

# 博士論文

## ビッグアノイド系糖尿病治療薬の薬効・毒性支配要因としての トランスポーター介在性輸送の解析

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 薬学専攻  
医療薬学講座 医療薬剤学研究室  
平成 23 年度入学 十亀 祥久  
主 指 導 教 員 高野 幹久

# 目 次

---

---

|   |    |
|---|----|
| 序 論 .....   | 1  |
| 本 論.....  | 4  |
| 第 I 章 ラットにおける <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 肝取り込み..... | 4  |
| 第 1 節 経口投与時の体内動態.....                                       | 4  |
| 第 2 節 ラットにおける代謝 .....                                       | 7  |
| 第 3 節 肝細胞における時間依存的な取り込み .....                               | 9  |
| 第 4 節 肝細胞における濃度依存的な取り込み .....                               | 10 |
| 第 5 節 小括.....   | 12 |
| 第 II 章 ヒト肝細胞および hOCT1 発現系卵母細胞における取り込み .....                 | 14 |
| 第 1 節 ヒト肝細胞における時間依存的な取り込み .....                             | 14 |
| 第 2 節 ヒト肝細胞における濃度依存的な取り込み .....                             | 15 |
| 第 3 節 取り込みに対する K <sup>+</sup> イオンの影響.....                   | 18 |
| 第 4 節 ビグアナイド取り込みに対する代表的基質の阻害効果 .....                        | 19 |
| 第 5 節 卵母細胞発現系における時間依存的な取り込み .....                           | 20 |
| 第 6 節 卵母細胞発現系における濃度依存的な取り込み .....                           | 21 |
| 第 7 節 小括.....   | 23 |
| 第 III 章 hOCT2 を介したビグアナイドの動態 .....                           | 26 |
| 第 1 節 卵母細胞発現系における取り込みに対する阻害効果.....                          | 26 |
| 第 2 節 卵母細胞発現系における時間依存的な取り込み .....                           | 29 |
| 第 3 節 卵母細胞発現系における濃度依存的な取り込み .....                           | 33 |
| 第 4 節 小括.....   | 36 |
| 第 IV 章 乳酸アシドーシスの発現に関する考察.....                               | 38 |

|            |    |
|------------|----|
| 結 論 .....  | 41 |
| 謝 辞 .....  | 43 |
| 実験の部 ..... | 44 |
| 論文目録 ..... | 52 |
| 参考文献 ..... | 53 |

## 略語／略号一覧

---

|                  |  |
|------------------|--|
| AUC              | area under the plasma concentration-time curve |
| cDNA             | complementary DNA                              |
| CL               | clearance                                      |
| $C_{\max}$       | the peak plasma concentration                  |
| CYP              | cytochrome P450                                |
| DMEM             | Dulbecco's modified Eagle's medium             |
| F                | bioavailability                                |
| GFP              | green fluorescent protein                      |
| HMG-CoA          | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A          |
| HPLC             | high performance liquid chromatography         |
| KHB              | Krebs-Henseleit bicarbonate buffer             |
| $K_m$            | Michaelis-Menten constant                      |
| MATE             | multidrug and toxin extrusion proteins         |
| MPP <sup>+</sup> | 1-methyl-4-phenylpyridinium                    |
| OAT              | organic anion transporter                      |
| OATP             | organic anion transporting polypeptide         |
| OCT              | organic cation transporter                     |
| PAH              | p-amino hippuric acid                          |
| $P_{\text{dif}}$ | non-saturable uptake clearance                 |
| PM               | poor metabolizer                               |
| SD               | standard deviation                             |
| SDS              | sodium dodecyl sulfate                         |
| SE               | standard error                                 |
| SLC              | solute carrier                                 |
| SNP              | single nucleotide polymorphism                 |
| SU               | sulfonylurea                                   |
| TEA              | tetraethylammonium                             |
| $T_{\max}$       | time to maximum plasma concentration           |
| UKPDS            | United Kingdom Prospective Diabetes Study      |
| $V_{\max}$       | maximum uptake rate                            |

## 序 論

ビグアナイド薬の歴史は古く、中世ヨーロッパで糖尿病の治療に用いられた植物である Goat's rue (French lilac) に始まり<sup>1)</sup>、この植物に含まれるグアニジンが血糖改善作用を有することから、グアニジンの骨格を2つ有するビグアナイドの研究が行われた<sup>2)</sup>。その結果、1950年代後半よりフェンホルミン、ブホルミン、メトホルミンの3種類のビグアナイド薬 (Fig. 1) が発売された<sup>3-5)</sup>。しかし、1970年代に、主としてフェンホルミンによる重篤な乳酸アシドーシスの副作用報告が相次ぎ、多くの国でフェンホルミンは使用中止となった<sup>6)</sup>。乳酸アシドーシスは、いったん発症すると致死率が高く十分な注意を要する副作用である。この影響により、わが国では他のビグアナイド薬も使用が敬遠されることになった。フェンホルミンによる乳酸アシドーシスの発現頻度は1年に10万人あたり約40~60人であるが、メトホルミンによる乳酸アシドーシスの発現頻度は1年に10万人あたり3人程度と、フェンホルミンに比較すると1/10~1/20低く<sup>7,8)</sup>、この副作用の発現頻度はスルホニル尿素 (SU) 薬による低血糖昏睡の発現率よりも低いことが指摘されている<sup>9)</sup> (Table 1)。また、DeFronzo らによって行われたメトホルミンの有効性に関する詳細な解析は、ビグアナイド薬の有効性と安全性を再評価するきっかけとなり<sup>10)</sup>、さらに英国で実施された大規模臨床試験 United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) によって、肥満2型糖尿病患者を対象にメトホルミンの臨床的有用性が明らかにされた<sup>11)</sup>。これらの臨床研究に基づき近年メトホルミンの有効性と安全性が見直され、米国や欧州においては2型糖尿病治療の第一選択薬として用いられるようになってきている<sup>12)</sup>。このように、臨床現場でビグアナイド薬が使用され始めて50年以上が経つが、メトホルミンとフェンホルミンの乳酸アシドーシス発現頻度の違いに関する詳細については未だ明らかではない。

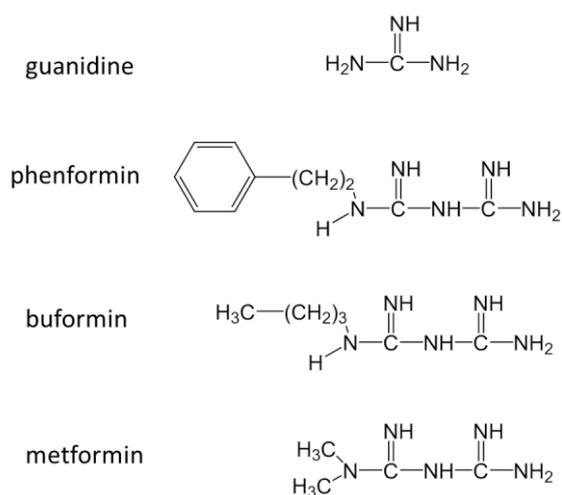


Fig. 1. Chemical structure of guanidine derivatives.

**Table 1. Glibenclamide-associated hypoglycaemia and metformin-associated lactic acidosis in Sweden, 1972 - mid 1981<sup>9)</sup>.**

| <b>Drug</b>          | <b>Deaths</b> | <b>Usage*<br/>patient years</b> | <b>Mortality risk per<br/>1,000 patient years</b> |
|----------------------|---------------|---------------------------------|---|
| <b>Glibenclamide</b> | 10            | 300,645                         | 0.0332  |
| <b>Metformin</b>     | 2             | 83,482                          | 0.0240  |

\*Average daily dose for glibenclamide = 10 mg

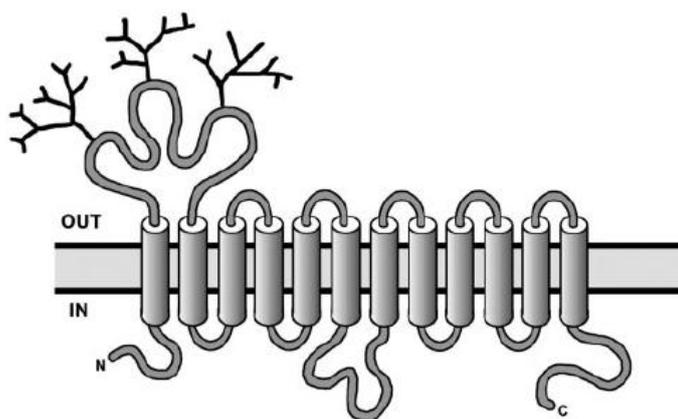
Average daily dose for metformin = 1500 m g

近年、薬物の体内動態を制御する薬物輸送トランスポーターの研究が進み、多くの医薬品がトランスポーターを介して膜輸送されることが明らかになってきた<sup>13-16)</sup>。トランスポーターはいくつかの種類に分類されるが、二次性能動輸送や促進拡散を媒介するトランスポーターは solute carrier (SLC)ファミリーに分類される<sup>14)</sup>。現在までに SLC は 52 の遺伝子ファミリーが明らかにされている<sup>17)</sup>。SLC はすべて膜タンパク質であるため $\alpha$ ヘリックス構造の膜貫通部位を有することが共通の特徴であるが、膜貫通回数はトランスポーターごとに異なる<sup>17-20)</sup>。SLC に分類されるトランスポーターは多様な機能を有しているが、これらの中で薬物動態に重要な役割を果たすのは、プロトンペプチド共輸送体 (SLC15)、有機アニオントランスポーター (SLC21)、有機イオントランスポーター (SLC22)、プロトン/有機カチオンアンチポーター (SLC47) の 4 つのトランスポーターである。このうち SLC22 ファミリーは、12 回膜貫通型の構造を有しており、第 1 細胞外領域に長いループが存在する<sup>18)</sup> (Fig. 2)。SLC22 ファミリーには 3 種類の有機カチオントランスポーター (OCT1-3) がある<sup>21)</sup>。SLC22A1 (OCT1; organic cation transporter1) は 1994 年に初めてクローニングされた有機カチオントランスポーターであり、ヒトでは肝実質細胞の類洞側の細胞膜に発現している<sup>22,23)</sup>。また、ヒトの腎近位尿細管上皮細胞の側底膜には SLC22A2 (OCT2; organic cation transporter2) が発現している<sup>24)</sup>。OCT1 と OCT2 が体内からの主要な消失過程に関与する肝臓や腎臓に発現しているのに対して、OCT3 は脳、心臓、骨格筋、胎盤などに広く発現している<sup>18)</sup>。なお、ラットでは Oct1 は肝臓と腎臓、Oct2 は腎臓に発現が認められる<sup>25,26)</sup>。生体内においてカチオンとして存在するメトホルミンは OCT1 を介して薬効・毒性標的組織である肝臓に取り込まれ、OCT2 を介して尿中へと排泄される。従って、OCT はメトホルミンの体内動態を制御する重要な要因と考えられる。

薬物の薬効や毒性の発現を把握する指標の 1 つに血中濃度のモニターがある。薬物の血中濃度がある一定の有効濃度よりも低ければ薬としての効力が十分に発揮できず、逆に高

くなりすぎると毒性が発現する。このような薬物の血中濃度を変化させる要因としては、薬物輸送トランスポーター、薬物代謝酵素、薬物間相互作用、肝腎機能の低下や疾患など様々な要因があげられる。従って、メトホルミンに関連するトランスポーターが原因となって体内動態を変動させ、毒性の発現に影響を与える可能性が考えられる。しかし、フェンホルミンの OCT 介在性輸送に関する検討はこれまでなされておらず、ビグアナイド薬の毒性発現と OCT の関連性を考察するためには、OCT におけるフェンホルミンとメトホルミンの動態特性を比較することが有用ではないかと考えられた。

そこで本研究では、カチオン性薬物の体内動態を制御するヒト OCT1 および OCT2 に着目し、ビグアナイド薬の肝臓および腎臓への取り込み動態特性について  $^{14}\text{C}$  標識した 2 種のビグアナイド薬（メトホルミンとフェンホルミン）を用いて検討を行った。



**Fig. 2. Predicted secondary structure of OCT1<sup>18)</sup>.**

The protein is thought to contain 12 transmembrane domains with both N and C terminus located intracellularly. The first large extracellular loop contains three putative *N*-linked glycosylation sites (indicated by branches). Cytoplasmic (IN) and extracellular (OUT) orientation are indicated.

# 本 論

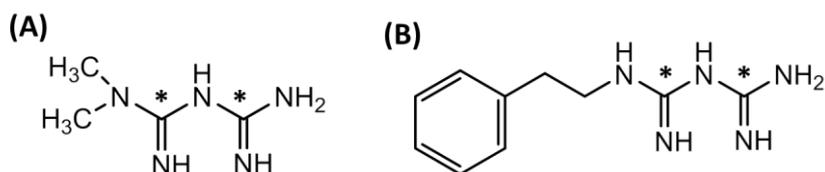
---

## 第 I 章 ラットにおける *in vivo* および *in vitro* 肝取り込み

メトホルミンは経口投与された後、消化管から吸収され、門脈を經由して肝臓へ取り込まれる。肝臓に取り込まれたメトホルミンは糖新生を抑制する作用を発現し、肝臓から血液中への糖の放出を低下させる<sup>27,28)</sup>。一方、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害することで、肝臓内におけるピルビン酸の消費が低下し、乳酸値の上昇を招く<sup>29)</sup>。正常な状態においてピルビン酸と乳酸は平衡状態を保っているが、ピルビン酸濃度が高くなると、乳酸を産生する方向に向かう。乳酸はそこから先へ代謝を受けることがなく、脱水素酵素によりピルビン酸に再度代謝されなければ、体内から消失する経路はない。肝臓における乳酸の上昇は血中の乳酸値に反映され、血中乳酸値が 5 mmol/L (45 mg/dL) を超えて血液中の pH が 7.35 未満を示す場合に乳酸アシドーシスと診断される<sup>30)</sup>。乳酸アシドーシスになると、筋肉痛、筋肉の痙攣、倦怠感、脱力感、吐き気、嘔吐、悪心などの症状が出て、数時間すると死亡率が高い昏睡状態に陥る<sup>31)</sup>。乳酸アシドーシスはいったん発症すると致死率が高く十分な注意が必要である。このように、メトホルミンにとって肝臓は薬効の標的組織であると同時に副作用の乳酸アシドーシスに関連する毒性の標的組織でもある。フェンホルミンに関してもメトホルミンと同様に肝臓に取り込まれた後、薬効や毒性を発現すると考えられるが、これまでにフェンホルミンの肝取り込みの詳細な検討は行われていない。そこで本章では、ビッグアナイド薬の肝取り込み特性を把握するため<sup>14</sup>C 標識したメトホルミンおよびフェンホルミンを用いて *in vivo* におけるラット肝臓への移行性および *in vitro* 凍結肝細胞における取り込みを検討した。

### 第 1 節 経口投与時の体内動態

メトホルミンとフェンホルミンの肝臓への取り込み特性を比較するため、<sup>14</sup>C-メトホルミンあるいは<sup>14</sup>C-フェンホルミンを 50 mg/kg の用量で雄性ラットに単回経口投与し、血漿中放射能、肝臓中放射能および門脈血漿中放射能を測定した。使用した各標識化合物の構造を以下に示す (Fig. 3)。

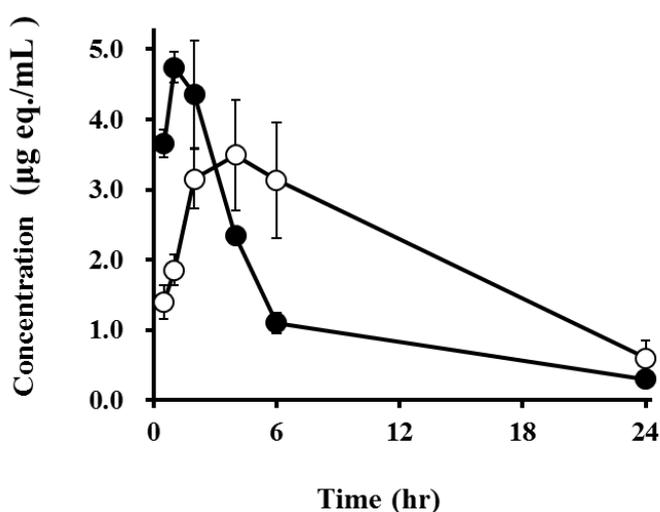


**Fig. 3. Chemical structure of <sup>14</sup>C-metformin (A) and <sup>14</sup>C-phenformin (B).**

\* : <sup>14</sup>C-labeled position

**【血漿中濃度推移の検討】**

各 <sup>14</sup>C 標識体を 50 mg/kg の用量で雄性ラットに経口投与後、頸静脈から経時的に採血を行い、血漿成分を分離して放射能を測定した。<sup>14</sup>C-メトホルミンを投与したときの血漿中放射能濃度は投与後速やかに上昇し、1 時間で最高血漿中濃度 (C<sub>max</sub>) 4.74 μg eq./mL に達した。消失は速やかであり、投与後 24 時間では C<sub>max</sub> の約 6% にまで減少した。<sup>14</sup>C-フェンホルミンを投与したときは、メトホルミンに比べて血漿中放射能濃度の上昇は緩やかであり、投与後 4 時間で C<sub>max</sub> 3.49 μg eq./mL に達した後、比較的緩やかに低下した (Fig. 4)。投与後 24 時間では C<sub>max</sub> の約 17% に減少した。



**Fig. 4. Plasma concentrations of radioactivity in male rats following an oral dose (50 mg/kg) of <sup>14</sup>C-metformin (●) and <sup>14</sup>C-phenformin (○).** Data are mean ±SD values for three animals.

**Table 2. Pharmacokinetic parameters of radioactivity after an oral dose (50 mg/kg) of <sup>14</sup>C-metformin and <sup>14</sup>C-phenformin in male rats.**

| <b>Drug</b>       | <b>T<sub>max</sub><br/>hr</b> | <b>C<sub>max</sub><br/>µg eq./mL</b> | <b>AUC<sub>0-∞</sub><br/>µg eq.*hr/mL</b> |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------------|---|
| <b>Metformin</b>  | 1.3 ± 0.6                     | 4.93 ± 0.15                          | 34.4 ± 2.1                                |
| <b>Phenformin</b> | 4.7 ± 1.2                     | 3.55 ± 0.76                          | 62.9 ± 8.6                                |

The data are the means ±SD of data for three animals.

