3, PK model 4). シクロスポリン A のサルの  $f_{uB}$  はシクロスポリン A の血漿非結合型分率 0.029 (Tsukimoto et al., 2015) を  $R_B$  2.3 (社内データ) で除して算出した. シクロスポリン A のサルにおける  $F_A \cdot F_G$  は報告されているシクロスポリン A の静脈内および経口投与後の薬物動態学的パラメータを用いて算出し, 0.338 であった (Tsukimoto et al., 2015). また, ヒトにおいても R 値を算出するため以前に報告された薬物動態プロファイルを用いた (Amundsen et al., 2010; Hasunuma et al., 2003). シクロスポリン A のヒトにおける  $I_{\max}$  は 938 ng/mL,  $F_A \cdot F_G$  は 0.30,  $k_a$  は  $1.28 \text{ h}^{-1}$ , 用量は 2 mg/kg,  $f_{uB}$  はシクロスポリン A の血漿非結合型分率 0.038 を血液/血漿濃度比 1.58 で除して算出した.

## II-2-vii OATP1B1 阻害率の時間推移

トランスポーターの阻害率は次の式で表される.

$$\text{Fraction inhibited} = 1 - \frac{K_i}{K_i + I} \quad \dots (2-10)$$

$I$  はトランスポーター発現部位における阻害薬濃度を表す. 今回の検討の場合,  $I$  は肝臓入口におけるシクロスポリン A の非結合型血中濃度とした. 肝臓入口の血液における非結合型濃度の時間変化を 2-11 式で推定し (Amundsen et al., 2010), プレインキュベーション処理の有無によるそれぞれの  $K_i$  値を用いて OATP1B1 阻害率の時間推移を検討した.

$$C_{u,\text{inlet}}(t) = \left\{ C(t) + \frac{F_A \cdot F_G \cdot k_a \cdot (\text{Dose} \cdot e^{-k_a \cdot t})}{Q_H} \right\} \cdot f_{uB} \quad \dots (2-11)$$

$C$  は循環血中濃度を表す.

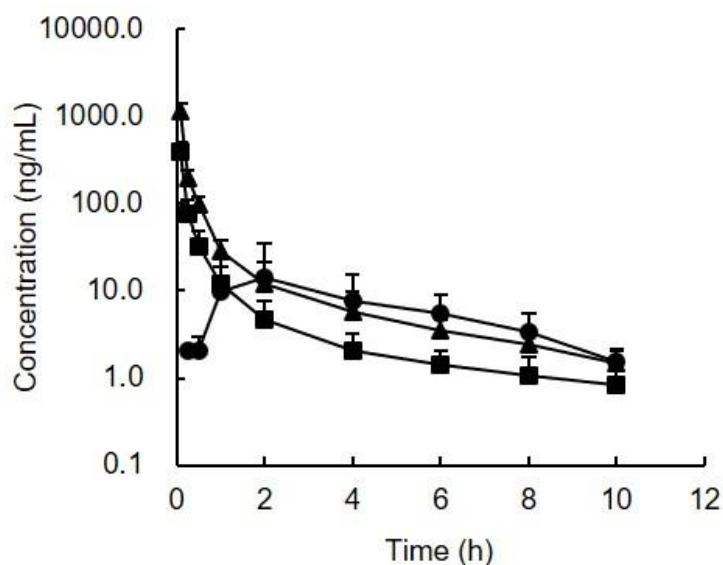
## II-2-viii 統計学的解析

薬物動態パラメータは  $T_{\max}$  を除き統計解析前に対数変換した。統計的検定は全て SAS ソフトウェアバージョン 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて実施した。薬物動態パラメータの統計学的有意差はスチューデントの  $t$  検定を実施した。有意差の水準は  $p$  値 $<0.05$  とした。

## 第3節 結果

### II-3-i サルにおけるピタバスタチンの薬物動態

サルにピタバスタチンを静脈内および経口投与後の血漿中濃度を測定し、薬物動態パラメータを算出した (Fig. 2-1 および Table 2-1)。0.1 および 0.3 mg/kg を静脈内投与後の全身血漿クリアランス ( $CL_{\text{total}}$ ) に用量依存性は無かった。ピタバスタチン 0.3 mg/kg を静脈内投与後の未変化体の尿中排泄率は投与量に対して僅かであり、ピタバスタチンの主要な消失経路は肝臓を介することが示唆された。したがって、ピタバスタチンの肝クリアランスは今回の投与量の範囲で線形であることが示唆された。さらに、全身血漿クリアランスは報告されているサルの肝血流量 (2640 mL/h/kg) (Hosea et al., 2009) と比較して半分以下であるため、肝クリアランスは低かった。一方、ピタバスタチン 0.3 mg/kg を経口投与後のバイオアベイラビリティは低く、消化管アベイラビリティ ( $F_A \cdot F_G$ ) は低かった。ヒトにおいてピタバスタチンを 2 mg 経口投与後の最高血漿中濃度および  $AUC$  はそれぞれ 27.6 ng/mL および 76.9 ng · h/mL と報告されている (Hasunuma et al., 2003)。サルへの投与量はヒトより多いものの、ピタバスタチンを経口投与後の最高血漿中濃度および  $AUC$  は同程度であった。



**Fig. 2-1.** Plasma concentration–time profiles of pitavastatin after single intravenous (■, 0.1 mg/kg; ▲, 0.3 mg/kg) and oral (●, 0.3 mg/kg) administration to male cynomolgus monkeys. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=4).

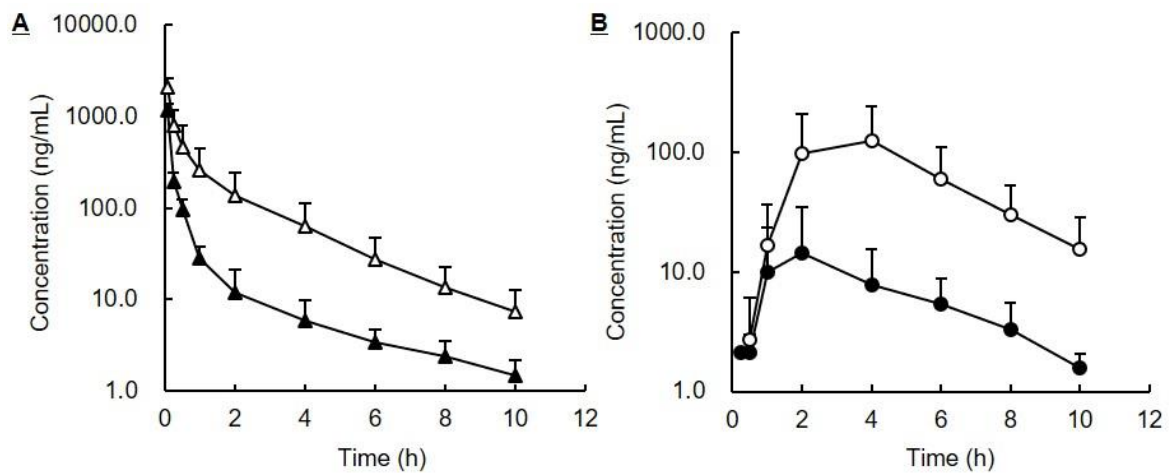
**Table 2-1.** Pharmacokinetic parameters of pitavastatin after single intravenous and oral administration to male cynomolgus monkeys.