**【組織中濃度の検討】**

血漿中放射能濃度推移から各ビグアナイド薬が消化管からの吸収段階にあると考えられる投与後 30 分における門脈血漿中放射能と肝臓中放射能を測定し、肝臓への移行性を検討した。その結果、肝臓中の放射能濃度はメトホルミンが 21.5 µg eq./g、フェンホルミンが 147.1 µg eq./g であり、フェンホルミンの方が約 7 倍高い値を示した。一方、門脈血漿中濃度はメトホルミンが 5.22 µg eq./mL、フェンホルミンが 2.53 µg eq./mL を示し、メトホルミンの方が約 2 倍高い濃度であり、血漿中放射能濃度推移の結果を反映していた。なお、投与後 30 分における門脈血漿中放射能濃度は循環血漿中濃度に比べると、いずれも高値であった。組織移行性を示す  $C_{liver}/C_{plasma}$  値は、メトホルミンが 4.22、フェンホルミンが 61.3 であり、ともに肝臓への移行性が良好であることが分かった。以上、両ビグアナイド薬は肝臓に選択的に取り込まれることが明らかとなった。また、フェンホルミンはメトホルミンに比べて肝臓へ取り込まれる移行性が高いことが示された (Table 3)。

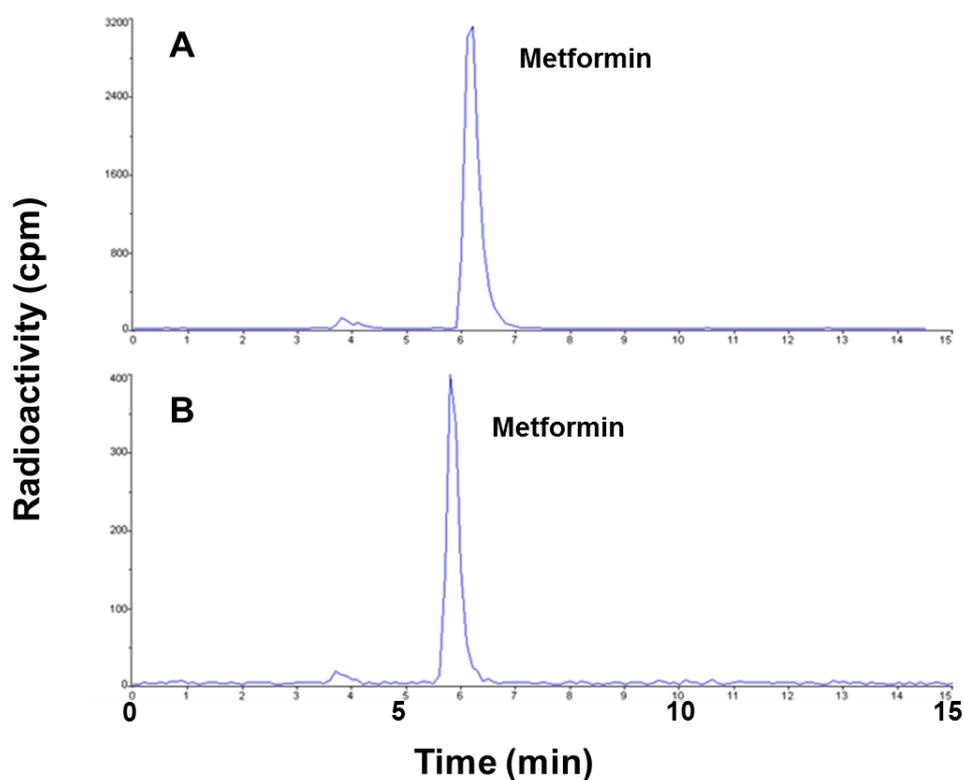
**Table 3. Tissue radioactivity at 0.5 hr after an oral dose (50 mg/kg) of <sup>14</sup>C-metformin and <sup>14</sup>C-phenformin to male rats.**

| <b>Tissue</b>                            | <b>Metformin</b> | <b>Phenformin</b> |
|--|------------------|-------------------|
| <b>Portal vein plasma (µg eq./mL)</b>    | 5.22 ± 0.47      | 2.53 ± 0.91       |
| <b>Liver (µg eq./g)</b>                  | 21.5 ± 14.7      | 147.1 ± 29.6      |
| <b><math>C_{liver}/C_{plasma}</math></b> | 4.22 ± 2.98      | 61.3 ± 13.6       |

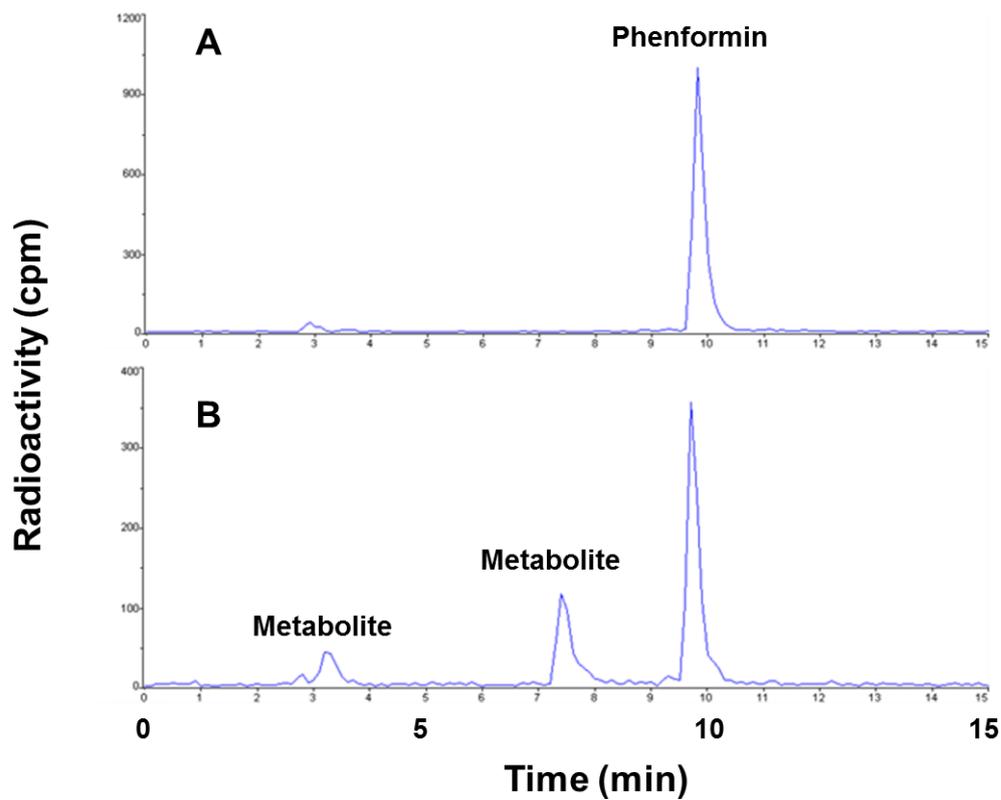
The data are the means ±SD of data for three animals.

## 第2節 ラットにおける代謝

*in vivo* の肝臓への移行性試験における  $^{14}\text{C}$  標識体の取り込みが、未変化体の挙動を反映したものであるのか確かめるため、投与後 30 分に採取した門脈血漿中の放射性成分をラジオ HPLC で分析した。その結果、メトホルミンを投与した時の門脈血漿中には未変化体のみが検出され (Fig. 5)、フェンホルミンを投与したときは、未変化体の他に 2 つの代謝物と考えられるピークが検出された (Fig. 6)。フェンホルミン投与後に検出された代謝物は肝臓に取り込まれる前の門脈血漿中に存在していたことから、フェンホルミンはラットの消化管を初回通過する際に代謝を受けることが示唆された。



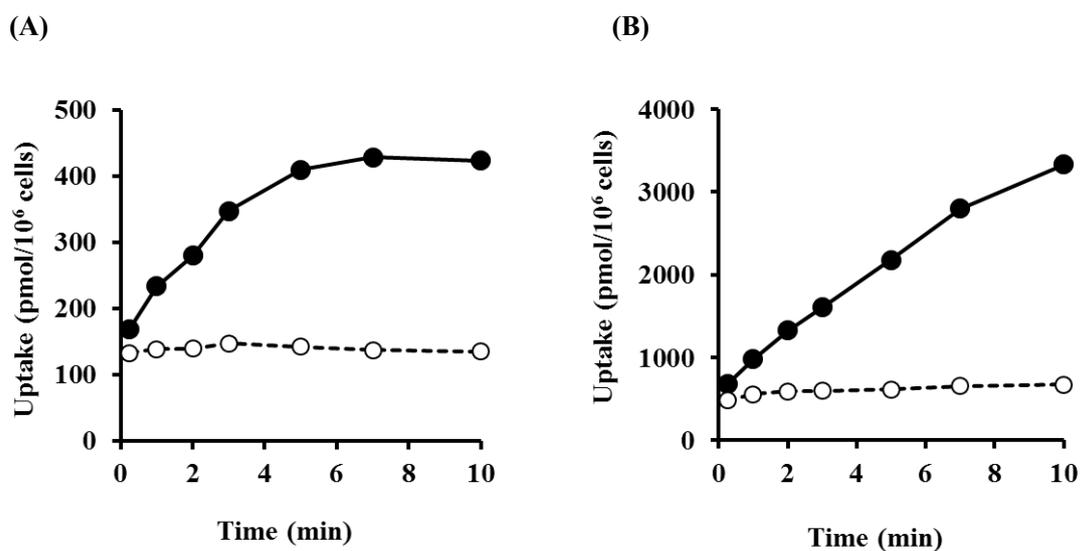
**Fig. 5. Representative radio-HPLC chromatograms of portal vein plasma at 0.5 hr after an oral dose (50 mg/kg) of  $^{14}\text{C}$ -metformin to male rats.  $^{14}\text{C}$ -metformin standard (A) and portal vein plasma (B) are compared.**



**Fig. 6. Representative radio-HPLC chromatograms of portal vein plasma at 0.5 hr after an oral dose (50 mg/kg) of  $^{14}\text{C}$ -phenformin to male rats.  $^{14}\text{C}$ -phenformin standard (A) and portal vein plasma (B) are compared.**

### 第3節 肝細胞における時間依存的な取り込み

ラットに経口投与後の各ビグアナイド薬が肝臓に移行することが分かったので、肝取り込みの動態をさらに詳細に比較するためラット凍結肝細胞を用いた検討を行った。ラット凍結肝細胞において $^{14}\text{C}$ -メトホルミン ( $20\ \mu\text{M}$ ) と $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン ( $20\ \mu\text{M}$ ) を $37^\circ\text{C}$ にてインキュベートして、所定の時間に細胞内へ取り込まれた放射能を測定したところ、各ビグアナイド薬の取り込みは、氷冷下で反応させた細胞に比べて各測定時点で高値を示した。 $^{14}\text{C}$ -メトホルミンは、取り込み開始からほぼ5分まで直線的に取り込まれたが、それ以降は定常状態に達する傾向が認められた。一方、 $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンは、10分までほぼ直線的な取り込みが認められた。いずれのビグアナイド薬も氷冷下での取り込み増加は認められなかった。また、肝細胞への取り込み量はフェンホルミンの方が多かった (Fig. 7)。この結果より、次節における濃度依存性の検討は、取り込みの反応時間をメトホルミンは5分、フェンホルミンは10分に設定した。



**Fig. 7. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin ( $20\ \mu\text{M}$ ) (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin ( $20\ \mu\text{M}$ ) (B) by rat hepatocytes.** Both compounds were incubated for the designated periods at  $0^\circ\text{C}$  (○) and  $37^\circ\text{C}$  (●). Each point represents the mean of two measurements.

#### 第4節 肝細胞における濃度依存的な取り込み

各ビグアナイド薬のラット凍結肝細胞への時間依存的な取り込みが認められたので、次に取り込みの濃度依存性を検討した。<sup>14</sup>C-メトホルミンは20~10000 μM、<sup>14</sup>C-フェンホルミンは1~1000 μMの濃度範囲で、放射能の取り込み量を測定した。その結果、メトホルミンおよびフェンホルミンともに濃度依存的な取り込みを示し、いずれにおいても低濃度での直線性と高濃度における飽和性が認められた (Fig. 8)。ラット肝細胞への取り込みは、トランスポーターを介していることが示唆されたので、非線形最小二乗法 (MULTI) <sup>32)</sup>を用いて以下の Michaelis-Menten 式に当てはめ、速度論パラメータを算出した。

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) + P_{dif} \times S$$

$K_m$  値はメトホルミンの 404 μM に対してフェンホルミンは 5.17 μM であった。 $V_{max}$  値はメトホルミンが 640 pmol/min/10<sup>6</sup> cells、フェンホルミンが 180 pmol/min/10<sup>6</sup> cells、非特異的取り込みクリアランスである  $P_{dif}$  値はそれぞれ 0.293 μL/min/10<sup>6</sup> cells、0.573 μL/min/10<sup>6</sup> cells であった。また、取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値はメトホルミンが 1.58 μL/min/10<sup>6</sup> cells、フェンホルミンは 34.7 μL/min/10<sup>6</sup> cells であった。 $K_m$  値と  $CL_{int}$  値から、フェンホルミンはメトホルミンよりもラットの肝細胞に対する親和性が高く、取り込み活性も 20 倍以上高いことが示された (Table 3)。

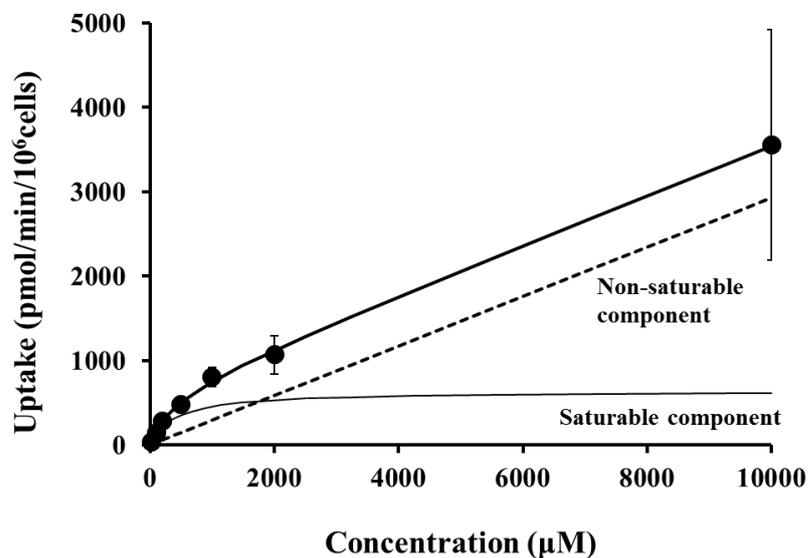
**Table 3. Kinetic parameters for the uptake of <sup>14</sup>C-metformin and <sup>14</sup>C-phenformin by rat hepatocytes.**

| Parameters                                 | Metformin | Phenformin |
|--|-----------|------------|
| $K_m$ (μM)                                 | 404       | 5.17       |
| $V_{max}$ (pmol/min/10 <sup>6</sup> cells) | 640       | 180        |
| $P_{dif}$ (μL/min/10 <sup>6</sup> cells)   | 0.293     | 0.573      |
| $CL_{int}$ (μL/min/10 <sup>6</sup> cells)  | 1.58      | 34.7       |

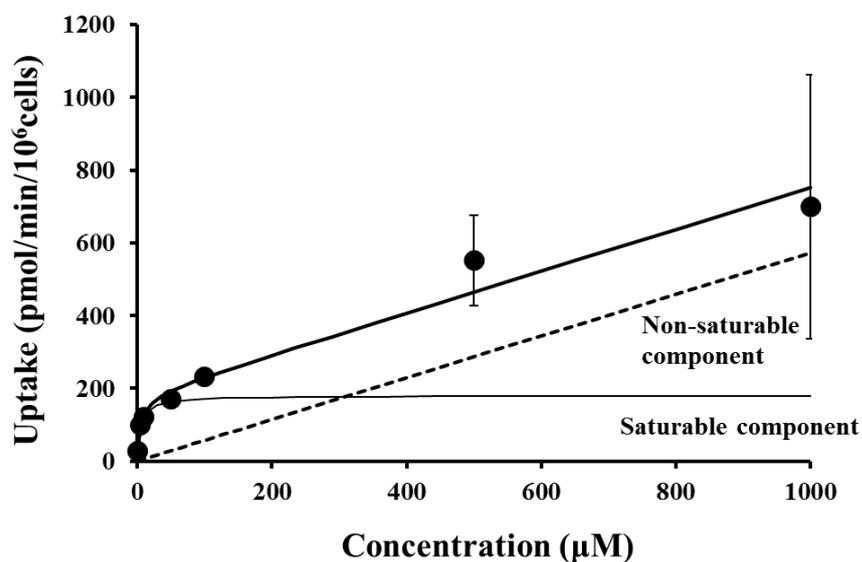
Kinetic parameters were obtained by nonlinear least-squares regression analysis (MULTI).

Values of intrinsic clearance were calculated as follows:  $V_{max}/K_{max}$ . The data are the means of three measurements.

(A)



(B)



**Fig. 8. Concentration dependence of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) by rat hepatocytes.**  $^{14}\text{C}$ -metformin was incubated in a concentration range from 20 to 10000  $\mu\text{M}$  at  $37^\circ\text{C}$  for 5 min and  $^{14}\text{C}$ -phenformin from 1 to 1000  $\mu\text{M}$  at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three measurements.

## 第5節 小括

本章では、ビグアナイド薬の薬効・毒性標的組織である肝臓への取り込みを把握するため、 $^{14}\text{C}$  標識したメトホルミンとフェンホルミンを雄性ラットに経口投与して肝臓への移行性を *in vivo* で検討した。さらにラット凍結肝細胞を用いた *in vitro* 取り込み動態を解析した。

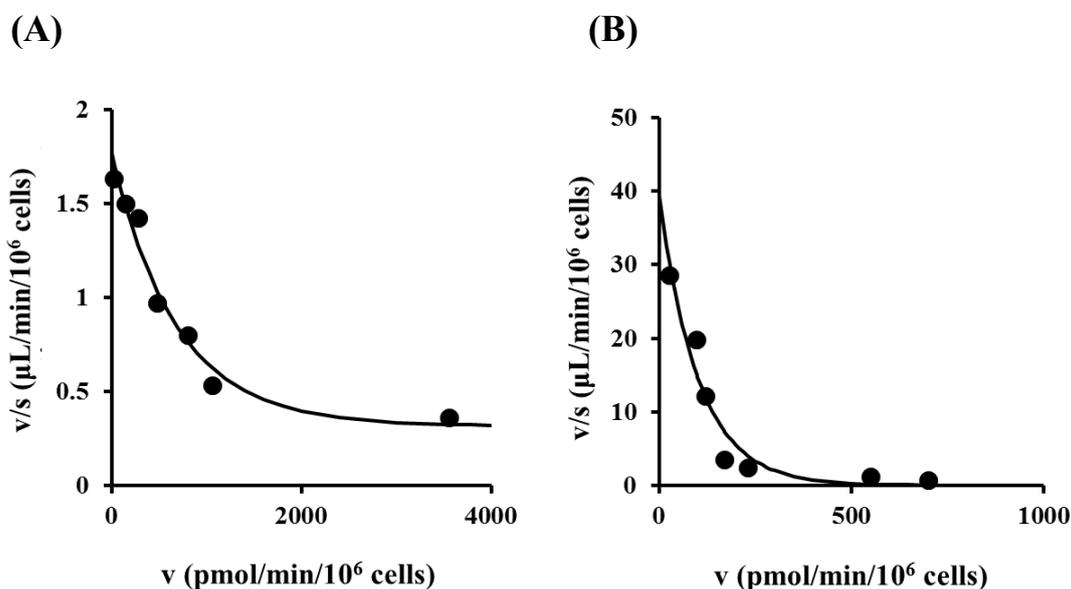
第1節ではラット *in vivo* における肝臓への移行性を検討した。その結果、メトホルミンとフェンホルミンを同じ投与量 (50 mg/kg) で経口投与したときの肝臓中濃度はいずれも血漿中濃度よりも高値を示し、肝臓に移行しやすいことが分かった。フェンホルミンはメトホルミンに比べて約 7 倍高い肝臓中濃度を示した。門脈血漿中濃度比で比較するとフェンホルミンの肝臓への移行性はメトホルミンより約 15 倍高値を示し、フェンホルミンは低い投与量でもメトホルミンと同等の肝臓内濃度に達するものと考えられた。なお、両ビグアナイドの経口投与時の吸収性についてはラットおよびヒトでいずれも 50~60%程度であり、大きな違いはない<sup>33-36</sup>。ビグアナイド薬は脂溶性が低く、生体膜を透過しにくいと考えられるが、メトホルミンの肝臓/門脈血漿中濃度比は 4 以上を示しており、血液側から肝細胞内への移行には肝取り込みの輸送系が働いていることがうかがえる。

第2節ではビグアナイド薬の生体内における代謝に関して検討した。メトホルミンは生体内で代謝されないことが報告されているが<sup>37</sup>、今回分析したラットの門脈血漿中にも代謝物は検出されなかった。一方、フェンホルミンはメトホルミンに比べて代謝を受けやすく、ヒトにおける主要な代謝物はフェニル基の 4 位が水酸化された代謝物 (4-hydroxyphenformin) である<sup>38</sup>。また、ラットの尿中にはフェンホルミンの水酸化体がグルクロン酸抱合された代謝物も報告されている<sup>35</sup>。今回、ラット *in vivo* におけるフェンホルミンの代謝を検討したところ、門脈血漿中に代謝物と思われるピークが検出された。これは全放射性成分の約 30%の割合であった。従って、肝臓内に取り込まれる放射能の 2/3 以上はフェンホルミンの挙動を反映していると考えられる。検出された代謝物の構造は検討していないが、文献情報から検出された 2 つの代謝物のうち 1 つはパラ位の水酸化体ではないかと推察している。また、フェンホルミンはラットの消化管を初回通過する際に代謝を受けることが示唆された。

第3節および第4節においては肝臓への取り込み動態の詳細な検討を行うため、ラット凍結肝細胞を用いた *in vitro* の取り込みを解析した。その結果、両ビグアナイド薬は、取り込みに飽和性が認められ、トランスポーターを介して肝細胞に取り込まれることが示唆された。速度論パラメータを比較するとフェンホルミンの  $K_m$  値 (5.17  $\mu\text{M}$ ) はメトホルミンの  $K_m$  値 (404  $\mu\text{M}$ ) よりも顕著に低値を示し、肝細胞における取り込みにおいて高い親和性を示した。メトホルミンのラット肝細胞への取り込みにおける  $K_m$  値は Umehara らの報告した値 (510  $\mu\text{M}$ ) と一致するものであった<sup>39</sup>。また、肝細胞への取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値の比較では、フェンホルミン (34.7  $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$  cells) はメトホルミン (1.58  $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$  cells) の約 22 倍の活性を示した。この取り込み活性の違いは *in vivo* の  $C_{liver}/C_{plasma}$  値の違いに相当

する値であり、ビグアナイド薬の肝細胞への取り込みが *in vivo* の肝臓への移行性を反映していることが示唆された。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるプラバスタチンは肝臓の類洞側膜に発現している有機アニオントランスポーターである organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) によって肝臓に取り込まれる<sup>40)</sup>。プラバスタチンの肝取り込みは、ビグアナイド薬と同様にラットの肝細胞を用いた *in vitro* の評価が *in vivo* の肝臓への取り込みをよく反映しており<sup>41,42)</sup>、肝臓の類洞側膜に発現するトランスポーターを介する薬物の取り込み動態は肝細胞を用いることで *in vivo* を反映した評価が行えるのではないかと考えられた。今回のラット凍結肝細胞への取り込みにおける  $P_{dir}$  値の値は  $CL_{int}$  値に比べると低値であり、メトホルミンのトランスポーターに依存した取り込みは、肝臓への取り込み全体に対して 84%、フェンホルミンは 98% を占めると見積もられた。また、Eadie-Hofstee プロットから飽和性輸送系と非飽和性輸送系の存在が示唆された (Fig. 9)。メトホルミンの肝取り込みには OCT1 が関与していることが報告されており、フェンホルミンも OCT1 によって肝臓に取り込まれていることが推察された。

以上、ビグアナイド薬はトランスポーターを介して肝臓へ取り込まれ、フェンホルミンはメトホルミンよりも肝臓への移行性が高いことが明らかになった。また、ビグアナイド薬のラット凍結肝細胞への取り込みは *in vivo* の肝臓への移行性を反映することが示唆された。



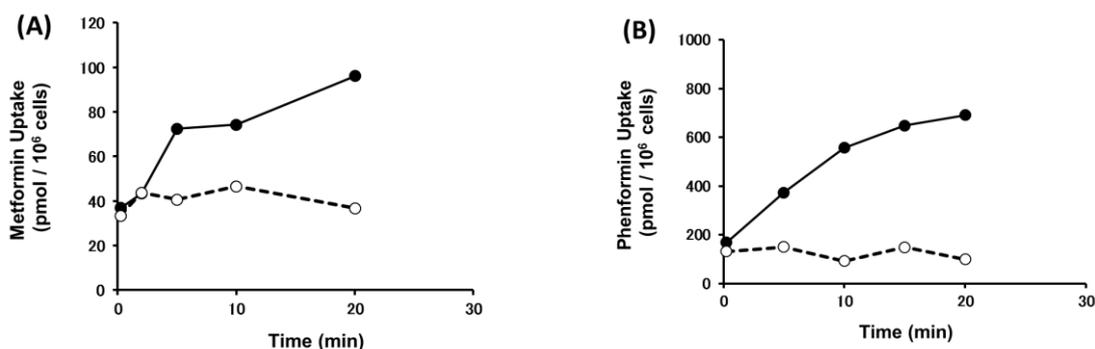
**Fig. 9. Eadie-Hofstee plots for the uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) in rat cryopreserved hepatocytes.** Uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin and  $^{14}\text{C}$ -phenformin by rat cryopreserved hepatocytes was measured at concentrations of 20, 100, 200, 500, 1000, 2000, and 10000  $\mu\text{M}$  for metformin and 1, 5, 10, 50, 100, 500, and 1000  $\mu\text{M}$  for phenformin, respectively. Each point represents the mean of three measurements.

## 第II章 ヒト肝細胞および hOCT1 発現系卵母細胞における取り込み

第I章でビグアナイド薬のラットにおける肝臓への取り込みを検討し、メトホルミンとフェンホルミンの肝臓への高い移行性が確認された。また、ラット凍結肝細胞を用いた検討により、*in vitro* の取り込みが *in vivo* の肝臓への移行性を反映することが示唆された。そこで本章では、メトホルミンとフェンホルミンのヒト肝臓への取り込み動態を把握するため、ヒト凍結肝細胞およびヒト OCT1 (hOCT1) を発現させた卵母細胞 (oocytes) を用いてビグアナイド薬の取り込みを検討した。

### 第1節 ヒト肝細胞における時間依存的な取り込み

ヒト凍結肝細胞において  $^{14}\text{C}$ -メトホルミン (20  $\mu\text{M}$ ) と  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン (20  $\mu\text{M}$ ) の時間依存的な取り込みを検討した。37°C における各ビグアナイドの取り込みは氷冷下と比べて各測定時点で高値を示した。 $^{14}\text{C}$ -メトホルミンは、取り込み開始から 20 分まではほぼ直線的な取り込みを示した。 $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンは 10 分まで直線的に取り込みが増加したが、それ以降は定常状態に達する傾向が認められた。肝細胞に取り込まれた量はフェンホルミンの方が多かった。また、氷冷下での取り込み増加は認められなかった (Fig.10)。この結果より、次節における濃度依存性の検討では、反応時間をメトホルミンは 20 分、フェンホルミンは 10 分に設定した。



**Fig. 10. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (20  $\mu\text{M}$ ) (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (20  $\mu\text{M}$ ) (B) by human hepatocytes.** Both compounds were incubated for the designated periods at 0°C (○) and 37°C (●). Each point represents the mean of two measurements.

## 第2節 ヒト肝細胞における濃度依存的な取り込み

各ビグアナイド薬のヒト凍結肝細胞への時間依存的な取り込みが認められたので、次に濃度依存性を検討した。<sup>14</sup>C-メトホルミンは20~10000 μM、<sup>14</sup>C-フェンホルミンは1~1000 μMの濃度範囲における放射能の取り込みを測定した。その結果、メトホルミンおよびフェンホルミンの取り込みは、低濃度での直線性と高濃度における飽和性を示し (Fig. 11)、Eadie-Hofsteeプロットを行うと2つのコンポーネント(飽和性と非飽和性)が認められた (Fig. 12)。両ビグアナイド薬はヒト肝細胞にトランスポーターを介して取り込まれることが示唆されたので、非線形最小二乗法 (MULTI)<sup>32)</sup>を用いて以下の Michaelis-Menten 式に当てはめ、速度論パラメータを算出した。

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) + P_{dif} \times S$$

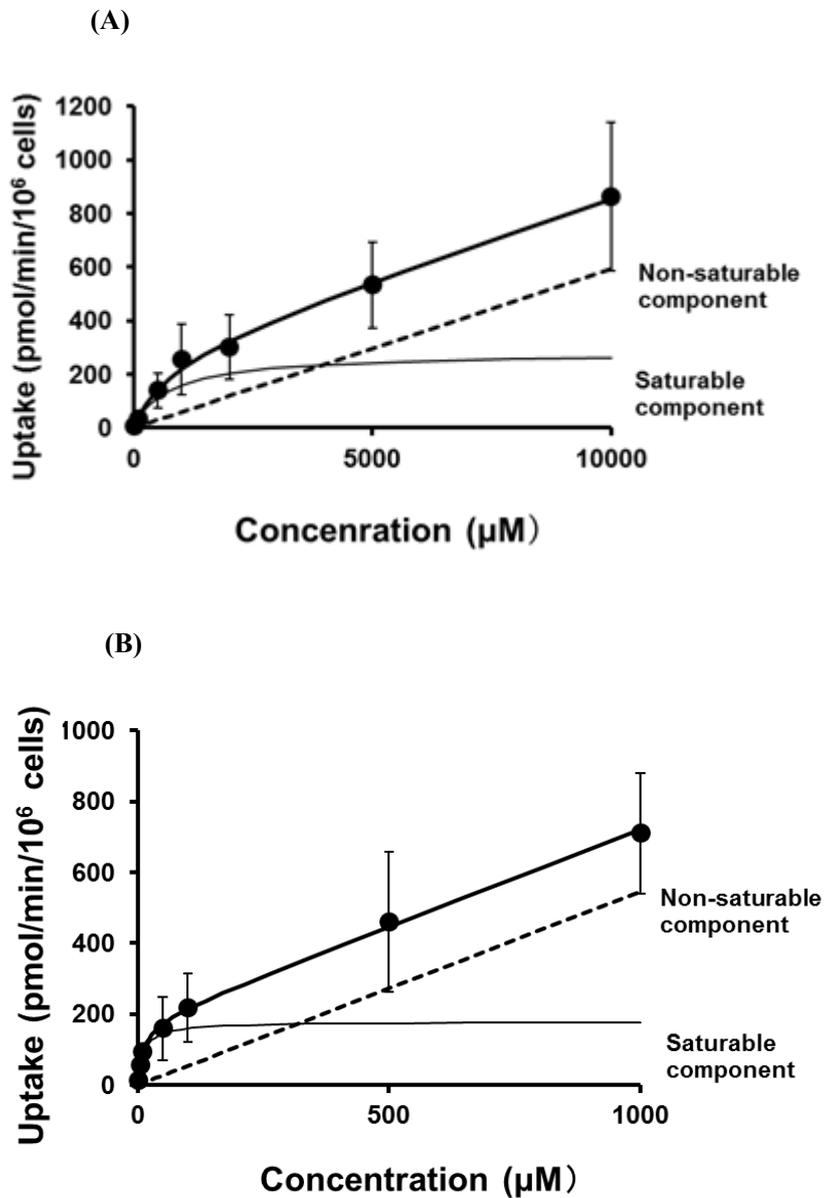
フェンホルミンの  $K_m$  値 ( $12.5 \pm 10.5 \mu\text{M}$ ) はメトホルミンの  $K_m$  値 ( $907 \pm 324 \mu\text{M}$ ) よりも約 1/70 と小さい値であった。 $V_{max}$  値はフェンホルミンが  $192 \pm 145 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ 、メトホルミンが  $287 \pm 112 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$  であり、取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値はフェンホルミンが  $16.4 \pm 2.5 \mu\text{L/min}/10^6 \text{ cells}$ 、メトホルミンが  $0.377 \pm 0.262 \mu\text{L/min}/10^6 \text{ cells}$  とフェンホルミンが約 43 倍大きかった。また、非特異的取り込みクリアランス  $P_{dif}$  値はフェンホルミンが  $0.527 \pm 0.054 \mu\text{L/min}/10^6 \text{ cells}$ 、メトホルミンが  $0.0588 \pm 0.0154 \mu\text{L/min}/10^6 \text{ cells}$  であった (Table 3)。

**Table 3. Kinetic parameters for the uptake of <sup>14</sup>C-metformin and <sup>14</sup>C-phenformin by human cryopreserved hepatocytes.**

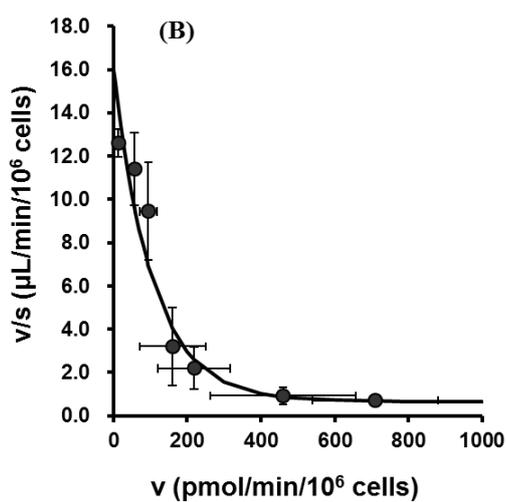
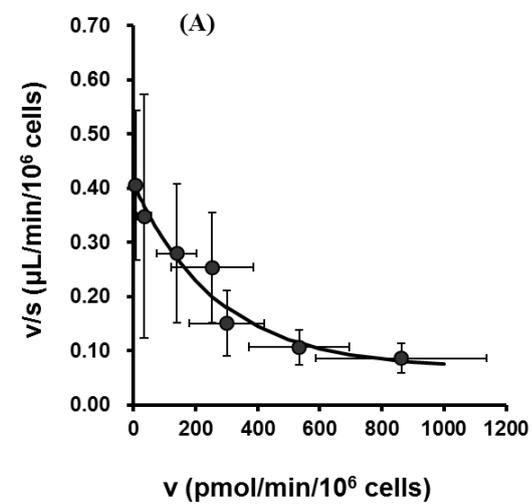
| Parameters                                 | Metformin       | Phenformin    |
|--|-----------------|---------------|
| $K_m$ (μM)                                 | 907 ± 324       | 12.5 ± 10.5   |
| $V_{max}$ (pmol/min/10 <sup>6</sup> cells) | 287 ± 112       | 192 ± 145     |
| $P_{dif}$ (μL/min/10 <sup>6</sup> cells)   | 0.0588 ± 0.0154 | 0.527 ± 0.054 |
| $CL_{int}$ (μL/min/10 <sup>6</sup> cells)  | 0.377 ± 0.262   | 16.4 ± 2.5    |

Kinetic parameters were obtained by nonlinear least-squares regression analysis (MULTI).

Values of intrinsic clearance were calculated as follows:  $V_{max}/K_{max}$ . The data are means ± SD with three different batches of hepatocytes.



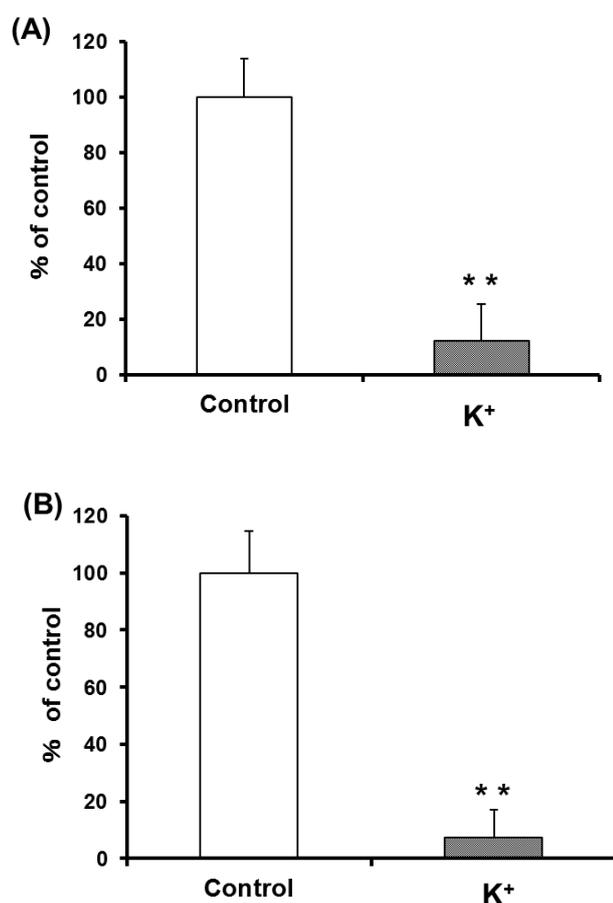
**Fig. 11. Concentration dependence of uptake of <sup>14</sup>C-metformin (A) and <sup>14</sup>C-phenformin (B) by human cryopreserved hepatocytes.** <sup>14</sup>C-metformin was incubated in a concentration range from 20 to 10000 μM at 37°C for 20 min. <sup>14</sup>C-phenformin was incubated in a concentration range from 1 to 1000 μM at 37°C for 10 min. Experiments were conducted using hepatocytes from three different batches. Each point represents the mean ± SD.