		Pitavastatin, i.v. 0.1 mg/kg	Pitavastatin, i.v. 0.3 mg/kg	Pitavastatin, p.o. 0.3 mg/kg
$CL_{total}$	(mL/h/kg)	753 $\pm$ 256	756 $\pm$ 156	
$V_{ss}$	(mL/kg)	864 $\pm$ 484	607 $\pm$ 169	
$t_{1/2}$	(h)	4.1 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.6
$C_{max}$	(ng/mL)			15.0 $\pm$ 19.7
$T_{max}$	(h)			2.3 $\pm$ 1.3
$AUC$	(ng·h/mL)	145 $\pm$ 48	412 $\pm$ 100	72 $\pm$ 70
$f_e$			0.026 $\pm$ 0.012	
$F$				0.16 $\pm$ 0.11
$F_H$				0.62 $\pm$ 0.08
$F_A \cdot F_G$				0.24 $\pm$ 0.13

Each value represents the mean $\pm$ SD (n=4). The  $f_e$  is the urinary excretion rate of unchanged drug.

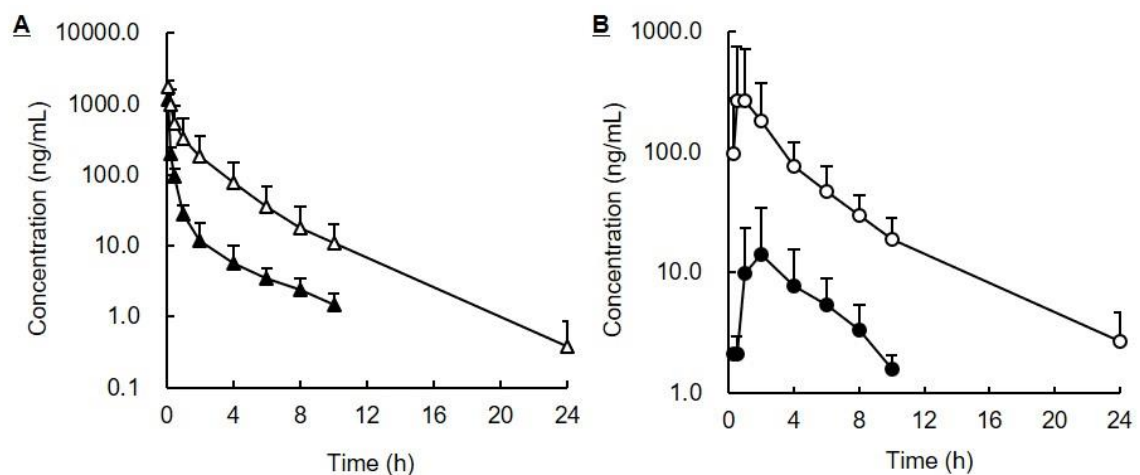
### II-3-ii サルにおけるピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A とリファンピシンの影響

サルに静脈内および経口投与後のピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A およびリファンピシンの影響を検討した (Fig. 2-2, 2-3, および Table 2-2). 静脈内投与後のピタバスタチンの全身血漿クリアランス ( $CL_{total}$ ) はシクロスポリン A およびリファンピシンとの併用でそれぞれ 67%および 68%有意に減少した. したがってシクロスポリン A およびリファンピシンとの併用でピタバスタチンの肝クリアランスが低下したことが示唆された. ピタバスタチンの分布容積 ( $V_{ss}$ ) はシクロスポリン A およびリファンピシンの併用でそれぞれ 31%および 30%減少したが有意差は認められなかった. 静脈内投与後のピタバスタチンの半減期はシクロスポリン A およびリファンピシンの併用で有意な変化は認められなかった. 経口投与後のピタバスタチンの最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) はシクロスポリン A およびリファンピシンとの併用でそれぞれ 13.1 倍および 18.2 倍有意に上昇した. ピタバスタチンの  $AUC$  はシクロスポリン A およびリファンピシンとの併用でそれぞれ 10.6 倍および 14.8 倍有意に上昇した. 消化管を介さない静脈内投与時の相互作用試験の結果を利用して, 経口投与時のピタバスタチンの  $AUC$  上昇率 (2-6 式) を肝アベイラビリティの変化率と肝クリアランスの変化率の逆数の積で表される肝臓での寄与 ( $F_H'/F_H$ )・( $CL_{total}/CL_{total}'$ ) のみに分離評価すると, シクロスポリン A およびリファンピシンの併用時のピタバスタチンの  $AUC$  上昇率はそれぞれ 4.5 倍分および 5.0 倍分であった. すなわち, ピタバスタチンの最高血漿中濃度および  $AUC$  の上昇はシクロスポリン A およびリファンピシン存在下での吸収率および/または消化管代謝回避率の上昇によることも示唆された. シクロスポリン A を投与した 2 週間後にピタバスタチンを単独経口投与したところ, 最高血漿中濃度および  $AUC_{p.o.}$  はそれぞれ 13.5 ng/mL および 60.0 ng・h/mL であり, シクロスポリン A の併用試験前に実施したピタバスタチンを単独経口投与時の値に戻った.



**Fig. 2-2. Effects of cyclosporine A (75 mg/kg, p.o.) on the plasma concentration–time profiles of pitavastatin after intravenous (A: ▲, control; △, with cyclosporine A) and oral (B: ●, control; ○, with cyclosporine A) administration to male cynomolgus monkeys at a dose of 0.3 mg/kg.**

Cyclosporine A was administered 4 h and 1 h before intravenous and oral administration of pitavastatin, respectively. The same data as those in Fig. 2-1 are represented for the plasma concentrations for the control. Each point represents the mean ± SD (n=4).



**Fig. 2-3. Effects of rifampicin (20 mg/kg, p.o.) on the plasma concentration–time profiles of pitavastatin after intravenous (A: ▲, control; △, with rifampicin) and oral (B: ●, control; ○, with rifampicin) administration to male cynomolgus monkeys at a dose of 0.3 mg/kg.**

Rifampicin was administered 4 h and 1 h before intravenous and oral administration of pitavastatin, respectively. The same data as those in Fig. 2-1 are represented for the plasma concentrations for the control. Each point represents the mean ± SD (n=4).



**Table 2-2. Pharmacokinetic parameters of pitavastatin (0.3 mg/kg) after single intravenous and oral administration to male cynomolgus monkeys in combination with cyclosporine A and rifampicin.**