**Fig. 12. Eadie-Hofstee plots for the uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) in human cryopreserved hepatocytes.** Uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin and  $^{14}\text{C}$ -phenformin by human cryopreserved hepatocytes was measured at concentrations of 20, 100, 500, 1000, 2000, 5000, and 10000  $\mu\text{M}$  for metformin and 1, 5, 10, 50, 100, 500, and 1000  $\mu\text{M}$  for phenformin, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three different batches of hepatocytes.

### 第3節 取り込みに対する $K^+$ イオンの影響

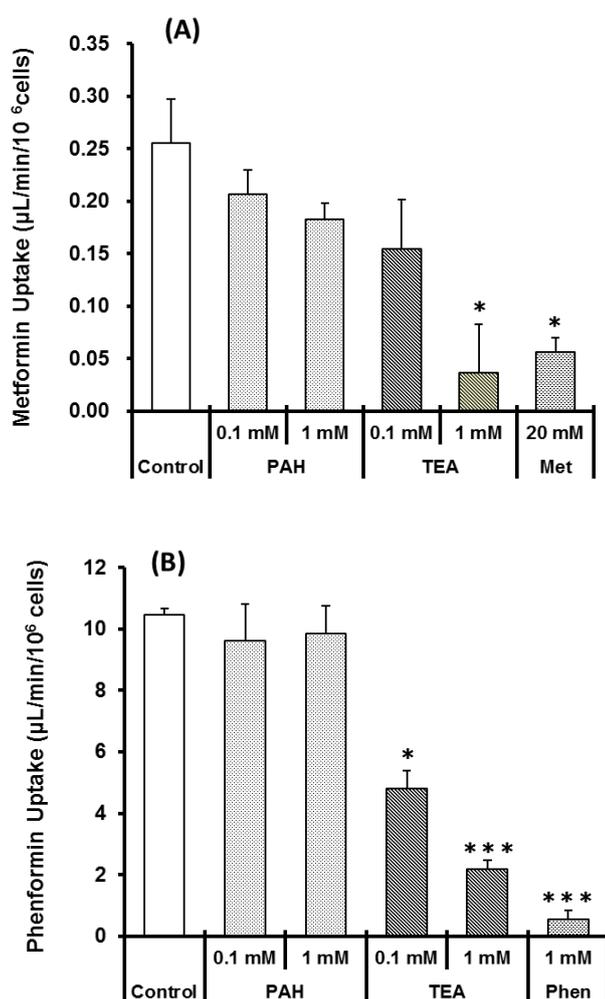
メトホルミンはカチオン性の化合物であり、ヒト肝細胞内への輸送は有機カチオントランスporter-1 (hOCT1) を介することが報告されている。OCT は膜電位に依存した化合物の輸送を担っており、この膜電位を抑制すると OCT による輸送を阻害することができる。そこで、膜電位の効果を低減する  $K^+$  buffer の影響を検討した結果、 $K^+$  buffer を加えることによりメトホルミンおよびフェンホルミンともに肝細胞内への取り込み量が大きく減少することが認められた。ヒトの肝臓には hOCT1 が特異的に発現していることから、フェンホルミンの肝取り込みはメトホルミンと同様に hOCT1 を介したものであることが示唆された (Fig. 13)。



**Fig. 13. Effect of membrane potential on  $^{14}C$ -metformin (A) and  $^{14}C$ -phenformin (B) uptake by human hepatocytes.** The hepatocytes were incubated with high  $K^+$  incubation medium at  $37^\circ C$  for 10 min with  $20 \mu M$   $^{14}C$ -metformin (A) or for 5 min with  $1 \mu M$   $^{14}C$ -phenformin (B). Each column represents the mean  $\pm$  SD of three measurements. \*\*Significant difference from the control ( $p < 0.01$ ).

#### 第4節 ビグアナイド取り込みに対する代表的基質の阻害効果

ヒト肝細胞におけるビグアナイド薬の取り込みに関与するトランスポーターについてさらに検討するため、有機アニオントランスポーター (OAT) の代表的な基質である *p*-アミノ馬尿酸 (PAH) と有機カチオントランスポーター (OCT) の代表的な基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を用い阻害効果の検討を行った。その結果、メトホルミンおよびフェンホルミンともに TEA で濃度依存的に取り込みが阻害されたが、PAH では有意な阻害効果は認められなかった (Fig. 14)。この結果から、メトホルミンとフェンホルミンは hOCT1 で肝臓内に取り込まれることが示唆された。

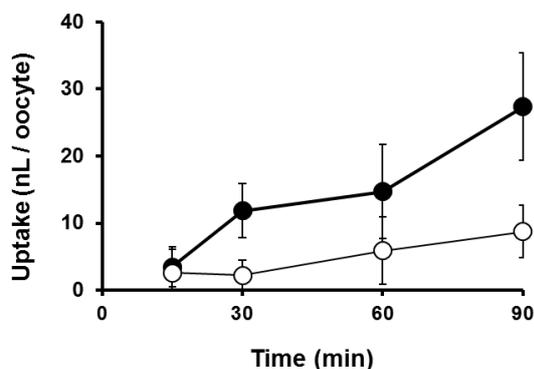


**Fig. 14. Inhibitory effect of PAH and TEA on <sup>14</sup>C-metformin (A) and <sup>14</sup>C-phenformin (B) uptake by human hepatocytes.** The hepatocytes were incubated with respective compounds at 37°C for 10 min with 20 μM <sup>14</sup>C-metformin (A) or for 5 min with 1 μM <sup>14</sup>C-phenformin (B). Each column represents the mean ± SD of three measurements. Asterisk indicates a significant difference from the control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

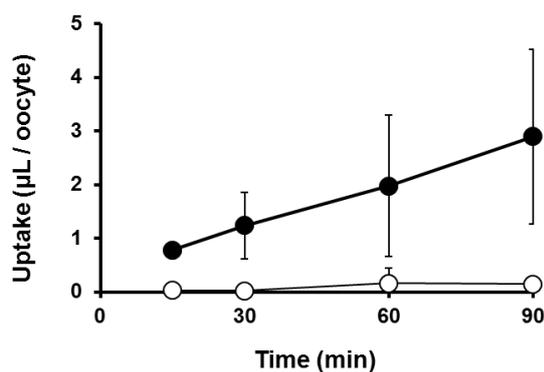
## 第5節 卵母細胞発現系における時間依存的な取り込み

ヒト肝細胞を用いた検討結果から、メトホルミンおよびフェンホルミンはhOCT1によって肝細胞内に取り込まれることが示唆された。これまでにメトホルミンの肝取り込みはhOCT1を介したものであることが報告されているが、フェンホルミンに関する詳細は不明である。そこでフェンホルミンの肝細胞への取り込みがhOCT1によるものかを明らかにするため、hOCT1を発現させた卵母細胞(oocytes)で両ビグアナイドの取り込みについて検討を行った。各ビグアナイド薬の時間依存的な取り込みを $^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンを用いて検討した結果、各ビグアナイド薬ともに反応時間に応じた取り込み量が増加し、取り込み開始から90分までの直線性が認められた。水をインジェクションしたoocytes(コントロール)ではほとんど取り込みの増加は認められなかった。(Fig. 15)。

(A)



(B)



**Fig. 15. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (20  $\mu\text{M}$ ) (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (20  $\mu\text{M}$ ) (B) by hOCT1 expressing oocytes. Both compounds were incubated for the designated periods in hOCT1 (●) and water injected oocytes as a control (○). Each point represents the mean  $\pm$  SD of ten oocytes.**

## 第6節 卵母細胞発現系における濃度依存的な取り込み

hOCT1を発現させた oocytes において各ビグアナイド薬の時間依存的な取り込みが認められたので、取り込みの濃度依存性を検討した。<sup>14</sup>C-メトホルミンは 20~10000  $\mu\text{M}$ 、<sup>14</sup>C-フェンホルミンは 1~1000  $\mu\text{M}$  の濃度範囲で、放射能の取り込み量を測定した。その結果、メトホルミンおよびフェンホルミンの取り込みは、低濃度での直線性と高濃度における飽和性が認められた (Fig. 16)。両ビグアナイド薬は hOCT1 を介して取り込まれることが示唆されたので、非線形最小二乗法 (MULTI) <sup>32)</sup>を用いて以下の Michaelis-Menten 式に当てはめ、速度論パラメータを算出した。

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) + P_{dif} \times S$$

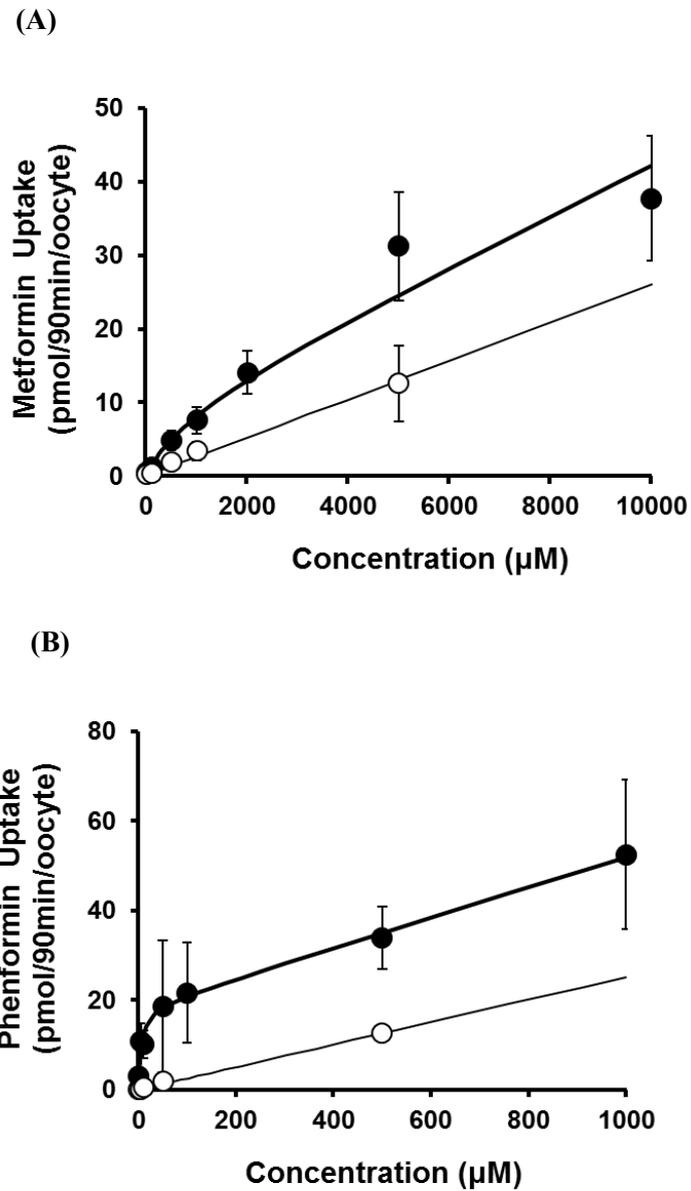
フェンホルミンの  $K_m$  値は 5.59  $\mu\text{M}$ 、メトホルミンは 932  $\mu\text{M}$  であった。 $V_{max}$  値はフェンホルミンが 1.83 pmol/min/oocyte、メトホルミンが 8.94 pmol/min/oocyte であり、取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値はフェンホルミンが 0.327  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ 、メトホルミンが 0.00959  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  とフェンホルミンが約 34 倍大きな値であった。非特異的取り込みクリアランス  $P_{dif}$  値はフェンホルミンが 0.0338  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ 、メトホルミンが 0.00340  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  であった (Table 4)。

**Table 4. Kinetic parameters for the uptake of <sup>14</sup>C-metformin and <sup>14</sup>C-phenformin by hOCT1 expressing oocytes.**

| Parameters  | Metformin | Phenformin |
|---|-----------|------------|
| $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )                               | 932       | 5.59       |
| $V_{max}$ (pmol/min/oocyte)                           | 8.94      | 1.83       |
| $P_{dif}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ )  | 0.00340   | 0.0338     |
| $CL_{int}$ ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) | 0.00959   | 0.327      |

Kinetic parameters were obtained by nonlinear least-squares regression analysis (MULTI).

Values of intrinsic clearance were calculated as follows:  $V_{max}/K_{max}$ . The data are means of values for ten oocytes.



**Fig. 16. Concentration dependence of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) by oocytes stably expressing hOCT1 (●) and water injected oocytes as a control (○).  $^{14}\text{C}$ -metformin was incubated in a concentration range from 20 to 10000  $\mu\text{M}$  at 37°C for 90 min.  $^{14}\text{C}$ -phenformin was incubated in a concentration range from 1 to 1000  $\mu\text{M}$  at 37°C for 90 min. Each point represents the mean  $\pm$  SD of ten oocytes.**

## 第7節 小括

本章では、ヒト凍結肝細胞および hOCT1 を発現させた卵母細胞におけるビグアナイド薬の取り込み動態特性について検討を行った。

第1節ではヒト凍結肝細胞におけるビグアナイド薬の時間依存的な取り込みを検討した結果、 $^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンともに反応時間に依存した肝細胞への取り込み量の増加が認められた。氷冷下で反応させると肝細胞への取り込みはほとんど増加しなかったことから、各ビグアナイド薬がトランスポーターを介して肝細胞内に取り込まれていることが示唆された。

第2節ではヒト凍結肝細胞における各ビグアナイド薬の濃度依存性を検討した。いずれのビグアナイド薬も濃度依存的に取り込み量が増加したが、その取り込みには飽和性が認められた。速度論パラメータは、メトホルミンの  $K_m$  値 ( $907\ \mu\text{M}$ ) に対してフェンホルミンの  $K_m$  値 ( $12.5\ \mu\text{M}$ ) は約  $1/70$  と小さかった。 $V_{\max}$  値はそれぞれ、 $287\ \text{pmol}/\text{min}/10^6\ \text{cells}$  と  $192\ \text{pmol}/\text{min}/10^6\ \text{cells}$  であり、取り込み活性を示す  $CL_{\text{int}}$  値はメトホルミンが  $0.377\ \mu\text{L}/\text{min}/10^6\ \text{cells}$ 、フェンホルミンが  $16.4\ \mu\text{L}/\text{min}/10^6\ \text{cells}$  と約 43 倍大きな値を示した。従って、フェンホルミンはメトホルミンよりもヒト凍結肝細胞において親和性が高く、取り込み活性も高いことが分かった。非特異的取り込みクリアランスを示す  $P_{\text{diff}}$  値は  $CL_{\text{int}}$  値に比べると小さい値であり、メトホルミンのトランスポーターに依存した肝取り込みは、肝取り込み全体に対して約 87%、フェンホルミンは約 97% を占めると考えられた。また、Eadie-Hofstee プロットから、飽和性と非飽和性の輸送系の存在が示唆された。これらの結果は、第I章のラット肝細胞における取り込みの結果とよく相関しており、ヒトの肝臓においてもフェンホルミンはメトホルミンと比較して肝臓に移行しやすいと考えられた。一般的に適度な脂溶性を持つ化合物は生体膜の透過性が良好であることが知られているが<sup>43)</sup>、メトホルミンとフェンホルミンの  $\log P$  値はそれぞれ、 $-1.43$  および  $-0.84$  であり、高い水溶性を有する薬物である<sup>44,45)</sup>。このような物性であるが肝細胞内への移行性は良好であり、単純拡散だけではなくトランスポーターの関与が示唆された。

第3節ではヒト凍結肝細胞への取り込みに対する  $\text{K}^+$  buffer の影響を検討した。OCT を介した経細胞輸送は膜電位に依存しており<sup>46)</sup>、その膜電位が低下すれば取り込み量が低下する。 $\text{K}^+$  buffer は膜電位を低下させる効果があり、この  $\text{K}^+$  buffer の添加によってビグアナイド薬の取り込みが大きく低下したことから、肝細胞への取り込みは膜電位に依存したものと推察された。

第4節においては、ビグアナイド薬の取り込みに対する各種トランスポーターの代表的な基質による阻害効果を検討した。OCT の代表的な基質である TEA を添加すると、その添加濃度に依存した取り込み阻害が認められた。OAT の代表的な基質である PAH では有意な阻害効果は認められず、肝細胞への取り込みが OCT によることが示唆された。以上の結果から、ビグアナイド薬のヒト肝細胞への取り込みは OCT によるものであることが推察され

た。ヒトの肝臓では hOCT1 が特異的に発現していることから、次に hOCT1 を発現させた oocytes を用いた検討を行った。

第 5 節および第 6 節ではビグアナイド薬の hOCT1 による取り込み動態について oocytes 発現系を用いて解析した。<sup>14</sup>C-メトホルミンおよび <sup>14</sup>C-フェンホルミンともに反応時間に依存した oocytes への取り込み量の増加が認められ、hOCT1 を介して oocytes に取り込まれていることが示唆された。次に、濃度依存性を検討した結果、放射能の取り込み量は水をインジェクションした oocytes (コントロール) に比べて高値を示し、濃度依存的に取り込まれ、その取り込みには飽和性が認められた。hOCT1 に対するメトホルミンとフェンホルミンの  $K_m$  値はメトホルミンの 932  $\mu\text{M}$  に対してフェンホルミンは 5.59  $\mu\text{M}$  であり、取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値はメトホルミンが  $9.59 \times 10^{-3} \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ 、フェンホルミンが  $327 \times 10^{-3} \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  であり、フェンホルミンが約 34 倍大きな値であった。hOCT1 に対する  $K_m$  値はヒト肝細胞で得られた  $K_m$  値 (12.5  $\mu\text{M}$ ) とほぼ同じ値を示しており、肝細胞への取り込みは hOCT1 を介したものであると考えられた。また、メトホルミンの hOCT1 に対する  $K_m$  値はこれまでに報告されている HEK293 に発現させた hOCT1 の  $K_m$  値とほぼ同等の値であった。これまでメトホルミンが hOCT1 の基質であることは報告されていたが、フェンホルミンについては不明であった。今回の結果から、フェンホルミンはメトホルミンに比べて hOCT1 に対する親和性が高く、取り込み活性も高いことが示され、メトホルミンよりも特異性が高い良好な基質であることが明らかになった。hOCT1 はヒトの肝臓の類洞側膜に発現しており<sup>22,23</sup>、ビグアナイド薬の肝臓への取り込みに寄与していると考えられる。従って、ヒトにおいてフェンホルミンはメトホルミンに比べて肝臓への移行性がより高いと推察される。国内におけるメトホルミンの 1 回あたりの最大投与量は 750 mg であるのに対して、フェンホルミンの過去の投与量は 1 回あたり 50 mg と推察され<sup>47-49</sup>、メトホルミンに比較すると低用量である。フェンホルミンはメトホルミンに比べてミトコンドリア膜への結合が強いため薬効も強力であると考えられている<sup>29</sup>。一方、メトホルミンは体内で代謝を受けないが<sup>37</sup>、フェンホルミンはデブリソキンと同じ CYP 分子種で代謝されることから、主に CYP2D6 による代謝を受けると考えられる<sup>50,51</sup>。なお、両ビグアナイド薬の経口吸収性には大きな違いはないと考えられる<sup>33-36</sup>。これらの結果から、フェンホルミンがメトホルミンよりも低用量で薬効を示すのは、標的組織の肝臓への移行性が良好であることが 1 つの要因であり、上記の hOCT1 に対するビグアナイド薬の特性を反映していると考えられる。