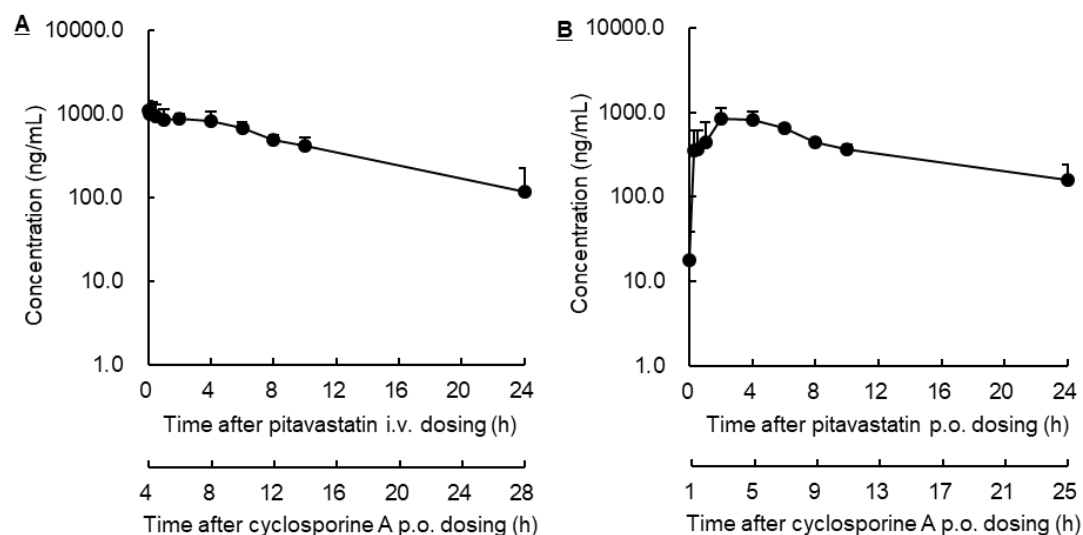
	Control		Cyclosporine A, p.o.		Rifampicin, p.o.	
	Pitavastatin		Pitavastatin		Pitavastatin	
	i.v.	p.o.	i.v.	p.o.	i.v.	p.o.
$CL_{total}$ (mL/h/kg)	756 ± 156		258 ± 104**		249 ± 109**	
$V_{ss}$ (mL/kg)	607 ± 169		388 ± 179		431 ± 181	
$t_{1/2}$ (h)	3.4 ± 0.6	2.5 ± 0.6	2.4 ± 0.8	3.2 ± 1.3	2.7 ± 0.9	4.5 ± 1.2*
$C_{max}$ (ng/mL)		15.0 ± 19.7		135 ± 113**		314 ± 456***
$T_{max}$ (h)		2.3 ± 1.3		4.0 ± 1.6		1.9 ± 1.5
$AUC$ (ng·h/mL)	412 ± 48	72 ± 70	1394 ± 776**	725 ± 651***	1578 ± 1151**	1089 ± 1129***
$F_H$		0.62 ± 0.08		0.87 ± 0.05**		0.88 ± 0.05**
$AUC_{p.o.}' / AUC_{p.o.}$				10.6 ± 1.4		14.8 ± 2.4
$CL_{total}' / CL_{total}$			3.2 ± 0.9		3.6 ± 1.6	
$F_H' / F_H$				1.4 ± 0.1		1.4 ± 0.1
$(F_H' / F_H) \cdot (CL_{total}' / CL_{total})$				4.5 ± 1.1		5.0 ± 2.0

Each value represents the mean ± SD (n=4). Cyclosporine A or rifampicin was administered 4 h and 1 h before intravenous and oral administration of pitavastatin, respectively.  $AUC'$ ,  $CL_{total}'$ , and  $F_H'$  refer to the parameters in the presence of a perpetrator. \* $p < 0.05$ , compared with the control values obtained before cyclosporine A or rifampicin treatment; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

### II-3-iii サルにおけるシクロスポリン A の薬物動態

サルにシクロスポリン A を経口投与後の血中濃度-時間プロファイルを示す (Fig. 2-4). ピタバスタチンを静脈内および経口投与した際に併用したシクロスポリン A の最高血漿中濃度は、それぞれ 1154 および 921 ng/mL であった。ヒトにおけるピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A の影響が報告されている (Hasunuma et al., 2003). その際のシクロスポリン A の血中濃度と今回の試験での血中濃度を比較するため、ピタバスタチンを静脈内および経口投与後 4 時間までのシクロスポリン A の  $AUC_{0-4h}$  を算出したところ、それぞれ 3526 ng · h/mL および 2646 ng · h/mL であった。ヒトにシクロスポリン A

を 2 mg/kg 経口投与後の最高血漿中濃度および  $AUC_{0\sim 4h}$  はそれぞれ 938 ng/mL および 2008 ng · h/mL であった。



**Fig. 2-4. Blood concentration–time profiles of cyclosporine A after oral administration to male cynomolgus monkeys in combination with intravenous (A) and oral (B) administration of pitavastatin.**

Cyclosporine A was administered 4 h and 1 h before intravenous and oral administration of pitavastatin, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n=4).

#### II-3-iv 静的モデルによる薬物動態学的相互作用の評価

OATP1B の阻害強度に時間依存性があるシクロスポリン A について、プレインキュベーション処理による  $IC_{50}$  値が R 値に及ぼす影響を検討した (Table 2-3). シクロスポリン A でプレインキュベーション処理をせずに得た  $IC_{50}$  から算出した  $K_i$  値を用いるとその R 値は 1.1 であり, 実際のサル *in vivo* 薬物相互作用試験での  $AUC$  上昇率 10.6 および  $AUC$  上昇率における肝臓の寄与分 4.5 を大きく下回った. 一方, シクロスポリン A をプレインキュベーション処理により得た  $IC_{50}$  を用いると R 値はサルで 3.9 であり,  $AUC$  上昇率および  $AUC$  上昇率における肝臓の寄与分をより反映した.

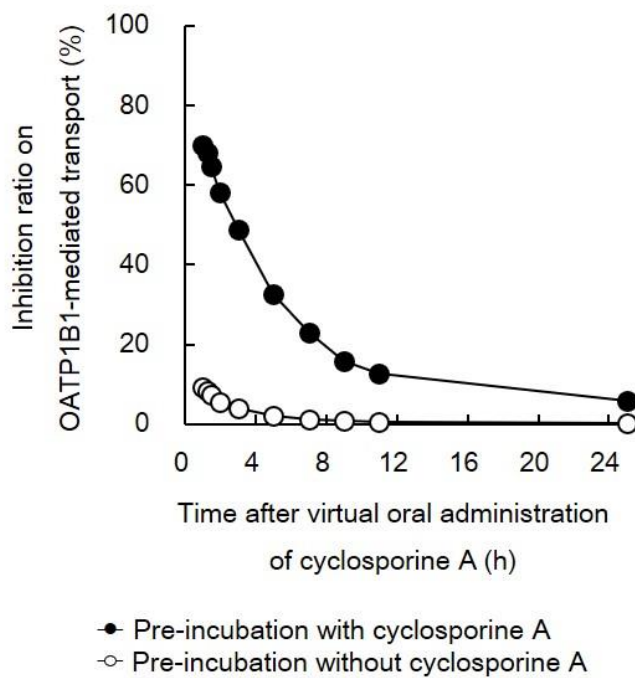
**Table 2-3. The R values of cyclosporine A calculated using the  $K_i$  values for pre-incubation with and without cyclosporine A.**

		$K_i$ , OATP1B1 ( $\mu\text{M}$ )		$I_{u,\text{inlet}, \text{max}}$ ( $\mu\text{M}$ )	R value		Actual pitavastatin AUC ratio (hepatic contribution to the AUC ratio in cynomolgus monkeys
		Pre-incubation without cyclosporine A	Pre-incubation with cyclosporine A		Pre-incubation without cyclosporine A	Pre-incubation with cyclosporine A	
Cyclosporine A	Monkey	0.62	0.027	0.077	1.1	3.9	10.6 (4.5)
	Human	0.098 <sup>a</sup>	0.025 <sup>a</sup>	0.032	1.3	2.7	4.6 (Hasunuma et al., 2003)

The  $K_i$  values and R values were calculated by Equations 2-7 to 2-9. <sup>a</sup>  $K_i$  values were calculated using reported  $IC_{50}$  value (0.102 and 0.026  $\mu\text{M}$  for pre-incubation without and with cyclosporine A, respectively),  $K_m$  value of probe substrate (pitavastatin: 2.48  $\mu\text{M}$ ), and probe substrate concentration in  $IC_{50}$  studies (pitavastatin: 0.1  $\mu\text{M}$ ) (Izumi et al., 2015).