ヒト肝細胞への取り込みが hOCT1 を介するものであることが明らかとなったが、hOCT1 には遺伝子多型が認められている<sup>52-56</sup>。Kerb らは、57 名の健康なコーカシアンの hOCT1 遺伝子を解析し、25 種の SNP のうち 5 種がアミノ酸変異を伴い、そのうち 3 種類は基質認識性を変化させる変異であると報告している<sup>52</sup>。また、Shu らはコーカシアンを含む多様な人種 494 名の遺伝子を解析して、15 種のアミノ酸変異を伴う SNP のうち輸送活性の低下した 5 種と輸送活性の上昇した 1 種類の変異を報告している<sup>53</sup>。さらに、これらのメトホ

ルミン輸送活性の低下する 4 種類 (p.Arg61Cys, p.Gly401Ser, p.Met420deletion, p.Gly465Arg) の SNP を有する健康成人にメトホルミンを投与して、薬効と体内動態評価を実施している<sup>57,58</sup>)。変異を有する健康成人と野生型をホモ接合型で有する健康成人においてメトホルミンの糖負荷後の血糖値の変化を比較すると、野生型ではメトホルミン投与後に良好な血糖降下作用が認められるのに対して、変異を有する群では血糖降下作用の減弱が認められている。また、同じ被験者群を対象として体内動態を比較したところ、変異を有する被験者では AUC が有意に高くなっており、CL/F は有意に低くなることが観察されている。この結果は hOCT1 の輸送活性が低下することによってメトホルミンの肝臓への取り込みが低下し薬効が減弱し、分布容積が小さくなったことで血中濃度が上昇したものと考えられる。また、ビッグアライド薬の肝臓への取り込みと乳酸アシドーシス発現に関して Oct1 ノックアウトマウスにおける検討がなされている<sup>59</sup>)。野生型マウスにメトホルミンを定速静注するとノックアウトマウスに比べて肝臓中濃度は高値を示し、血中乳酸値の上昇が認められた。一方、ノックアウトマウスでは肝臓中濃度は野生型に比べて約 1/10 程度と低く、血中乳酸値の上昇も低かった。この結果は、ビッグアライド薬の肝取り込みは Oct1 によって制御されており、その取り込み活性の変動によって血中乳酸値も変動する可能性を示唆している。従って、hOCT1 はビッグアライド薬の薬効や毒性発現に影響を与える要因と考えられるが、その機能変化によって肝臓への取り込み量は減少することから毒性発現頻度を高める可能性は低いと推察される。

以上、フェンホルミンはメトホルミンに比べて hOCT1 に対する親和性が高く、取り込み活性も高いことが明らかになった。hOCT1 はビッグアライド薬の肝臓への移行性を支配する要因であり、薬効や毒性発現に関与していると考えられたが、毒性発現頻度を高める要因ではないと推察された。

### 第III章 hOCT2 を介したビグアナイドの動態

第I章および第II章においてはビグアナイド薬の肝臓への取り込み動態について検討した。一方、ビグアナイド薬の体内動態の観点からは、主な消失経路である腎排泄も重要なターゲットである。メトホルミンはヒトに経口投与後、生体内で代謝を受けず、未変化体として投与量の約50%が尿中に排泄され<sup>34)</sup>、静脈内投与した場合には99%が尿中に排泄される<sup>37)</sup>。フェンホルミンは体内で代謝を受けるが、経口投与後の尿中には未変化体として投与量の約40~50%が排泄される<sup>36)</sup>。したがってビグアナイド薬の腎排泄を制御する要因は体内動態の変動にも影響を与える可能性が考えられる。

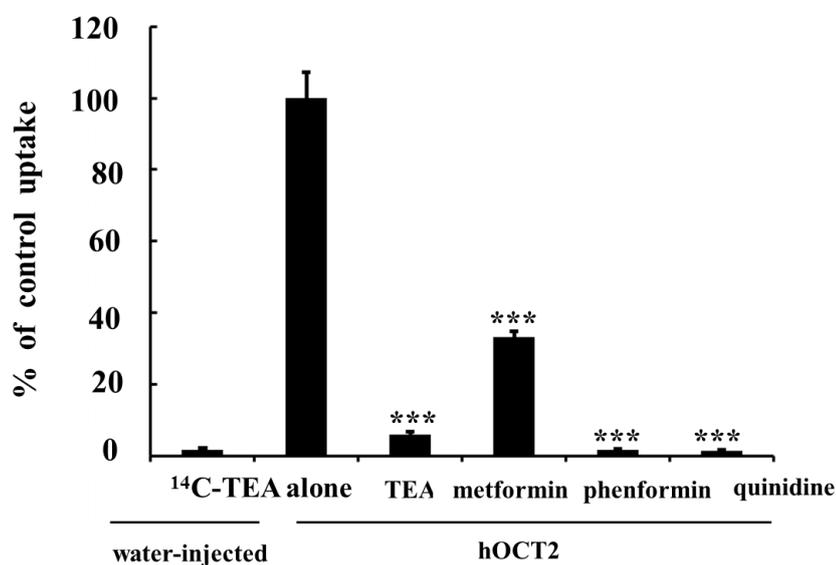
ヒト腎近位尿細管上皮細胞の側底膜に発現するhOCT2は、カチオン性基質の腎臓への取り込みに関与するトランスポーターである<sup>24)</sup>。OCT2の機能が低下するとメトホルミンの体内動態が変動することが報告されており、マウスの腎臓に発現する2種のOct1とOct2をダブルノックアウトしたマウスにメトホルミンを静脈内投与すると、野生型マウスに比べて血漿中濃度(AUC<sub>0-∞</sub>)が約4.5倍上昇する<sup>60)</sup>。これは、腎臓への取り込みが低下したためと考えられる。また、*in vitro*でメトホルミンの輸送活性が低下するhOCT2の変異を有する健康成人にメトホルミンを投与すると、腎排泄量の低下と血漿中濃度の上昇が認められる<sup>61)</sup>。このように、hOCT2はメトホルミンの腎排泄に影響を及ぼす重要な要因であり、その機能変化はメトホルミンの体内動態の変動に関連している。一方、フェンホルミンとhOCT2に関する詳細な検討はこれまでになされておらず、ビグアナイド薬の腎排泄に関与する要因を明らかにするためにhOCT2を発現した卵母細胞(oocytes)を用いた検討を行った。なお、本章ではhOCT2の他にも、有機カチオントランスポーターのhOCT1とhOCT3について評価を行った。

#### 第1節 卵母細胞発現系における取り込みに対する阻害効果

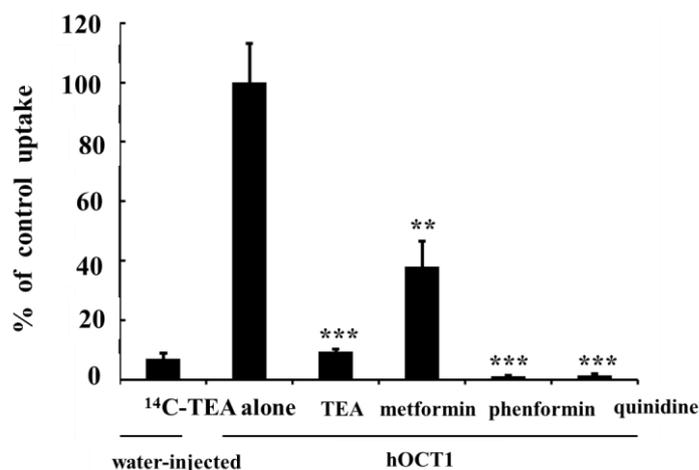
hOCT2の代表的な基質の取り込みに対するビグアナイド薬の阻害作用を確認するため、hOCT2を発現させた卵母細胞(oocytes)を用いて検討した。hOCT2の代表的な基質として<sup>14</sup>C標識したテトラエチルアンモニウム(TEA)を用いた。また、hOCT1の代表的な基質にはTEA、hOCT3の代表的な基質としては<sup>3</sup>H標識した1-メチル-4-フェニルピリジニウム(MPP<sup>+</sup>)を使用し、各トランスポーターの阻害剤としてキニジンを用いた。阻害作用は<sup>14</sup>C-TEAおよび<sup>3</sup>H-MPP<sup>+</sup>の放射能の取り込み量の変化で評価した。

hOCT2を発現させたoocytesにおける<sup>14</sup>C-TEA(10 μM)の取り込みは、メトホルミン(1 mM)およびフェンホルミン(1 mM)によって有意に阻害された。フェンホルミンの阻害能はメトホルミンよりも強かった(Fig. 17)。hOCT1を発現させたoocytesにおいても<sup>14</sup>C-TEAの取り込みは両ビグアナイド薬によって有意に阻害された。hOCT2と同様、フェ

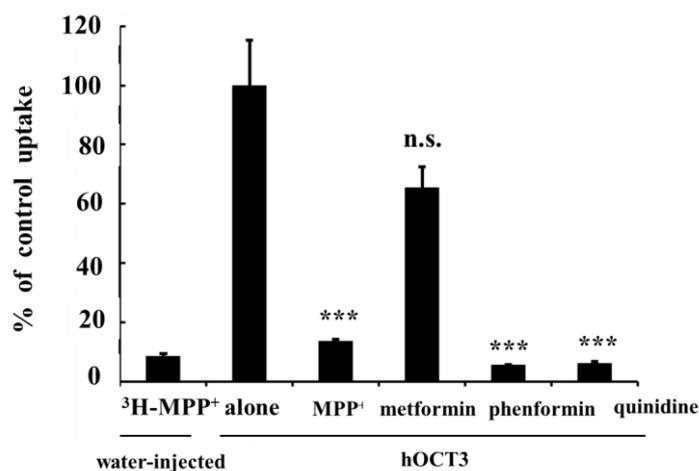
ンホルミンはメトホルミンよりも阻害能が強かった (Fig. 18)。hOCT3 を発現させた oocytes ではフェンホルミンが  $^3\text{H-MPP}^+$  の取り込みを有意に阻害したが、メトホルミンでは阻害傾向が認められたものの、有意な阻害作用ではなかった (Fig. 19)。阻害剤のキニジンは、各 hOCT において代表的な基質の取り込みを有意に阻害した。各 hOCT における阻害率を Table 5 に示した。



**Fig. 17. Inhibitory effect of unlabeled TEA, metformin, phenformin, and quinidine on hOCT2-mediated  $^{14}\text{C-TEA}$  (10  $\mu\text{M}$ ) uptake in oocytes.** Compounds were incubated with respective compounds at room temperature for 60 min with TEA, metformin, phenformin, and quinidine at 1 mM, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).



**Fig. 18. Inhibitory effect of unlabeled TEA, metformin, phenformin, and quinidine on hOCT1-mediated <sup>14</sup>C-TEA (10 μM) uptake in oocytes.** Compounds were incubated with respective compounds at room temperature for 60 min with TEA, metformin, phenformin, and quinidine at 1 mM, respectively. Each column represents the mean ± S of 6 determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control (\*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001).



**Fig. 19. Inhibitory effect of unlabeled MPP<sup>+</sup>, metformin, phenformin, and quinidine on hOCT3-mediated <sup>3</sup>H-MPP<sup>+</sup> (0.05 μM) uptake in oocytes.** Compounds were incubated with respective compounds at room temperature for 60 min with MPP<sup>+</sup> at 30 μM and metformin, phenformin, and quinidine at 1 mM, respectively. Each column represents the mean ± SE of 6 determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control (n.s., not significant; \*\*\*: p < 0.001).

**Table 5. Summary of inhibitory potencies of biguanides on hOCT1-3 mediated transport.**

| Transporter | Probe substrate  | Reference inhibitor | Results (% of control) |              |               |
|-------------|------------------|---------------------|------------------------|--------------|---------------|
|             |                  |                     | Metformin              | Phenformin   | Reference     |
| hOCT1       | TEA              | Quinidine           | 37.9 ± 8.6**           | 1.2 ± 0.2*** | 1.3 ± 0.5***  |
| hOCT2       | TEA              | Quinidine           | 33.3 ± 1.4***          | 1.7 ± 0.1*** | 1.4 ± 0.3***  |
| hOCT3       | MPP <sup>+</sup> | Quinidine           | 65.5 ± 7.1             | 5.5 ± 0.2*** | 6.3 ± 0.3 *** |

Each value represents the mean ± SE of 6 determinations. p < 0.01; and \*\*\*, p < 0.001 vs. control.

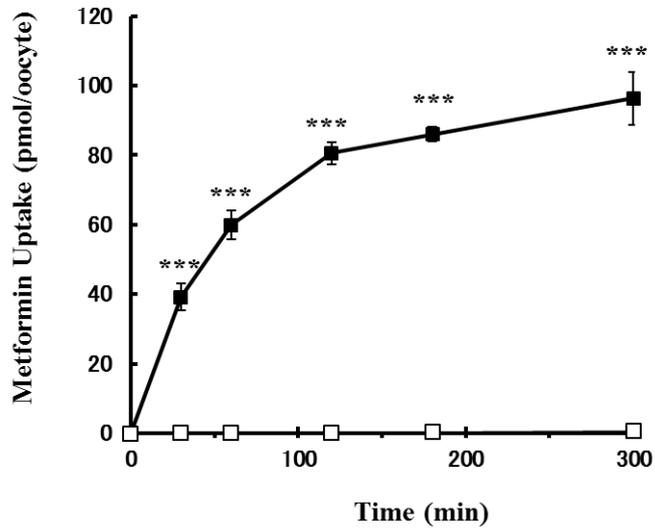
## 第2節 卵母細胞発現系における時間依存的な取り込み

第1節の検討において hOCT2 の代表的基質の取り込みに対して有意な阻害作用が認められたため、ビグアナイド薬について時間依存的な取り込みを検討した。

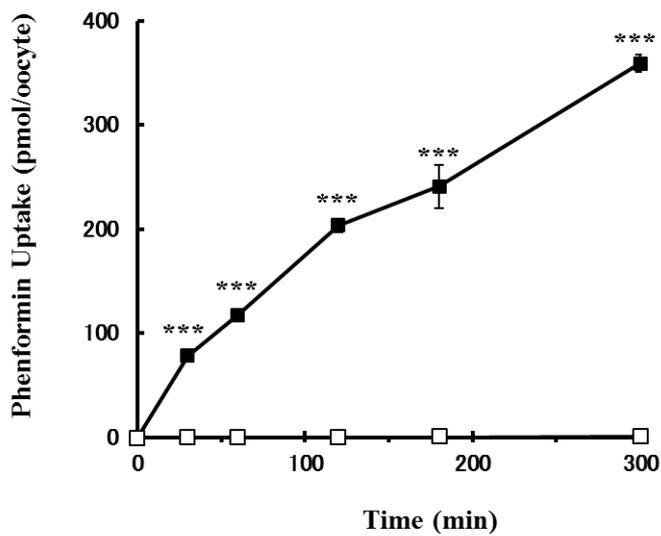
hOCT2 を発現させた oocytes において <sup>14</sup>C-メトホルミン (20 μM) と <sup>14</sup>C-フェンホルミン (20 μM) の時間依存的な取り込みを検討した。各ビグアナイドの取り込みは、水をインジェクションした oocytes (コントロール) に比べて各測定時点で有意に高値を示した。<sup>14</sup>C-メトホルミンの取り込みは 60 分までほぼ直線的に増加したが、その後定常状態に達する傾向が認められた。<sup>14</sup>C-フェンホルミンは 300 分まで直線的な取り込みの増加が認められた。取り込み量はフェンホルミンの方が多かった (Fig.20)。この結果より、次節における濃度依存性の検討では、取り込みの反応時間を 60 分に設定した。

また、hOCT1 を発現させた oocytes における <sup>14</sup>C-メトホルミン (20 μM) および <sup>14</sup>C-フェンホルミン (20 μM)、hOCT3 を発現させた oocytes における <sup>14</sup>C-フェンホルミン (20 μM) の時間依存的な取り込みを検討した結果、ビグアナイド薬の取り込みはコントロールに比べて各測定時点で有意に高値を示し、いずれも 300 分までほぼ直線的に取り込みが増加した (Fig. 21 および Fig. 22)。この結果より、次節における濃度依存性の検討では、取り込みの反応時間を 120 分に設定した。なお、メトホルミンは hOCT3 における代表的な基質である MPP<sup>+</sup> の取り込み阻害に有意差が認めなかったことから時間依存性の検討は実施しなかった。