### II-3-v OATP1B1 阻害率の時間推移

サルにシクロスポリン A を経口投与後の肝 OATP1B 近傍（肝臓入口の血液）におけるシクロスポリン A の濃度を予測し、OATP1B1 阻害率の時間推移を示した (Fig. 2-5)。サル OATP1B1 を介したピタバスタチン取り込みにおけるシクロスポリン A による最大阻害率は、シクロスポリン A のプレインキュベーション処理をせずに得られた  $IC_{50}$  値を用いると 9.3%と推定されたのに対し、シクロスポリン A のプレインキュベーション処理をして得た  $IC_{50}$  値を用いると 70.2%と推定された。リファンピシンについては経口投与後の肝臓入口の血液中の最高濃度を循環血漿中の最高濃度と仮定し(Ohtsuka et al., 2010)、リファンピシンをプレインキュベーション処理せずに得られた  $IC_{50}$  値を用いて最大阻害率を推定すると 66.8%であった。



**Fig. 2-5. Estimated inhibition ratios of recombinant cynomolgus monkey OATP1B1-mediated pitavastatin transport in the cynomolgus monkey liver as a function of time after oral administration of inhibitor cyclosporine A.**

The inhibition ratios were estimated by Equations 2-10 and 2-11 based on the unbound blood concentration of cyclosporine A at the inlet to the liver and the  $K_i$  value for recombinant cynomolgus monkey OATP1B1-mediated pitavastatin uptake after pre-incubation with and without cyclosporine A. To calculate the equations, the pharmacokinetic parameters of cyclosporine A after oral administration of 75 mg/kg 1 h before oral administration of pitavastatin to male cynomolgus monkeys was used. Each point was estimated from the mean blood concentrations of four monkeys.

#### 第4節 考察

サルにピタバスタチンを静脈内単独投与したところ、ピタバスタチンの腎未変化体排泄率は2.6%であった (Table 2-1)。ヒトへ経口投与後の尿中未変化体排泄率は3.0%と報告されていることから (CDER, 2009)、ヒトと同様に、サルにおいてもピタバスタチンは主に

肝臓に取り込まれ、代謝および／もしくは胆汁排泄されることが示唆された。したがって、全身血漿クリアランスは肝クリアランスにほぼ等しいと示唆された。肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝試験において、サルにおける酸化および抱合の固有クリアランスはヒトと比較してそれぞれ 5.2 倍および 11.2 倍高かった (Uno et al., 2007)。しかしながら、サルおよびヒト肝細胞を用いた検討により、いずれの種においても、肝クリアランスは肝取り込みクリアランスを反映していることが示唆されている (de Bruyn et al., 2018; Watanabe et al., 2010)。加えて、サルおよびヒトの *in vivo* のピタバスタチン全身血漿クリアランスはそれぞれ 756 および 409.5 mL/h/kg であり(ヒトの全身血漿クリアランスは体重 60 kg 換算)、肝血流速度はそれぞれ 2640 および 1200 mL/h/kg であり、肝血流速度と比較していずれの種でも低値であったことから、ピタバスタチンの血漿からの消失速度は血漿から肝臓への取り込みクリアランスに依存していることが示唆された (CDER, 2009; Hosea et al., 2009)。

ピタバスタチンをサルへ経口投与後のバイオアベイラビリティは 16%であり、ヒトで報告されている 53%と比較して低かった (CDER, 2009)。サルおよびヒトの肝アベイラビリティはそれぞれ 62%および 70%程度 (CDER, 2009) であり同程度と示唆された。サルにおけるピタバスタチンのバイオアベイラビリティの低さは主に吸収率および／または消化管初回代謝回避率がヒトと比べて低く、その積 (消化管アベイラビリティ,  $F_A \cdot F_G$ ) が 24%と低いことに起因するものと推察された。一方、ヒトのピタバスタチンの消化管アベイラビリティは 80%程度と算出できる (CDER, 2009)。以上の結果から、サルを用いてピタバスタチン経口投与時の *in vivo* 薬物相互作用試験を実施する場合、消化管に起因する相互作用を考慮する重要性が示唆された。ピタバスタチンはヒトにおいて排出型トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), および代謝酵素である CYP2C および UDP-glucuronosyltransferase (UGT) の基質であることが報告されており (Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006; Korzekwa et al., 2012; Uno et al., 2007; Yamada et al., 2003), サルの消化管にこれらトランスポーターのオルソログおよびサル CYP2C の mRNA の発現が報告されて

いる(Nakanishi et al., 2007; Utoh et al., 2012). これら排出型トランスポーターや代謝酵素は、サルにおけるピタバスタチンの消化管アベイラビリティに重要な役割を果たしている可能性がある」と推察された。

経口投与されたプローブ基質の消化管および肝臓における薬物動態学的相互作用の寄与や組織分布の変化を考察するためには消化管を介さない静脈内投与での薬物動態学的相互作用の検討は有用である。本研究ではサルに OATP1B 阻害薬のシクロスポリン A を経口投与 4 時間後に OATP1B プローブ基質のピタバスタチンを静脈内投与し、ピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A の影響を検討した (Fig. 2-2 および Table 2-2)。ピタバスタチンの全身血漿クリアランス ( $CL_{total}$ ) はシクロスポリン A の併用で 67%有意に低下した。ピタバスタチンの血漿からの消失速度は血漿から肝臓への取り込みクリアランスに依存していることが示唆されるため、ピタバスタチンの全身血漿クリアランスの低下はシクロスポリン A によるピタバスタチンの肝臓への取り込み阻害作用を反映していると示唆された。加えて、シクロスポリン A と併用した際にピタバスタチンの全身血漿クリアランスが低下し、血漿中消失半減期は変化しなかった。これらの結果から、次の式に従うとピタバスタチンの分布容積 ( $V$ ) はシクロスポリン A の併用で低下することが示唆された。

$$t_{1/2} = \ln 2 \cdot V / CL_{total}$$

実際、シクロスポリン A の併用でピタバスタチンの定常状態分布容積 ( $V_{ss}$ ) は 31%低下した。ラットで報告されているように (Kimata et al., 1998), ピタバスタチンはサルでも主に肝臓に分布すると考えると、 $V$  および  $V_{ss}$  の減少はシクロスポリン A によるピタバスタチンの肝臓への取り込み阻害作用を反映していると示唆された。

予備検討としてシクロスポリン A を経口投与 1 時間後にピタバスタチンを静脈内投与したところ、ピタバスタチンの血漿中濃度変化はシクロスポリン A を経口投与 4 時間後に投与した場合と比較して小さかった。これは血中シクロスポリン A 濃度がピタバスタチンを静脈内投与後初期の時点では低かったことが示唆され (Fig. 2-4B), 肝臓へのピタバ

タチンの取り込みが部分的にしか阻害されなかった可能性が示唆された。一方、シクロスポリン A を経口投与 4 時間後にピタバスタチンを静脈内投与した場合、血中シクロスポリン A 濃度はピタバスタチンの静脈内投与直後に最高値に達していた (Fig. 2-4A)。したがって、プローブ基質の静脈内投与で薬物動態学的相互作用を検討する際は被験化合物の投与時間を慎重に検討する必要がある。

次に、サルに経口投与後のピタバスタチンの薬物動態に及ぼすシクロスポリン A の影響を検討した。サルにシクロスポリン A を経口投与 1 時間後にピタバスタチンを経口投与したところ、ピタバスタチンの AUC は単独投与に比べて 10.6 倍上昇した。消化管を介さない静脈内投与時の相互作用試験の結果を利用して、肝臓での寄与のみに分離評価すると、観測された AUC 上昇率のうち 4.5 倍分に相当した。ヒトでの薬物相互作用試験において、経口投与後のピタバスタチンの AUC はシクロスポリン A の併用で 4.6 倍上昇した (Hasunuma et al., 2003)。ヒトへピタバスタチンを単独で経口投与後の消化管アベイラビリティは 80%程度であるため、ピタバスタチンの AUC 上昇率は主に肝臓での相互作用 (肝アベイラビリティおよび肝クリアランスの変化) に起因すると示唆される。ヒトでの相互作用試験におけるピタバスタチンの AUC 上昇率 4.6 倍は、サルでの相互作用試験におけるピタバスタチンを経口投与時の AUC 上昇率のうち肝臓での寄与に分離評価した AUC 上昇率 4.5 倍と近似した (Table 2-2)。この近似は、第 I 章で得た *in vitro* での肝 OATP1B 発現細胞および肝細胞へのピタバスタチン取り込みに対するシクロスポリン A の  $IC_{50}$  値がサルとヒトで近似したことと一致した。*In vivo* における今回の試験とヒトの試験でピタバスタチンを経口投与前のシクロスポリン A の投与タイミングは同じであり、両研究間のシクロスポリン A の血中濃度は同等であった点は重要であったと示唆された (Fig. 2-4)。