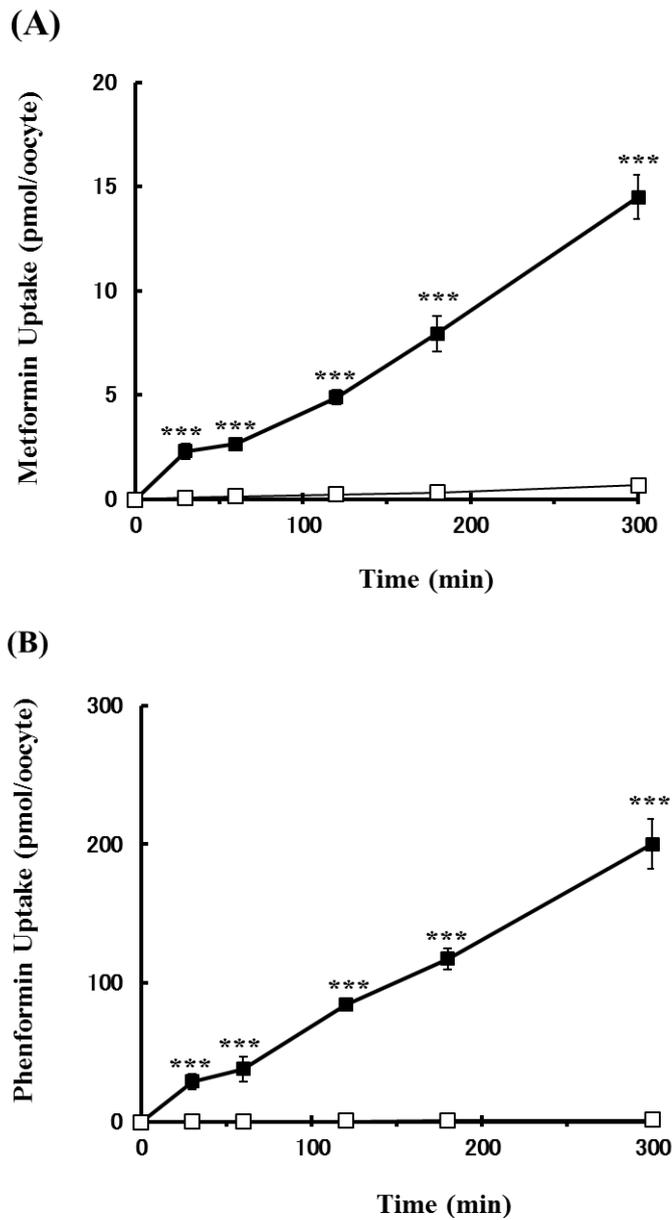
(A)



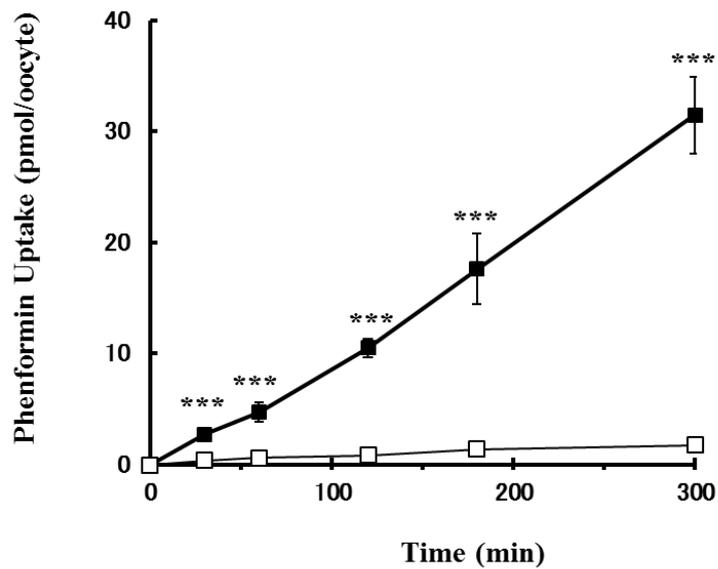
(B)



**Fig. 20. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (20  $\mu\text{M}$ ) (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (20  $\mu\text{M}$ ) (B) by hOCT2 expressing oocytes. Both compounds were incubated for the designated periods in hOCT2 (■) and water injected oocytes as a control (□). Each point represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. water injected oocytes.**



**Fig. 21. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (20  $\mu\text{M}$ ) (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (20  $\mu\text{M}$ ) (B) by hOCT1 expressing oocytes. Both compounds were incubated for the designated periods in hOCT1 (■) and water injected oocytes as a control (□). Each point represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. water injected oocytes.**



**Fig. 22. Time course of uptake of  $^{14}\text{C}$ -phenformin ( $20\ \mu\text{M}$ ) by hOCT3 expressing oocytes.**  $^{14}\text{C}$ -phenformin was incubated for the designated periods in hOCT3 (■) and water injected oocytes as a control (□). Each point represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. water injected oocytes.

### 第3節 卵母細胞発現系における濃度依存的な取り込み

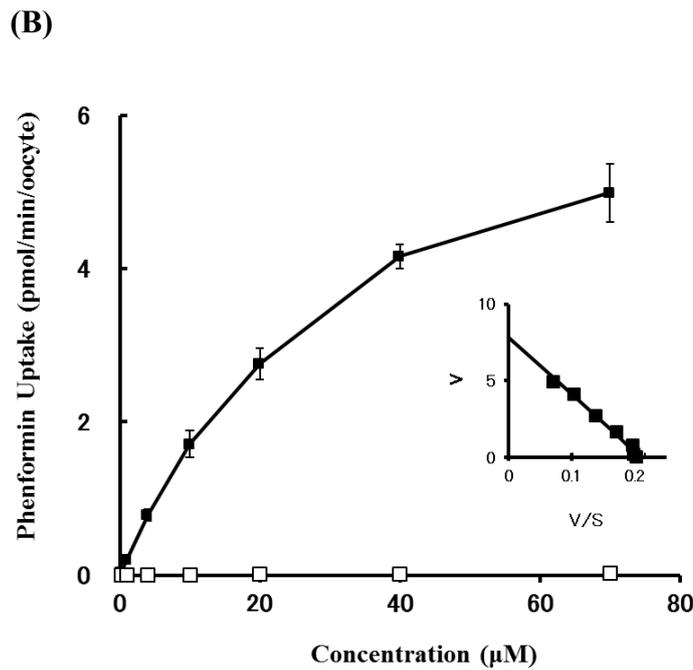
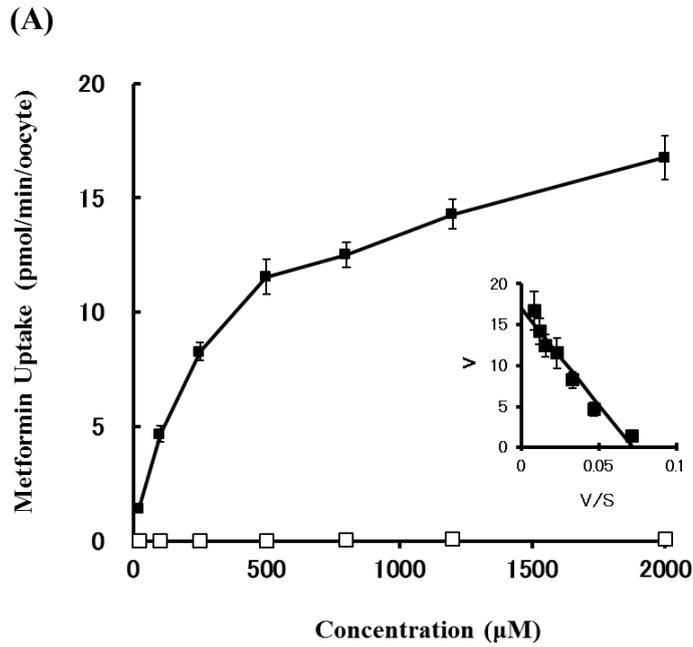
hOCT2 を発現させた oocytes を用いて  $^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンの濃度依存性について検討した。反応時間は第2節で検討した結果を基に設定した。速度論パラメータの  $K_m$  値および  $V_{\max}$  値は Eadie-Hofstee プロットから算出し、非特異的取り込みクリアランスである  $P_{\text{dif}}$  値は水をインジェクションした oocytes (コントロール) の取り込み量から見積もった。

hOCT2 を発現させた oocytes における  $^{14}\text{C}$ -メトホルミンと  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンの取り込み動態を調べるため、 $^{14}\text{C}$ -メトホルミン (20~2000  $\mu\text{M}$ ) および  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン (0.2~70  $\mu\text{M}$ ) の濃度依存的な取り込みを検討した。

各ビグアナイド薬ともに濃度依存的に取り込まれ、その取り込みは低濃度での直線性と高濃度における飽和性を示し (Fig. 23)、各ビグアナイドが hOCT2 を介して oocytes に取り込まれていることが示唆された。コントロールにおける取り込みはわずかであった。Eadie-Hofstee プロットでは、いずれのビグアナイドも直線性を示した。速度論パラメータは  $K_m$  値はメトホルミンが 235  $\mu\text{M}$ 、フェンホルミンが 37.4  $\mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  値はメトホルミンが 16.9 pmol/min/oocyte、フェンホルミンが 7.83 pmol/min/oocyte、取り込み活性を示す  $CL_{\text{int}}$  値はメトホルミンが  $71.9 \times 10^{-3}$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  に対してフェンホルミンは  $209 \times 10^{-3}$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  であった。非特異的取り込みクリアランスである  $P_{\text{dif}}$  値は、それぞれ  $4.69 \times 10^{-5}$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  と  $43.0 \times 10^{-5}$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$  であり、hOCT2 を介さない oocytes への取り込みはほとんど影響がないと考えられた (Table 6)。メトホルミンの取り込み活性は hOCT1 に比べると 30 倍以上高かったが、フェンホルミンは hOCT1 とほぼ同じ程度であった。これらの結果より、各ビグアナイド薬は hOCT2 の良好な基質であり、フェンホルミンはメトホルミンに比べると親和性が高く、取り込み活性も高いことが明らかになった。

**Table 6. Kinetic Parameters for the uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin and  $^{14}\text{C}$ -phenformin by hOCT-expressing oocytes.**

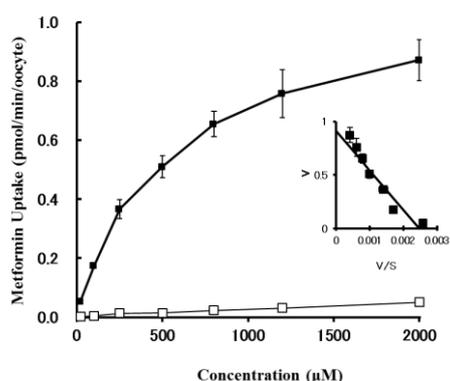
| Substrate  | Transporter | $K_m$         | $V_{\max}$      | $CL_{\text{int}}$                                | $P_{\text{dif}}$                                 |
|------------|-------------|---------------|-----------------|--|--|
|            |             | $\mu\text{M}$ | pmol/min/oocyte | $10^{-3}$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ | $10^{-5}$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ |
| Metformin  | hOCT1       | 369           | 0.911           | 2.47   | 2.37   |
|            | hOCT2       | 235           | 16.9            | 71.9   | 4.69   |
| Phenformin | hOCT1       | 5.71          | 1.12            | 196  | 29.8   |
|            | hOCT2       | 37.4          | 7.83            | 209  | 43.0   |
|            | hOCT3       | 22.3          | 0.196           | 8.79   | 22.6   |



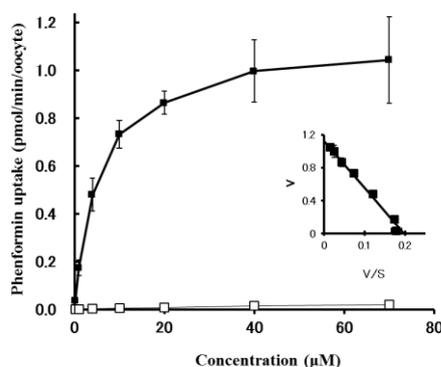
**Fig. 23. Concentration dependence of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) by oocytes stably expressing hOCT2 (■) and water injected oocytes as a control (□).  $^{14}\text{C}$ -metformin was incubated in a concentration range from 20 to 20000  $\mu\text{M}$  for 60 min.  $^{14}\text{C}$ -phenformin was incubated in a concentration range from 0.2 to 70  $\mu\text{M}$  for 60 min. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. Inset: Eadie-Hofstee plots. V, uptake rate (pmol/min/oocyte) S, concentration ( $\mu\text{M}$ ).**

また、hOCT1 を発現させた oocytes における  $^{14}\text{C}$ -メトホルミンと  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンの取り込みおよび hOCT3 を発現させた oocytes における  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンの取り込み動態を検討した。その結果、ビグアナイド薬はいずれも濃度依存的に取り込まれ、その取り込みは、低濃度での直線性と高濃度における飽和性を示した。コントロールにおける取り込みは低かった。Eadie-Hofstee プロットは、いずれも直線性を示した (Fig. 22)。今回実施した hOCT1 における  $K_m$  値は、第 II 章で実施した結果に比べるとやや低値であった。フェンホルミンは hOCT3 の基質と考えられるが、hOCT1 や hOCT2 に比べると取り込み活性はかなり低かった (Table 6)。

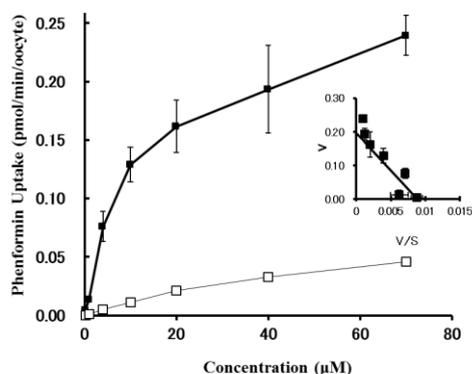
(A)



(B)



(C)



**Fig. 22. Concentration dependence of uptake of  $^{14}\text{C}$ -metformin (A) and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (B) by oocytes stably expressing hOCT1, and  $^{14}\text{C}$ -phenformin (C) by oocytes stably expressing hOCT3 (■) and water injected oocytes as a control (□).  $^{14}\text{C}$ -metformin was incubated in a concentration range from 20 to 2000  $\mu\text{M}$  for 60 min.  $^{14}\text{C}$ -phenformin was incubated in a concentration range from 0.2 to 70  $\mu\text{M}$  for 60 min. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 6 determinations. Inset: Eadie-Hofstee plots. V, uptake rate (pmol/ min/oocyte) S, concentration ( $\mu\text{M}$ ).**

#### 第4節 小括

本章では、主として hOCT2 を発現させた oocytes におけるビグアナイド薬の取り込み動態について検討を行った。

第1節では hOCT1-3 を発現させた oocytes における代表的な基質（放射性標識リガンド）の取り込みに対するメトホルミンあるいはフェンホルミンの阻害作用を検討した。hOCT1 および hOCT2 を発現させた oocytes において、両ビグアナイド薬は代表的基質（TEA）の取り込みを有意に阻害した。フェンホルミンはメトホルミンよりも阻害作用が強かった。hOCT3 を発現させた oocytes ではフェンホルミンは代表的基質（MPP<sup>+</sup>）に対する有意な阻害作用を示したが、メトホルミンでは阻害傾向は認められたものの、有意な作用ではなかった。フェンホルミンによる阻害作用は hOCT1 や hOCT2 に比べると弱いものであった。これらの結果から、メトホルミンおよびフェンホルミンは hOCT1 および hOCT2 の基質であり、フェンホルミンは hOCT3 の基質であることが示唆された。

第2節では hOCT2 を発現させた oocytes においてビグアナイド薬の時間依存的な取り込みを検討した結果、<sup>14</sup>C-メトホルミンおよび <sup>14</sup>C-フェンホルミンともに反応時間に依存した取り込み量の増加が認められた。水をインジェクションした oocytes（コントロール）への取り込みはほとんど認められず、ビグアナイド薬は hOCT2 を介して oocytes に取り込まれていることが示唆された。

第3節においては hOCT2 を発現させた oocytes における <sup>14</sup>C-ビグアナイド薬の濃度依存性を検討した。その結果、各ビグアナイド薬ともに放射能の取り込みはコントロールに比べて有意に高値を示し、濃度依存的な取り込みと飽和性が認められた。速度論パラメータはメトホルミンの取り込み活性を示す CL<sub>int</sub> 値 ( $71.9 \times 10^3 \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) が hOCT1 に対する値 ( $2.47 \times 10^3 \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) よりも約 29 倍大きな値を示した。フェンホルミンの CL<sub>int</sub> 値 ( $209 \times 10^3 \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) は hOCT1 の値 ( $196 \times 10^3 \mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) とほぼ同じ値であった。この結果より、肝臓にはフェンホルミンがメトホルミンに比べて特異的に取り込まれるが、腎近位尿細管上皮細胞への取り込みは肝臓ほど大きな違いがないことが示された。以上の結果から、腎排泄に関与する hOCT2 に対してメトホルミンとフェンホルミンはともに良好な基質であることが明らかとなった。ビグアナイド薬の主たる消失経路は腎排泄であるため、腎近位尿細管上皮細胞の側底膜に発現してビグアナイド薬を基質として認識する hOCT2 は腎排泄を制御する重要な要因と考えられる。一方、hOCT2 には遺伝子多型が存在しており<sup>62-65</sup>、そのうちアミノ酸変異を伴うものにはカチオン性化合物の輸送活性に影響を及ぼすものがある。Shuらは *in vitro* でメトホルミンの輸送活性が低下する3種類の SNPs (p.Thr199Ile、p.Thr201TMet、p.Ara270Ser) のいずれかを有するヒトにおける体内動態を評価している<sup>61</sup>。これらの変異を有する健康成人にメトホルミン 500 mg を経口投与したところ、p.Ara270Ser をホモ接合で有する被験者において腎クリアランスが野生型の被験者に比べて約 1/2 に低下し、C<sub>max</sub> は約 1.6 倍、AUC が約 1.7 倍上昇している。一方、クレアチニン

クリアランスに変化はなかった。この結果は hOCT2 の機能変化がメトホルミンの体内動態に影響を与えることを示している。フェンホルミンと hOCT2 に関する検討はこれまでにないが、今回得られた速度論パラメータを基に考えると、メトホルミンと同様に hOCT2 はフェンホルミンの腎排泄を制御する要因であり、その機能変化によって体内動態が変動することが推察された。このようなビグアニド薬の体内動態の変動は、副作用である乳酸アシドーシスの発症に繋がる可能性がある。すなわち、hOCT2 の機能が低下することにより、腎排泄量が低下し、血漿中濃度の上昇とそれに伴う肝臓中濃度の上昇によって乳酸アシドーシスが発現しやすい状況が生じると考えられる。従って、hOCT2 はビグアニド薬の毒性発現に関連する要因と考えられる。

なお、今回ビグアニド薬の hOCT3 における取り込みについて検討した結果、フェンホルミンが hOCT3 の基質であることが示唆された。しかし、hOCT3 は脳、心臓、骨格筋、胎盤など多くの組織で発現しており<sup>18)</sup>、 $CL_{int}$  値は hOCT1 や hOCT2 に比べるとかなり小さいことから、ビグアニド薬の体内動態に大きな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、メトホルミンは hOCT3 の良好な基質ではないことが示唆された<sup>66,67)</sup>。