サルにおいてシクロスポリン A の併用による経口投与後のピタバスタチンの血漿中濃度上昇は肝臓での寄与 ( $(F_H / F_H) \cdot (CL_{total} / CL_{total})$ ) に加えて消化管での寄与を有することが示唆された (Table 2-2)。シクロスポリン A はヒト P-gp, BCRP, MRP2, および CYP2C を阻害することが報告されている (Yoshida et al., 2012)。シクロスポリン A はサル消化管

に発現するこれらの消化酵素や排出型トランスポーターを阻害し、ピタバスタチンの消化管アベイラビリティを上昇させたと示唆された。肝アベイラビリティを算出する際に肝血流速度を用いるため、種々の報告値のいずれを採用するか考慮する必要がある。今回は肝血流速度に 2640 mL/h/kg を用いた。これまでに報告された比較的高い肝血流速度である 3078 mL/h/kg を用いた場合でも  $(F_H'/F_H) \cdot (CL_{total}/CL_{total}')$  の値は 4.2 と算出され (Luttringer et al., 2003), Table 2-2 に示す値と同様であった。

リファンピシンもシクロスポリン A と同様に、サルにピタバスタチンを経口投与時に併用した方が静脈内投与時に併用した場合よりもピタバスタチンの血漿中濃度を上昇させた (Fig. 2-3, Table 2-2)。この時、リファンピシンの併用で静脈内投与時のピタバスタチンの血漿中消失半減期は変化せず、定常状態分布容積が低下した。これらの現象から、シクロスポリン A と同様に、リファンピシンはピタバスタチンの肝臓への取り込みを阻害したことが示唆された。リファンピシンはシクロスポリン A と同様に消化管の排出型トランスポーターや代謝酵素の阻害によって消化管アベイラビリティを上昇させた可能性が示唆された。ヒトでの薬物相互作用試験において、ピタバスタチンを経口投与後の AUC はリファンピシンの併用で 5.7 倍上昇した (Prueksaritanont et al., 2014)。今回のサルを用いた検討にて  $(F_H'/F_H) \cdot (CL_{total}/CL_{total}')$  として推定された AUC 上昇率における肝臓の寄与分は 5.0 倍であり、ヒトにおける薬物相互作用試験で報告されているピタバスタチンの AUC 上昇率である 5.7 倍と近似した。

薬物動態学的相互作用による被相互作用薬の AUC 上昇率を簡易的に予測する方法として R 値が日米欧の薬物相互作用ガイドライン/ガイダンス案に記載されている。R 値を用いた AUC 上昇率の予測方法は静的モデルと言われ、経口投与後の阻害薬が肝臓入口の血液に長時間、理論的最高濃度が維持される仮定であるため、AUC 上昇率の予測を過大評価する可能性がある。しかしながら、シクロスポリン A をプレインキュベーション処理せずに得られた  $IC_{50}$  値から算出した R 値は実際の AUC 上昇率を大きく下回った (Table 2-3)。一方で、シクロスポリン A をプレインキュベーションして得られた  $IC_{50}$  値を用いること

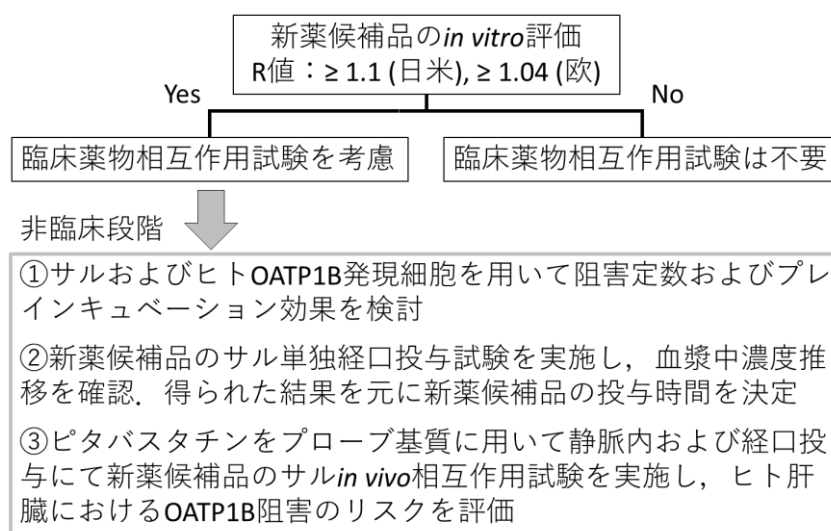


により R 値は実際の AUC 上昇率および AUC 上昇率における肝臓の寄与分に近付いた。本研究の結果は、従来の *in vitro* 試験法にて阻害が弱い化合物でもプレインキュベーション処理をすることにより阻害が強くなり、さらに *in vivo* の検討にて化合物を前投与すると顕著にプローブ基質の血漿中濃度が上昇する可能性があることを示した。以上の結果から、OATP1B 阻害リスクを過小評価しないためには *in vitro* 評価の際に評価化合物のプレインキュベーション効果を検討し、プレインキュベーション処理により阻害強度の増加を示す化合物については、*in vivo* 評価の際にプローブ基質を投与する一定時間前に評価化合物を投与することが有用であると示唆された。

R 値を用いた静的モデルによる予測に加え、OATP1B1 阻害率の時間推移を検討した (Fig. 2-5)。静的モデルとは異なり、本方法では肝臓入口の血液中阻害薬濃度を投与後の時間推移で変動する関数とした。シクロスポリン A のプレインキュベーション処理にて得られた  $IC_{50}$  値に基づく推定の方が、ヒトと同様にプレインキュベーション処理をせずに得られた  $IC_{50}$  値に基づく推定よりも薬物動態学的相互作用をより反映していることが示唆された (Amundsen et al., 2010)。しかし、 $IC_{50}$  値は固定値を用いているため、プレインキュベーション時間で変化する可能性があることに留意する必要がある。将来、より詳細に薬物動態学的相互作用を解明し生理学的メカニズムに基づく薬物速度論モデル (動的モデル) での予測に発展させるため、シクロスポリン A のプレインキュベーション効果のメカニズムの解明が望まれる。

リファンピシンについては一部の薬物動態パラメータが不明であるため R 値の算出はしていないが、サルおよびヒトにおける肝臓入口の血液中の推定最高非結合型阻害薬濃度はそれぞれ循環血液中の最高非結合型阻害薬濃度である 2.4 および 4.6  $\mu\text{M}$  以上であるため (Izumi et al., 2015; Ohtsuka et al., 2010; Shen et al., 2013)、それぞれの OATP1B1 の  $IC_{50}$  値 1.2 および 1.6  $\mu\text{M}$  (Table 1-4) と比較すると R 値は実際の AUC 上昇率を大きく下回ることには認められなかった。

日本および米国の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案はそれぞれ 2018 および 2017 年の改訂にて OATP1B 阻害作用を *in vitro* で評価する際は新薬候補品をプレインキュベーション処理することにより阻害作用の増強効果を加味して評価する旨記載された。しかし、現状は医薬品開発の初期段階において *in vitro* 評価だけでは *in vivo* で起きるヒト肝 OATP1B を介する薬物動態学的相互作用の程度を十分に予測できない。本研究では日米欧の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案に則って新薬候補品を評価し、ヒト肝 OATP1B 阻害リスクがあった場合、Fig. 2-6 に示すフローで評価を進めることを提案する。



**Fig. 2-6 A proposed research flow for evaluation of inhibitory potential of OAT1B1 and OATP1B3 for investigational drugs.**

このフローを適用することにより、新薬候補品のヒト肝 OATP1B 阻害リスクを医薬品開発の初期段階において定量的に評価することが可能になると推察された。

## 第5節 小括

ピタバスタチンをプローブ基質に用い、サル個体を用いて OATP1B を介した肝取り込み阻害効果を評価した。シクロスポリン A を経口投与 4 時間後にピタバスタチンを静脈内投与したところ、ピタバスタチンの AUC は単独投与に比べて 3.2 倍上昇した。ピタバスタチンの全身クリアランスおよび分布容積が減少したため、ピタバスタチンの肝取り込みをシクロスポリン A が阻害したことが示唆された。サルにシクロスポリン A を経口投与 1 時間後にピタバスタチンを経口投与したところ、ピタバスタチンの AUC は単独投与に比べて 10.6 倍上昇した。消化管を介さない静脈内投与時の結果を利用して、経口投与時の本相互作用を肝臓での寄与のみに分離評価すると、観測された AUC 上昇率のうち 4.5 倍分に相当し、ヒトでの報告 AUC 上昇率 4.6 倍と近似した。さらに、リファンピシンを用いて同様の検討を行った結果、ピタバスタチンを経口投与後のリファンピシン併用による AUC 上昇率は 14.8 倍であり、肝臓の寄与は 5.0 倍分と算出され、ヒトでの報告 AUC 上昇率 5.7 倍と近似した。シクロスポリン A の肝 OATP1B 近傍の理論的最高血中濃度および濃度推移を予測し、第 I 章に述べた  $IC_{50}$  値を用いて *in vivo* 相互作用を予測したところ、ブレインキュベーション処理により得た  $IC_{50}$  値を用いることで、より実際の相互作用を反映した。以上、日米欧の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案の改定状況を踏まえ、サルを用いたピタバスタチンの静脈内投与および経口投与を組み合わせ、新薬候補品の併用効果を追加的に検討する新たな評価フローを運用することにより、ヒト肝の OATP1B 阻害リスクを予め定量的に評価しうることが判明した。

## 総括

肝臓に主に発現する OATP1B は、血漿から肝細胞内への薬物の能動的な取り込みに関与する。併用薬（作用薬）が OATP1B を阻害すると、典型的な OATP1B 基質であり、被相互作用薬となるスタチン系薬物の血中濃度が上昇する薬物動態学的相互作用が生じる。この相互作用に、OATP1B1 遺伝子多型に伴う取り込み機能不全の影響も加わると、循環血中に極めて高濃度となったスタチン系薬物は、時に致死性の横紋筋融解症を発症させる懸念がある。近年、OATP1B の基質となる医薬品が報告されはじめており、非臨床段階で医薬候補品の OATP1B を介する相互作用を定量的に予測する方法の確立が望まれている。これまで、OATP1B を介する相互作用のリスク評価法としては、ヒト由来肝細胞や OATP1B 発現細胞を用いた *in vitro* 試験系が報告されている。しかしながら、既法は、いずれも阻害ポテンシャルの評価に留まっており、被相互作用薬の血中濃度がどの程度変動するかを定量的に評価することは困難である。そこで本研究では、ヒトに遺伝的、生理学的に類似し、安全性および薬物動態に関わる非臨床試験に広く使用されるサルを用い、遺伝的多型性を示す OATP1B を介した医薬候補品の相互作用の *in vitro* および *in vivo* を統合する定量的評価系を構築することを目的とした。

第 I 章では、サル肝細胞および組換えタンパク質発現細胞を用いたサル OATP1B の機能評価を行った。サル肝臓における mRNA 発現量は、ヒトでの報告と同様に、OATP1B1 が最も高く、次に OATP1B3 であり、これらの発現量は OATP2B1 より顕著に高かった。OATP1B1 および OATP1B3 の 4 つの典型的基質を含む 11 のヒト OATP1B 基質薬の取り込みを調べた。その結果、対応するヒト OATP1B と概ね同等のサル OATP1B の基質認識性が明らかとなった。OATP1B1 および OATP1B3 の機能的な特徴は、ピタバスタチンの取り込みの親和性やシクロスポリン A およブリファンピシンの阻害強度およびそのプレインキュベーション効果を含め、サルとヒトで類似していることを明らかにした。これらの結果から、OATP1B 阻害評価モデルとしてサルを用い、ピタバスタチンをプローブ基質に用い

て評価することの有用性が示唆された。サルにおいても、*OATP1B1* 遺伝子に 16 の非同義置換を伴う遺伝子多型を 96 頭のサルの解析より見出した。ピタバスタチンをプローブ基質に用い、これら組換えタンパク質の *in vitro* での取り込み機能変化を解析したところ、顕著な機能低下を伴う遺伝子多型は、調べた範囲において、認められなかった。したがって、サル *in vivo* 薬物相互作用試験を実施するにあたり、サル個体の *OATP1B1* 遺伝子多型を予め判定する必要性は低いことが示唆された。

第Ⅱ章では、サルおよびヒトの *OATP1B* 基質であるピタバスタチンをプローブに用い、サルを用いて *OATP1B* を介した肝取り込み阻害効果を *in vivo* で評価した。サルにピタバスタチンを静脈内投与後の腎未変化体排泄率は 2.6%であったことから、ヒトと同様に、ピタバスタチンは主にサル肝臓に取り込まれ、代謝および／もしくは胆汁排泄されることが示唆された。経口投与された被作用薬であるピタバスタチンは、作用薬がもたらす消化管を介した吸収の変化および／もしくは肝臓を介した消失の変化に伴い、その薬物動態が変化しうる。シクロスポリン A を経口投与 4 時間後にピタバスタチンを静脈内投与したところ、ピタバスタチンの *AUC* は単独投与に比べて 3.2 倍上昇した。ピタバスタチンの全身クリアランスおよび分布容積が減少したため、ピタバスタチンの肝取り込みをシクロスポリン A が阻害したことが示唆された。サルにシクロスポリン A を経口投与 1 時間後にピタバスタチンを経口投与したところ、ピタバスタチンの *AUC* は単独投与に比べて 10.6 倍上昇した。消化管を介さない静脈内投与時の結果を利用して、経口投与時の本相互作用を肝臓での寄与のみに分離評価すると、観測された *AUC* 上昇率のうち 4.5 倍分に相当した。本評価結果は、ヒトでピタバスタチンおよびシクロスポリン A を経口投与時に肝臓を介した相互作用として考察されるピタバスタチンの報告 *AUC* 上昇率 4.6 倍と近似した。さらに、リファンピシンを用いて同様の検討を行った結果、ピタバスタチンを経口投与後のリファンピシン併用による *AUC* 上昇率は 14.8 倍であった。同様に、ピタバスタチンを静脈内投与時の *AUC* 比から肝臓を介する相互作用を分離評価すると 5.0 倍分と算出され、ヒトでの報告 *AUC* 上昇率 5.7 倍と近似した。さらにシクロスポリン A の薬物動態学的パ