以上、hOCT1-3 を発現させた oocytes において<sup>14</sup>C-メトホルミンと<sup>14</sup>C-フェンホルミンの取り込み動態を詳細に検討した結果、メトホルミンとフェンホルミンはともに hOCT2 の良好な基質であることが明らかになった。hOCT2 はビグアニドの主たる消失経路である腎排泄を支配する要因であり、体内動態に変動を及ぼすことによってビグアニド薬の毒性発現頻度を高める可能性が考えられた。

#### 第IV章 乳酸アシドーシスの発現に関する考察

本研究においてビグアナイド薬のフェンホルミンはメトホルミンと同様に hOCT1 と hOCT2 の良好な基質であることが明らかとなった。各トランスポーターに対する親和性と輸送活性は、フェンホルミンの方が高かった。そこでビグアナイド薬の体内動態を支配するこれらトランスポーターによる動態特性と乳酸アシドーシスの発現との関連性について考察を行った。

ビグアナイド薬の肝臓への取り込みは hOCT1 を介しており、hOCT1 の機能変化は体内動態や薬効、毒性の発現に反映されると考えられる。メトホルミンの輸送活性が低下した hOCT1 の変異を有する健康成人にメトホルミンを投与すると、血中濃度の上昇と薬効の低下作用が認められる<sup>57,58)</sup>。これは薬効標的組織である肝臓へのメトホルミンの取り込みが低下したことによって分布容積が減少し、血中濃度が上昇したためと考えられる。すなわち、hOCT1 に起因する体内動態の変動によって薬効が低減したと考えられる。これよりメトホルミンよりもさらに良好な基質であるフェンホルミンにおいても同様の効果が認められると推察される。

乳酸アシドーシスの発症には、肝臓中濃度の上昇が重要な条件となる<sup>59)</sup>。上述のごとく、肝臓中濃度が低くなると薬効が減弱し、副作用の発現も低下すると考えられる。一方、アミノ酸変異を伴う hOCT1 の SNP (p.Ser14Phe) において MPP<sup>+</sup>の取り込みが野生型の約 2 倍上昇することが報告されている<sup>53)</sup>。この変異を有するヒトにおいては hOCT1 を介した肝臓への取り込みが増加することが考えられる。しかし、基質としてメトホルミンを使用した検討において、野生型に比べて取り込みが低下する結果が報告されている<sup>57)</sup>。この原因は不明であるが、メトホルミンの輸送活性を促進する hOCT1 の変異は今のところ報告されていない。以上のことから、hOCT1 はビグアナイド薬の体内動態を支配し、薬効や毒性発現に関与する重要な要因であるが、副作用である乳酸アシドーシスの発現頻度を高める可能性は低いと考えられた。

一方、ビグアナイド薬の主たる消失経路は腎排泄であり、腎近位尿細管上皮細胞の側底膜に発現してビグアナイド薬を基質として取り込む hOCT2 も、体内動態の変動に関与する重要な要因である。メトホルミンの輸送活性が低下する hOCT2 の 3 種類の SNP (p.Thr199Tlle, p.The201Met, Ara270Ser) のいずれかの変異を有する健康成人にメトホルミンを経口投与すると、腎排泄量の低下とそれに伴う血中濃度の上昇が認められる<sup>61)</sup>。これは、主消失経路の腎排泄の抑制により循環血中の濃度が高くなることを示している。これより hOCT2 に対する良好な基質であるフェンホルミンにおいても同様の変動が起こることが推察される。hOCT1 の機能変化では、肝臓中への取り込みが抑制されて血中濃度が上昇したが、hOCT2 では腎排泄が抑制され血中濃度が上昇しているため、肝臓中濃度も上昇すると考えられる。従って、hOCT2 はビグアナイド薬の体内動態を支配し、薬効および副作用の発現頻度を高

める可能性が示唆された。

次に、メトホルミンとフェンホルミンの乳酸アシドーシスの発現頻度の違いについてビッグアナイド薬の体内動態の関連性から考察した。

薬物の体内動態を変動させる要因の1つに代謝酵素がある。メトホルミンは体内で代謝されないため代謝酵素の影響を受けないが<sup>37)</sup>、フェンホルミンは主としてCYP2D6により代謝される<sup>50,51)</sup>。CYP2D6には遺伝子多型が知られており、代謝能が低下した poor metabolizer (PM) がコーカシアンでは約7%存在する<sup>68)</sup>。PMにフェンホルミンを投与すると代謝能が低下しているため血中のフェンホルミン濃度が上昇し、乳酸値が高くなる傾向が報告されている<sup>69)</sup>。従って、CYP2D6はフェンホルミンによる乳酸アシドーシス発現に関与するリスクファクターの1つと考えられる。しかし、PMの割合からだけでは、フェンホルミンの乳酸アシドーシス発現頻度(約40~60名/10万人/年間)を説明することはできない。本研究においてhOCT2がビッグアナイド薬の毒性発現に関与する要因の1つと考えられたことから、hOCT2の遺伝子多型による輸送活性の低下とその頻度について考察した。メトホルミンのhOCT2における輸送活性の低下が認められる変異(p.Ara270Ser, p.Thr199Ile, p.Thr201Met)について、韓国人のアレル頻度はそれぞれ14%、1%、2%である。A270Sの変異をホモ接合型で有する健康成人にメトホルミン500mgを投与するとコントロール群に比べて腎排泄量が有意に低下して約半分となり、血中濃度の上昇( $C_{max}$ が約1.6倍、AUCは約1.7倍)が認められる<sup>61)</sup>。*in vitro*におけるメトホルミンの輸送活性はT199IとT201MがA270Sに比べて低下しており、これらの変異をホモ接合型で有する被験者ではメトホルミンの腎排泄量の低下および血中濃度の上昇はさらに大きくなると推察される(臨床研究におけるこれらのホモ接合型のデータは報告がない)。ただし、T199IとT201Mの変異はこれまでコーカシアンにおいて報告がない。以上のように、CYP2D6とhOCT2はフェンホルミンの体内動態を変動させる要因であり、この2つの要因が重なりあった場合には単独時に比べて血中濃度がさらに上昇すると推察される。コーカシアンにおけるA270Sのアレル頻度は2.5~15.7%と報告されており<sup>56,62)</sup>、この変異のホモ接合型の頻度とCYP2D6のPMの割合(0.07)を掛け合わせると、10万人あたり4.3人~172人の割合となる。これはフェンホルミンの乳酸アシドーシスの発現頻度(約40~60人/10万人)を包括する頻度となる。メトホルミンは代謝酵素の影響がないため、発現頻度の割合はフェンホルミンよりも低いと推察される。

さらにビッグアナイド薬の血中濃度の変動と乳酸値の関連性について文献より考察を行った。Marchettiらは2型糖尿病患者37名においてメトホルミンを処方した群(平均投与量1240 ± 560 mg/day)とフェンホルミンを処方した群(平均投与量66 ± 20 mg/day)の血漿中濃度と乳酸値の相関性を比較している<sup>70)</sup>。血漿中メトホルミン濃度は平均値505 ng/mL(236-718 ng/mL)、フェンホルミン濃度は55 ng/mL(28-114 ng/mL)を示し、いずれも臨床における有効血中濃度の範囲内を示している。この時、メトホルミンの血漿中濃度と乳酸値の間には明確な相関性はないが( $r=0.22$ )、フェンホルミンにおいては相関性が認められている

( $r = 0.49, P < 0.05$ )。また、Nattrass らは、メトホルミン (500 mg × 3 回/日)、フェンホルミン (50 mg × 2 回/日)、グリブライド (2.5 あるいは 5 mg/日) を糖尿病患者 (6 名) に投与したときの経時的な血中乳酸値の変動を比較しており、各薬剤を投与後の乳酸値の変動が最も大きかったものはフェンホルミンであり、次いでメトホルミン、グリブライドではほとんど変化がなかったことを報告している<sup>71)</sup>。さらに、Bando らは雌雄ラットにおいてヒト臨床血漿中濃度とほぼおなじ暴露量になるように設定した投与量でメトホルミンおよびフェンホルミンを 28 日間反復経口投与し、血漿中濃度と乳酸値の変動を検討している<sup>72)</sup>。血漿中薬物濃度はいずれのビグアナイド薬でも用量に応じた増加が認められるが、乳酸値の増加はフェンホルミン投与群でのみ認められた。これらの文献情報から、フェンホルミンはメトホルミンに比べて、臨床用量において乳酸値の上昇を惹起しやすい特性を有することが推察された。

以上のことから、hOCT2 はビグアナイド薬の腎排泄を規定する重要な要因であり、薬効や毒性発現にも関与していることが示唆された。さらに、hOCT2 の輸送活性を低下させる遺伝子多型のアレル頻度や代謝酵素 (CYP2D6) の遺伝子多型の PM の割合ならびに乳酸値上昇などを総括的に考えると、メトホルミンとフェンホルミンの乳酸アシドーシス発現頻度の違いを説明できると考える。

さらに、最近の研究によりメトホルミンの腎排泄には、血液側からの取り込みは hOCT2 が関与しており、管腔側への排泄は multidrug and toxin extrusion proteins (MATE1/SLC47A1 や MATE2-K/SLC47A2) によることが報告されている<sup>73-75)</sup>。MATE はプロトン共役型で非起電性のカチオン輸送体であり、ヒトおよびマウスの腎臓からプロトン/有機カチオン逆輸送体の実体として最初に MATE1 が同定されている<sup>76)</sup>。MATE1 は 570 のアミノ酸から構成され、推定 13 回膜貫通領域を有している<sup>77)</sup>。ヒトの hMATE1 は主に腎臓、肝臓、副腎、骨格筋などに発現しており、hMATE2-K は腎臓にほぼ特異的に発現している<sup>77,78)</sup>。MATE には遺伝子多型が存在し、アミノ酸変異を伴う変異体においてカチオン性化合物の輸送活性が低下することが報告されている<sup>79-83)</sup>。マウスの *Mate1* をノックアウトして、メトホルミンを経口投与すると野生型に比べて血漿中濃度が 15 倍、肝臓中濃度が 69 倍上昇し、血中乳酸値も有意に高値を示すが<sup>84)</sup>、現在までにアミノ酸変異を伴う MATE の変異を有するヒトにおける明らかな体内動態の変動は報告されていない。しかし、アミノ酸変異を伴わないプロモーター領域の変異を有する被験者にメトホルミンを投与すると、hOCT との関連解析によってメトホルミンの薬効が変化する結果が報告されている<sup>85)</sup>。今後、臨床において遺伝子多型の頻度や薬物の体内動態の変動に関する研究が進めば、MATE の機能変化に基づくビグアナイド薬の体内動態動態変動が明らかになることが期待され、MATE が hOCT2 と同様にビグアナイド薬の乳酸アシドーシス発現に関与する要因の 1 つになる可能性が考えられる。

## 結 論

---

本研究では、カチオン性薬物の体内動態を制御しているヒトの OCT1 および OCT2 に着目して、ビグアナイド薬の毒性発現と OCT の関連性を考察するため、メトホルミンとフェンホルミンの肝臓および腎臓への取り込み動態特性について比較検討した。また、ビグアナイド薬の重篤な副作用である乳酸アシドーシスと体内動態の変動の関連性について文献情報から考察を行い、以下の知見を得た。

### 第 I 章 ラットにおける *in vivo* および *in vitro* 肝取り込み

ビグアナイド薬の薬効および毒性標的組織である肝臓への取り込みを検討するため、<sup>14</sup>C-メトホルミンおよび <sup>14</sup>C-フェンホルミンをラットに投与した。両剤ともに血漿中濃度に比べて肝臓中濃度が高値を示し、フェンホルミンはメトホルミンに比べて肝移行性が約 15 倍高かった。また、ラット凍結肝細胞を用いた検討では、両剤とも濃度依存的な取り込みが認められ、トランスポーターの関与が示唆された。取り込み活性を示す  $CL_{int}$  値はフェンホルミンがメトホルミンに比べて約 22 倍高い値を示し、*in vitro* 肝細胞への取り込み活性は *in vivo* の肝臓への移行性を反映することが推察された。これらの結果から、ビグアナイド薬はトランスポーターを介して肝臓内に取り込まれ、高い移行性を示すことが明らかになった。

### 第 II 章 ヒト肝細胞および hOCT1 発現系卵母細胞における取り込み

ヒト肝臓への取り込みを調べるため、ヒト凍結肝細胞を用いて検討した。フェンホルミンはメトホルミンに比べて約 43 倍高い取り込み活性を示し、トランスポーターを介して輸送されることが示唆された。ヒト肝細胞における取り込みは、膜電位を抑制することで低下した。さらに OCT の代表的な基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) の共存によって、取り込みが濃度依的に阻害された。これらの結果から、肝細胞への取り込みはヒト肝臓に特異的に発現している hOCT1 によるものと推察された。そこで hOCT1 を発現させた卵母細胞を用いた検討を行ったところ、各ビグアナイド薬の  $K_m$  値は肝細胞の値と一致し、取り込み活性はフェンホルミンがメトホルミンに比べて約 34 倍高い値であった。以上、フェンホルミンの肝取り込みは、hOCT1 を介したものであり、その取り込み活性はメトホルミンよりも高いことが示された。一方、hOCT1 の遺伝子変異によってメトホルミンの輸送活性が低下することが報告されており、このような変異を有する患者においては肝臓への取り込みが低下し薬効が減弱する。従って、メトホルミンよりも hOCT1 に対する親和性が高く、輸送活性も高いフェンホルミンの場合も薬効の減弱が生じると推察される。薬効の減弱は毒性発現の低下につながることから、hOCT1 はビグアナイド薬の薬効や毒性発現に関与する要

因の1つではあるが、毒性発現頻度を高める可能性は低いと考えられた。

### 第III章 hOCT2 を介したビグアナイドの動態

ビグアナイド薬の主たる消失経路である腎排泄に関与するヒトの OCT2 について調べるため、hOCT2 を発現させた卵母細胞を用いて検討した。両剤とも OCT2 の代表的な基質である TEA の取り込みを有意に阻害した。また、濃度依存的な取り込みが認められた。K<sub>m</sub> 値はフェンホルミンがメトホルミンの約 1/6 程度であり、取り込み活性はフェンホルミンが約 3 倍高い値を示し、両ビグアナイド薬は hOCT2 の良好な基質であることが明らかになった。これらの結果から、フェンホルミンは hOCT2 を介して腎排泄されることが示唆された。hOCT2 の遺伝子変異によってメトホルミンの輸送活性が低下することが報告されており、このような変異を有する患者においては、腎排泄量が低下し血中および肝臓中濃度が上昇することが推察される。肝臓中濃度の上昇は乳酸アシドーシスの発現を高めることになり、hOCT2 はビグアナイド薬の毒性発現頻度を高める要因の1つと考えられた。

### 第IV章 乳酸アシドーシスの発現に関する考察

フェンホルミンは主に CYP2D6 による代謝を受ける。hOCT2 の輸送活性が低下した変異を有する患者が、CYP2D6 の PM であった場合、フェンホルミンの体内動態はさらに大きく変動すると考えられる。一方、メトホルミンは生体内で代謝されないため、代謝酵素による影響は受けない。また、臨床用量においてフェンホルミンの血漿中濃度は血中乳酸値と相関するが、メトホルミンでは相関性が認められないことが報告されており、各ビグアナイド薬の血中乳酸値に対する反応性に違いがあることが示唆される。以上のことから、フェンホルミンでは複数の要因が重なることにより、乳酸アシドーシスの発現頻度がメトホルミンに比べて高まることが推察された。

以上、本研究で得られた知見は、ビグアナイド薬の体内動態を支配している OCT1 および OCT2 を介したメトホルミンとフェンホルミンの動態特性を明らかにしたものであり、ビグアナイド薬の重篤な副作用である乳酸アシドーシスの発現頻度を規定する要因を明らかにする上で有用な基礎的知見と考える。

## 謝 辞

---

---

本研究を遂行するにあたり、終始暖かいご指導を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科医療薬剤学研究室 高野幹久 教授に謹んで厚く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、日頃より貴重なご助言を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科医療薬剤学研究室 永井純也 准教授ならびに湯元良子 助教に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、ご指導をいただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 松尾裕彰 教授に深く感謝申し上げます。

本論文を審査していただき、適切なお助言を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科 太田茂 教授ならびに仲田義啓 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の貴重な機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻を賜りました元大日本住友製薬株式会社薬物動態研究所所長 小室勢津子 博士、大日本住友製薬株式会社前臨床研究所副所長 矢吹昌司 博士に深く御礼申し上げます。さらに、本研究を共に遂行し、数々の実験にご協力いただいた大日本住友製薬株式会社前臨床研究所 北村敦 主任研究員に深謝申し上げます。

また、本研究を行うに際し、お世話になりました広島大学大学院医歯薬総合研究科医療薬剤学研究室の皆様、同研究室卒業生の皆様に厚く御礼申し上げます。

その他、各試験の実施にあたり、お世話いただきました多くの方々に厚く御礼申し上げます。

## 実験の部

---

---

### 第 I 章

#### 【実験材料】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミン塩酸塩 (specific activity, 962 MBq/mmol) は Moravek Biochemicals 社 (Brea, CA) から購入した。 $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン塩酸塩 (specific activity, 4.48 GBq/mmol) は Amersham Biosciences 社 (Little Chalfont, UK) にて合成した。非標識のメトホルミンは和光純薬株式会社 (大阪) から、また、非標識のフェンホルミンはシグマ・アルドリッチ社 (St. Louis, MO) から購入した。ラットの凍結肝細胞は Xenotech LLC 社 (Lenexa, KS) から入手した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

#### 【実験動物】

CrI:CD (SD) 系雄性ラット (日本チャールス・リバー株式会社) を購入した。動物室は室温を  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度を  $55 \pm 15\%$  に設定して 12 時間の明暗サイクル (点灯: 8:00~20:00、消灯: 20:00~8:00)、1 時間あたり 10 回以上の換気回数になるように制御した。すべての動物は、固型飼料 (CFR-1、オリエンタル酵母工業株式会社) と水道水を自由摂取させ、検疫・馴化を経た後、7 週齢にて 1 群 3 匹で実験に供した。

#### 【投与方法】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミンと  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンはそれぞれ非標識のメトホルミンおよびフェンホルミンと混合して蒸留水に溶解させ、25 mg/1.85 MBq/mL に調製した。ラットには 2 mL/kg (50 mg/3.7 MBq/kg) の用量で経口ゾンデを用いて投与した。

#### 【血漿中放射能濃度】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンを経口投与後、0.5、1、2、4、6、24 時間目にエーテル麻酔下でヘパリン処理をしたシリンジを用いて頸静脈から経時的に血液を採取した。採取した血液は遠心分離 ( $1800 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 10 分間) を行って、血漿成分を分取した。血漿 0.1 mL に液体シンチレーター (ハイオニックフロー、パーキンエルマー社) 10 mL を加えて、液体シンチレーションカウンター (2500TR、パーキンエルマー社) で放射能を測定した。