ラメータおよびサルの生理学的パラメータを用いて肝臓の OATP1B 近傍の理論的最高血中濃度および濃度推移を予測し、第 I 章に述べた *in vitro* 実験で求めた  $IC_{50}$  値を用いて *in vivo* 相互作用を予測したところ、プレインキュベーション処理により得た  $IC_{50}$  値を用いることで、より精緻に予測できることが示唆された。以上、サルを用いたピタバスタチンの静脈内投与および経口投与を組み合わせることで阻害薬の併用効果を検討することにより、ヒト肝の OATP1B 阻害リスクを予め定量的に評価しうるということが判明した。

総括すると、本研究では、カニクイザルを用い、ピタバスタチンをプローブ基質に用いた肝 OATP1B を介する薬物動態学的相互作用の *in vitro* および *in vivo* の統合的評価方法を考案した。日米欧の薬物相互作用ガイドライン／ガイダンス案の改定状況を鑑み、新薬候補品の非臨床段階の *in vitro* 評価にて、評価対象医薬開発候補品の潜在的なヒトあるいはサル OATP1B 阻害ポテンシャルが予想された場合、その程度に応じて、サルを用いた *in vivo* 薬物相互作用試験の適用が、創薬効率化推進に有用であると示唆された。本研究成果は、ヒトでは直ちに検討実施が困難な相互作用予測の局面を打開し、安全な薬物動態学的相互作用のリスクを低減した医薬候補品の早期創出に寄与するものと期待される。

## 本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

1. Takahashi T, Ohtsuka T, Yoshikawa T, Tatekawa I, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H, and Kume T. (2013) Pitavastatin as an *in vivo* probe for studying hepatic organic anion transporting polypeptide mediated drug–drug interactions in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* 41: 1875–1882.
2. Takahashi T, Ohtsuka T, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H, and Kume T. (2016) Pre-incubation with cyclosporine A potentiates its inhibitory effects on pitavastatin uptake mediated by recombinantly expressed cynomolgus monkey hepatic organic anion transporting polypeptide. *Biopharm Drug Dispos* 37: 479–490.
3. Takahashi T, Uno Y, Yamazaki H, and Kume T. (2019) Functional characterization for polymorphic organic anion transporting polypeptides (OATP/SLCO1B1, 1B3, 2B1) of monkeys recombinantly expressed with various OATP probes. *Biopharm Drug Dispos* 40: 62–69.

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本論文の主査としてご審査賜りました昭和薬科大学 薬理学研究室教授 渡邊泰男博士に深甚なる謝意を表します。また，副査としてご審査賜りました昭和薬科大学 薬物治療学研究室教授 水谷顕洋博士および薬剤学研究室教授 宇都口直樹博士，および予備審査の労をおとりいただいた衛生化学研究室教授 石井 功博士および微生物学研究室教授 金本大成博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎浩史博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり，数多くのご助言ならびにサポートを頂きました株式会社新日本科学 宇野泰広博士，田辺三菱製薬株式会社 久米俊行博士，および大塚達之博士に厚く御礼申し上げます。

多くのご指導とご助言を賜り，さらに種々の便宜を図って下さいました昭和薬科大学 薬物動態学研究室准教授 清水万紀子博士，前特任助教 上原正太郎博士，同研究員 鶴藤雅裕博士，ならびに同研究室所属の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました田辺三菱製薬株式会社 北嶋浩博士，奥哲博士，鍛冶秀文博士，および佐々木晃博士に深謝いたします。また，株式会社新日本科学にて，動物実験の計画と遂行にご尽力いただき，有益な成果をもって本研究に貢献された吉川隆大氏、建川一朗氏に深謝いたします。

最後に，本研究の遂行を支えてくれた妻の梢子をはじめ，家族に心より感謝します。



## 参考文献

- 家入一郎 (2014) 薬物の効果や体内動態の個人差と遺伝子多型 *Organ Biology* **21**:247-253.
- Amundsen R, Christensen H, Zabihyan B and Asberg A (2010) Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin. *Drug Metab Dispos* **38**:1499-1504.
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2009) Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s), Part 1. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration.  
[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2009/022363s000\\_ClinPharmR\\_P1pdf22-363](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022363s000_ClinPharmR_P1pdf22-363).
- Chang JH, Plise E, Cheong J, Ho Q and Lin M (2013) Evaluating the in vitro inhibition of UGT1A1, OATP1B1, OATP1B3, MRP2, and BSEP in predicting drug-induced hyperbilirubinemia. *Mol Pharm* **10**:3067-3075.
- de Bruyn T, Ufuk A, Cantrill C, Kosa RE, Bi YA, Niosi M, Modi S, Rodrigues AD, Tremaine LM, Varma MV, Galetin A and Houston JB (2018) Predicting Human Clearance of OATP substrates using Cynomolgus monkey: In vitro-in vivo scaling of hepatic uptake clearance. *Drug Metab Dispos*.
- Fahrmayr C, Konig J, Auge D, Mieth M and Fromm MF (2012) Identification of drugs and drug metabolites as substrates of multidrug resistance protein 2 (MRP2) using triple-transfected MDCK-OATP1B1-UGT1A1-MRP2 cells. *Br J Pharmacol* **165**:1836-1847.
- Gessner A, Konig J and Fromm MF (2019) Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Clin Pharmacol Ther*.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ and Zhang L (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**:215-236.
- Gui C and Hagenbuch B (2010) Cloning/characterization of the canine organic anion transporting polypeptide 1b4 (Oatp1b4) and classification of the canine OATP/SLCO members. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **151**:393-399.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* **447**:653-665.
- Hasunuma T, Nakamura M, Yachi T, Arisawa N, Fukushima K, Iijima H and Saito Y (2003) The drug-drug interactions of pitavastatin (NK-104), a novel HMG-CoA

- reductase inhibitor and cyclosporine. *J Clin Ther Med* **19**:381–389.
- Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H and Sugiyama Y (2005) Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* **68**:800-807.
- Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y (2004) Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the Hepatic Uptake of Pitavastatin in Humans. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:139–146.
- Hirano M, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y (2006) Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1. *Drug Metab Dispos* **34**:1229-1236.
- Hosea NA, Collard WT, Cole S, Maurer TS, Fang RX, Jones H, Kakar SM, Nakai Y, Smith BJ, Webster R and Beaumont K (2009) Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol* **49**:513-533.
- Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, Roth W, Igarashi T and Sugiyama Y (2006) Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* **34**:1109-1115.
- Izumi S, Nozaki Y, Maeda K, Komori T, Takenaka O, Kusuhara H and Sugiyama Y (2015) Investigation of the impact of substrate selection on in vitro organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **43**:235-247.
- Kalliokoski A and Niemi M (2009) Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* **158**:693-705.
- Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M and Chiba K (2005) Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenetics and Genomics* **15**:513-522.
- Karlgren M, Vildhede A, Norinder U, Wisniewski JR, Kimoto E, Lai Y, Haglund U and Artursson P (2012) Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J Med Chem* **55**:4740-4763.
- Kimata H, Fujino J, Koide T, Yamada Y, Tsunenari Y, Yonemitsu M and Yanagawa Y (1998) Studies on the metabolic fate of NK-104, a new inhibitor of HMG-CoA reductase (1): absorption, distribution, metabolism and excretion in rats. *Xenobiotic Metab Dispos* **13**:484–498.
- Korzekwa KR, Nagar S, Tucker J, Weiskircher EA, Bhoopathy S and Hidalgo IJ (2012)

- Models to predict unbound intracellular drug concentrations in the presence of transporters. *Drug Metab Dispos* **40**:865-876.
- Kunze A, Huwyler J, Camenisch G and Poller B (2014) Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1- and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data. *Drug Metab Dispos* **42**:1514-1521.
- Luttringer O, Theil FP, Poulin P, Schmitt-Hoffmann AH, Guentert TW and Lavé T (2003) Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of disposition of epiroprim in humans. *J Pharm Sci* **92**:1990-2007.
- Mück W, Mai I, Fritsche L, Ochmann K, Rohde G, Unger S, Johne A, Bauer S, Budde K, Roots I, Neumayer H and Kuhlmann J (1999) Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporinetreated kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* **65**:251-261.
- Maeda K (2015) Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as Important Regulators of the Pharmacokinetics of Substrate Drugs. *Biol Pharm Bull* **38**:155-168.
- Ming X, Knight BM and Thakker DR (2011) Vectorial transport of fexofenadine across Caco-2 cells: involvement of apical uptake and basolateral efflux transporters. *Mol Pharm* **8**:1677-1686.
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y and Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* **55**:425-461.
- Nakanishi Y, Matsushita A, Matsuno K, Iwasaki K, Utoh M, Nakamura C and Uno Y (2007) Regional distribution of cytochrome p450 mRNA expression in the liver and small intestine of cynomolgus monkeys. *Drug Metab Pharmacokinet* **25**:290-297.
- Niemi M, Pasanen MK and Neuvonen PJ (2011) Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* **63**:157-181.
- Noe J, Portmann R, Brun ME and Funk C (2007) Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* **35**:1308-1314.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A and Tamai I (2004) Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:438-445.
- Ogasawara A, Negishi I, Kozakai K and Kume T (2009) In vivo evaluation of drug-drug interaction via mechanism-based inhibition by macrolide antibiotics in

- cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **37**:2127-2136.
- Ohtsuka T, Yoshikawa T, Kozakai K, Tsuneto Y, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H and Kume T (2010) Alprazolam as an in vivo probe for studying induction of CYP3A in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* **38**:1806-1813.
- Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), Common technical documents on the PMDA website,  
[http://www.pmda.go.jp/drugs/2013/P201300141/800155000\\_22500AMX01833\\_I100\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/drugs/2013/P201300141/800155000_22500AMX01833_I100_1.pdf).
- Prueksaritanont T, Chu X, Evers R, Klopfer SO, Caro L, Kothare PA, Dempsey C, Rasmussen S, Houle R, Chan G, Cai X, Valesky R, Fraser IP and Stoch SA (2014) Pitavastatin is a more sensitive and selective organic anion-transporting polypeptide 1B clinical probe than rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol* **78**:587-598.
- Schwabedissen HEMZ, Boettcher K, Steiner T, Schwarz UI, Keiser M, Kroemer HK and Siegmund W (2014) OATP1B3 Is Expressed in Pancreatic b-Islet Cells and Enhances the Insulinotropic Effect of the Sulfonylurea Derivative Glibenclamide. *Diabetes* **63**:775-784.
- Shen H, Su H, Liu T, Yao M, Mintier G, Li L, Fancher RM, Iyer R, Marathe P, Lai Y and Rodrigues AD (2015) Evaluation of rosuvastatin as an organic anion transporting polypeptide (OATP) probe substrate: in vitro transport and in vivo disposition in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **353**:380-391.
- Shen H, Yang Z, Mintier G, Han YH, Chen C, Balimane P, Jemal M, Zhao W, Zhang R, Kallipatti S, Selvam S, Sukrutharaj S, Krishnamurthy P, Marathe P and Rodrigues AD (2013) Cynomolgus monkey as a potential model to assess drug interactions involving hepatic organic anion transporting polypeptides: in vitro, in vivo, and in vitro-to-in vivo extrapolation. *J Pharmacol Exp Ther* **344**:673-685.
- Shimizu M, Fuse K, Okudaira K, Nishigaki R, Maeda K, Kusuhara H and Sugiyama Y (2005) Contribution of OATP (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* **33**:1477-1481.
- Shitara Y, Takeuchi K and Horie T (2013) Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on OATP1B1-mediated uptake. *J Pharm Sci* **102**:3427-3435.
- Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y and Horie T (2012) Long-lasting Inhibitory Effects of Cyclosporin A, but Not Tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated Uptake. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **27**:368-378.
- Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y and Tsuji A (2001) Functional Characterization of Human Organic Anion Transporting Polypeptide B (OATP-B)

- in Comparison with Liver-Specific OATP-C. *Pharmaceutical Research* **18**:1262-1269.
- Treiber A, Schneiter R, Hausler S and Stieger B (2007) Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* **35**:1400-1407.
- Tsukimoto M, Ohashi R, Torimoto N, Togo Y, Suzuki T, Maeda T and Kagawa Y (2015) Effects of the inhibition of intestinal P-glycoprotein on aliskiren pharmacokinetics in cynomolgus monkeys. *Biopharm Drug Dispos* **36**:15-33.
- Uno Y, Fujino H, Kito G, Kamataki T and Nagata R (2006) CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone. *Mol Pharmacol* **70**:477-486.
- Uno Y, Kumano T, Kito G, Nagata R, Kamataki T and Fujino H (2007) CYP2C76-mediated species difference in drug metabolism: a comparison of pitavastatin metabolism between monkeys and humans. *Xenobiotica* **37**:30-43.
- Uno Y, Matsushita A, Murayama N and Yamazaki H (2015) Genetic polymorphism of cynomolgus and rhesus macaque CYP2C9. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**:130-132.
- Uno Y, Matsushita A, Shukuya M, Matsumoto Y, Murayama N and Yamazaki H (2014) CYP2C19 polymorphisms account for inter-individual variability of drug metabolism in cynomolgus macaques. *Biochem Pharmacol* **91**:242-248.
- Uno Y, Uehara S and Yamazaki H (2018) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies for humans. *Biochem Pharmacol* **153**:184-195.
- Utoh M, Uno Y, Ohtsuka T and Kume T (2012) Identification and analysis of drug transporters in cynomolgus macaques. *Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX) 27th Annual Meeting, Nov 20–22, Chiba, Japan.*
- Utoh M, Yoshikawa T, Hayashi Y, Shimizu M, Iwasaki K, Uno Y and Yamazaki H (2015) Slow R-warfarin 7-hydroxylation mediated by P450 2C19 genetic variants in cynomolgus monkeys in vivo. *Biochem Pharmacol* **95**:110-114.
- Vaidyanathan J, Yoshida K, Arya V and Zhang L (2016) 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* **56 Suppl 7**:S59-72.
- Varma MV, Scialis RJ, Lin J, Bi YA, Rotter CJ, Goosen TC and Yang X (2014) Mechanism-based pharmacokinetic modeling to evaluate transporter-enzyme interplay in drug

- interactions and pharmacogenetics of glyburide. *AAPS J* **16**:736-748.
- Vildhede A, Mateus A, Khan EK, Lai Y, Karlgren M, Artursson P and Kjellsson MC (2016) Mechanistic Modeling of Pitavastatin Disposition in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes: A Proteomics-Informed Bottom-Up Approach. *Drug Metab Dispos* **44**:505-516.
- Watanabe M, Watanabe T, Yabuki M and Tamai I (2015) Dehydroepiandrosterone sulfate, a useful endogenous probe for evaluation of drug-drug interaction on hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP) in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**:198-204.
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Kanamaru H, Saito Y, Hu Z and Sugiyama Y (2010) Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab Dispos* **38**:215-222.
- Yamada I, Fujino H, Shimada S and Kojima J (2003) Metabolic fate of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase: similarities and difference in the metabolism of pitavastatin in monkeys and humans. *Xenobiotica* **33**:789-803.
- Yoshida K, Maeda K and Sugiyama Y (2012) Transporter-mediated drug-drug interactions involving OATP substrates: predictions based on in vitro inhibition studies. *Clin Pharmacol Ther* **91**:1053-1064.