#### 【肝臓中放射能濃度】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンを経口投与後 0.5 時間においてエーテル麻酔下でヘパリン処理をしたシリンジを用いて門脈から血液を採取し、腹下大動脈から全採血を行った後、速やかに肝臓を摘出した。血液は遠心分離 ( $1800 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 10 分間) を行い、

血漿成分を分取した。門脈血漿中放射能は上記の血漿と同様の方法で測定した。肝臓は一部を採取して湿重量を測定した後、組織溶解剤（ソルエン、パーキンエルマー社）2 mL を添加し 40 °C に加温して溶解させた。その後、液体シンチレーター（ハイオニックフロー）10 mL を加えて、液体シンチレーションカウンター（2500TR）で放射能を測定した。

**【放射性成分分析サンプルの調製】**

門脈血漿 0.1 mL にメタノール 2 mL を加えて攪拌抽出した後、遠心分離（1800×g、4°C で 10 分間）を行った。上清成分を分取して窒素ガス気流下で蒸発乾固させ、残渣を HPLC 移動相 0.15 mL に溶解させた。調製した抽出成分を HPLC 分析に供した。なお HPLC への注入は 100 μL とした。

**【放射性成分の HPLC 分析条件】**

(1) <sup>14</sup>C-メトホルミン：

カラム：Inertsil<sup>®</sup> 3 series column ODS-3 (5 μm、4.6 mm i.d. × 250 mm、GLサイエンス)

移動相：0.2 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 4.0

流速：1.0 mL/min

カラム温度：40°C

分析時間：15 min

検出：放射能

(2) <sup>14</sup>C-フェンホルミン

カラム：Symmetry C18 (5 μm、4.6 mm i.d. × 250 mm、Waters)

ガードカラム：SUMIPAX Filter PG-ODS (住化分析センター)

移動相：(A) 0.1%トリフルオロ酢酸/精製水 (1/1000, v/v)

(B) 0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル (1/1000, v/v)

グラジエント：

| 移動相 | 0 min | 10 min | 15 min | 20 min | 30 min |
|-----|-------|--------|--------|--------|--------|
| A   | 100%  | 0%     | 100%   | 100%   | 100%   |
| B   | 0%    | 100%   | 0%     | 0%     | 0%     |

流速：1.0 mL/min

カラム温度：設定なし

分析時間：30 min

検出：放射能

**【ラット凍結肝細胞の調製】**

雄性ラットの凍結肝細胞を 37°C で急速融解し、Isolation Percoll 溶液 13 mL に DMEM 培地 2 mL を入れた遠沈管に添加した。70 × g で 5 分間、室温で遠心分離を行い、細胞を沈殿

させた。上清を除いた後、沈渣を Krebs-Henseleit 緩衝液 (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4, 以下 KHB) 2 mL で懸濁し、懸濁液 50 μL にトリパンブルー450 μL を加え、細胞数を計測し、生存率を算出して生細胞率が 80%以上であることを確認した。細胞懸濁液に再度 DMEM 培地を 10 mL 添加し、50 × g で 3 分間、室温で遠心分離を行った。上清を除き沈渣に KHB を加えて、細胞濃度を 2.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように調製した。

#### 【ラット凍結肝細胞への取り込み】

2.0 × 10<sup>6</sup> cells/mL に調製した細胞懸濁液 450 μL を 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。基質 (<sup>14</sup>C-メトホルミンおよび <sup>14</sup>C-フェンホルミン) を含む反応溶液も同時に 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。細胞懸濁液に反応溶液を等量添加して取り込みを開始した。取り込み時間と温度の検討では、<sup>14</sup>C-メトホルミンおよび <sup>14</sup>C-フェンホルミンを 20 μM として、37°C あるいは 0°C において 15 秒、1 分、2 分、3 分、5 分、7 分、10 分間インキュベーションした。所定時間に反応溶液を 100 μL 採り、シリコンオイル 100 μL と 2N の水酸化ナトリウム溶液 50 μL が入ったチューブに添加し、10000 × g で 15 秒間、室温で遠心分離を行った。遠心分離後のチューブ内が 3 層に分離していることを確認して、シリコンオイル層の中央部分をカミソリで切断した。細胞分画を放射能測定用のバイアルに入れ、組織溶解剤 (ソルエン) 2 mL を加えて超音波処理を行った。液体シンチレーター (ハイオニックフロー) 10 mL を加え、液体シンチレーションカウンター (2500TR) で取り込まれた放射能を測定した。濃度依存性の検討では、細胞懸濁液に <sup>14</sup>C-メトホルミン (20、100、200、500、1000、2000、10000 μM) および <sup>14</sup>C-フェンホルミン (1、5、10、50、100、500、1000 μM) を含む基質溶液を等量添加し、メトホルミンは 37°C で 5 分間、フェンホルミンは 10 分間インキュベーションした。所定時間に上記の時間依存性と同様の操作を行い、取り込まれた放射能を測定した。

#### 【速度論パラメータの算出】

血漿中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC<sub>0-t</sub>) は最終測定時までには台形法により、最終測定時以降の AUC<sub>t-∞</sub> は消失相の傾きと最終定量時間の濃度を用いて算出し、AUC<sub>0-∞</sub> はそれらを合することにより算出した。

ラット肝細胞におけるメトホルミンとフェンホルミンの速度論パラメータは、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用い、以下の Michaelis-Menten 式に当てはめて算出した。

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) + P_{dif} \times S$$

ここで  $v$  は取り込みの速度 (pmol/min/10<sup>6</sup> cells)、 $V_{max}$  は最大取り込み速度 (pmol/min/10<sup>6</sup> cells)、 $K_m$  は Michaelis-Menten 定数 (μM)、 $P_{dif}$  は非特異的取り込みクリアランス (μL/min/10<sup>6</sup> cells)、 $S$  は添加した基質濃度 (μM) を示す。

### 【データの表示と統計処理】

血漿および肝臓中放射能濃度は各薬剤の量に換算して  $\mu\text{g eq./mL or g}$  で表示した。得られたデータは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表示した。また、2 群間の平均値の差の検定は Student の t-検定で行い、有意水準は両側 5%とした。

## 第 II 章

### 【実験材料】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミン塩酸塩 (specific activity, 962 MBq/mmol) は Moravek Biochemicals 社 (Brea, CA) から購入した。 $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン塩酸塩 (specific activity, 4.48 GBq/mmol) は Amersham Biosciences 社 (Little Chalfont, UK) にて合成した。非標識のメトホルミンは和光純薬株式会社 (大阪) から、また非標識のフェンホルミンはシグマ・アルドリッチ社 (St. Louis, MO) から購入した。テトラエチルアンモニウム (TEA) は東京化成工業株式会社 (東京) から、パラアミノ馬尿酸 (PAH) は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。ヒトの凍結肝細胞は Xenotech LLC 社 (Lenexa, KS) から、ヒト有機カチオントランスポーター (hOCT1) を発現させた卵母細胞は BD-GENTEST 社 (Woburn, MA) から入手した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

### 【ヒト凍結肝細胞の調製】

ヒトの凍結肝細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  で急速融解し、Isolation Percoll 溶液 13 mL に DMEM 培地 2 mL を入れた遠沈管に添加した。 $70 \times \text{g}$  で 5 分間、室温で遠心分離した後、上清を除いた。沈渣を KHB 2 mL で懸濁し、懸濁液 50  $\mu\text{L}$  にトリパンブルー 450  $\mu\text{L}$  を加え、細胞数を計測し、生存率を算出して生細胞率が 70%以上であることを確認した。細胞懸濁液に再度 DMEM 培地を 10 mL 添加し  $50 \times \text{g}$  で 3 分間、室温で遠心分離を行った。上清を除いて沈渣に KHB を加え、細胞濃度を  $2.0 \times 10^6$  cells/mL となるように調製した。

### 【ヒト凍結肝細胞への取り込み】

$2.0 \times 10^6$  cells/mL に調製した細胞懸濁液 450  $\mu\text{L}$  を  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間プレインキュベーションした。基質 ( $^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン) を含む反応溶液も同時に  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間プレインキュベーションした。細胞懸濁液に基質溶液を等量添加して取り込みを開始した。

濃度依存性の検討では、 $^{14}\text{C}$ -メトホルミン(20、100、200、500、1000、2000、10000  $\mu\text{M}$ ) および  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン (1、5、10、50、100、500、1000  $\mu\text{M}$ ) の濃度を設定して、メトホルミンは  $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間、フェンホルミンは 10 分間インキュベーションした。所定の時間に反応溶液から 100  $\mu\text{L}$  を採り、シリコンオイル 100  $\mu\text{L}$  と 2N の水酸化ナトリウム溶液 50  $\mu\text{L}$  が入ったチューブに添加し、 $10000 \times \text{g}$  で 15 秒間、室温で遠心分離を行った。遠心分離

後のチューブ内が 3 層に分離していることを確認して、シリコンオイル層の中央部分をカミソリで切断した。細胞分画を放射能測定用のバイアルに入れ、2N 水酸化ナトリウム溶液を 2 mL 加えて超音波処理を行った。液体シンチレーター（ハイオニックフロー）10 mL を加え、液体シンチレーションカウンター（2500TR）で取り込まれた放射能を測定した。

膜電位の検討では、KHB の代わりにカリウム緩衝溶液（5 mM NaCl、118 mM KCl、1.1 mM MgSO<sub>4</sub>、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM glucose、10 mM HEPES、pH 7.4）を用いて細胞懸濁液を調製した。<sup>14</sup>C-メトホルミン（20 μM）あるいは<sup>14</sup>C-フェンホルミン（1 μM）を含む反応溶液を等量添加した後、それぞれ所定時間インキュベーションした。反応終了後、濃度依存性と同様の操作を行い、取り込まれた放射能を測定した。KHB で調製した細胞懸濁液における取り込み量を 100% として、カリウム緩衝溶液における取り込み量を示した。

阻害作用の検討では、非標識のメトホルミン、フェンホルミン、PAH および TEA を含む細胞懸濁液に<sup>14</sup>C-メトホルミン（20 μM）および<sup>14</sup>C-フェンホルミン（1 μM）を含む反応溶液を添加した後、それぞれ所定の時間インキュベーションした。反応終了後から放射能の測定までは濃度依存性と同様の操作を行った。

#### 【hOCT1 発現卵母細胞における取り込み】

hOCT1 を発現させた卵母細胞を ND96medium 0.5 mL を入れた試験管に移した。ND96medium を取り除き、ナトリウム緩衝溶液（100 mM NaCl、2 mM KCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES、pH 7.4）を 3 mL 入れ卵母細胞を洗浄した。この操作を 2 回繰り返した（計 3 回）。ナトリウム緩衝溶液を除去した後、<sup>14</sup>C-メトホルミン（20、100、500、1000、2000、5000、10000 μM）および<sup>14</sup>C-フェンホルミン（1、5、10、50、100、500、1000 μM）を含む反応溶液を 100 μL 添加し、室温で 90 分間インキュベーションした。反応終了時に反応溶液を除去して、氷冷したナトリウム緩衝溶液 3 mL で 3 回洗浄した。洗浄後、卵母細胞を 1 つずつバイアルに移し、10% SDS 溶液 150 μL を加えて室温で 30 分以上静置し、卵母細胞を溶解させた。液体シンチレーター（ハイオニックフロー）10 mL を加え、液体シンチレーションカウンター（2500TR）で取り込まれた放射能を測定した。なお、水を注入した卵母細胞を用いて同様の操作を行い、コントロール群とした。

#### 【速度論パラメータの算出】

ヒト肝細胞および hOCT1 を発現させた卵母細胞におけるメトホルミンとフェンホルミンの速度論パラメータは、非線形最小二乗法プログラム（MULTI）を用い、以下の Michaelis-Menten 式に当てはめて算出した。

$$v = V_{max} \times S / (K_m + S) + P_{diff} \times S$$

ここで  $v$  は取り込みの速度（pmol/min/10<sup>6</sup> cells あるいは pmol/min/oocyte）、 $V_{max}$  は最大取り込み速度（pmol/min/10<sup>6</sup> cells あるいは pmol/min/oocyte）、 $K_m$  は Michaelis-Menten 定数（μM）、

$P_{dif}$  は非特異的取り込みクリアランス ( $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$  あるいは  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ )、 $S$  は添加した基質濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示す。

#### 【データの表示と統計処理】

得られたデータは平均値±標準偏差 (SD) で表示した。また、2 群間の平均値の差の検定は Student の t-検定で行い、有意水準は両側 5%とした。

### 第三章

#### 【実験材料】

$^{14}\text{C}$ -メトホルミン塩酸塩 (specific activity, 3.53 GBq/mmol) は Moravek Biochemicals 社 (Brea, CA) から購入した。 $^{14}\text{C}$ -フェンホルミン塩酸塩 (specific activity, 4.48 GBq/mmol) は Amersham Biosciences 社 (Little Chalfont, UK) にて合成した。 $^{14}\text{C}$ -テトラエチルアンモニウム (TEA, 2.035 GBq/mmol) と  $^3\text{H}$ -1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP<sup>+</sup>, 2960 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。非標識のメトホルミン、フェンホルミン、キニジンおよび MPP<sup>+</sup> はシグマ・アルドリッチ社 (St. Louis, MO, USA) から TEA は和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

#### 【卵母細胞の採取】

アフリカツメガエル (浜松生物教材株式会社) を解剖し卵塊を採取した。採取した卵塊をローテーター (RT-50, TAITEC) でゆるやかに回転させながらコラゲナーゼ処置を施し、卵膜を除去した。遺伝子導入に耐えうる卵母細胞を大きさ、傷、膜の付着等の観点から選別して選別の翌日、生細胞に遺伝子導入を行った。

#### 【cRNA の合成と卵母細胞への遺伝子導入】

プラスミド DNA を制限酵素サイトで直鎖化し、テンプレート DNA を調製した。次に T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応 (mMESSAGE mMACHINE T7 kit, Ambion) を行い cRNA とし、さらに cRNA 末端への poly (A) tailing 付加反応 (Poly (A) Tailing kit, Ambion) も行った後、精製したものを導入遺伝子とした。合成した poly (A) 付加前および付加後の cRNA サンプルは、ホルムアミド処理したアガロースゲルにアプライし、水平型ミニゲル電気泳動装置を用いて電気泳動を行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドによる染色を行い UV 照射によるバンドの同定確認を行った。

遺伝子導入自動化装置を用いて、目的のトランスポーター遺伝子およびレポーター遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子を卵母細胞内に 32.2 nL マイクロインジェクションした。一方、トランスポーター未発現卵母細胞 (negative control) として GFP 遺

伝子と滅菌水を混合したのも同様にマイクロインジェクションした。マイクロインジェクションの際には、研磨器（ナリシゲ）を用いて作製したガラスキャピラリーを滅菌して用いた。インジェクション後、ND96medium 中で 2-3 日間、インキュベーター（室温）中にて培養した。cRNA の導入量は以下の通りとした。

| 導入遺伝子          | 導入量 (ng)     |
|----------------|--------------|
| トランスポーター遺伝子    | 10 ng/oocyte |
| レポーター遺伝子 (GFP) | 7 ng/oocyte  |

インジェクションの翌日に蛍光顕微鏡を用いて GFP 発現卵母細胞を判定して、GFP の発現が確認されないものは除去した。

#### 【ヒト OCT 発現卵母細胞における取り込み】

各 hOCT 発現卵母細胞における代表的な基質の取り込み阻害の検討では、hOCT1 および hOCT2 の基質として  $^{14}\text{C}$ -TEA、hOCT3 の基質として  $^3\text{H}$ -MPP<sup>+</sup> を用いた。

試験に用いる卵母細胞を ND96medium で 2 回洗浄した後、24 穴細胞培養ディッシュ（CORNING 社）に卵母細胞を分取し、10 分間プレインキュベーションした。各ウエルからバッファーを除去し、室温の反応溶液（ $^{14}\text{C}$ -TEA 10  $\mu\text{M}$ 、 $^3\text{H}$ -MPP<sup>+</sup> 0.05  $\mu\text{M}$  および非標識のメトホルミン、フェンホルミン、阻害剤のキニジンを含む）を 500  $\mu\text{L}$  添加した時点から、所定時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、反応溶液を吸引除去し、卵母細胞を氷冷した ND96medium で 3 回洗浄した。卵母細胞は、ミニバイアルに 1 つずつ採取し、5% の SDS 水溶液 100  $\mu\text{L}$  を添加し、室温で約 30 分間、振盪溶解した。卵母細胞入りミニバイアルに液体シンチレーター（Aquasol-2）を 1.5 mL 添加し、十分混和後、液体シンチレーションカウンター（LSC6100、アロカ社）で放射能を測定した。

時間依存性および濃度依存性の検討では、hOCT を発現させた卵母細胞を ND96medium で 2 回洗浄した洗浄した後、10 分間プレインキュベーションして、室温の反応溶液（ $^{14}\text{C}$ -メトホルミンおよび  $^{14}\text{C}$ -フェンホルミンを含む）を 500  $\mu\text{L}$  添加して取り込みを開始した。以下の操作は阻害作用の検討と同様に行い、取り込まれた放射能を測定した。

#### 【速度論パラメータの算出】

hOCT1-3 を発現させた卵母細胞におけるメトホルミンとフェンホルミンの速度論パラメータは、Eadie-Hofstee プロットから得られた直線の傾きおよび Y 軸切片から各トランスポーターに対する親和性（Michaelis-Menten 定数： $K_m$ ）および最大取り込み速度（ $\text{pmol}/\text{min}/\text{oocyte}$  定数： $V_{max}$ ）を算出した。また非特異的クリアランス  $P_{dif}$  ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{oocyte}$ ) はトランスポーター未発現卵母細胞群における取り込み速度から算出した。

【データの表示と統計処理】

得られたデータは平均値±標準誤差（SE）で表示した。また、2 群間の平均値の差の検定は Student の t-検定で行い、有意水準は両側 5%とした。

## 論文目録

---

---

本論文の基礎となる原著を以下に記す。

Yoshihisa Sogame, Atsushi Kitamura, Masashi Yabuki, Setsuko Komuro. A comparison of uptake of metformin and phenformin mediated by hOCT1 in human hepatocytes. *Biopharm Drug Dispos* 2009; 30: 476-84.

Yoshihisa Sogame, Atsushi Kitamura, Masashi Yabuki, Setsuko Komuro. Liver uptake of biguanides in rats. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 451-455.

Yoshihisa Sogame, Atsushi Kitamura, Masashi Yabuki, Setsuko Komuro, Mikiyoshi Takano. Transport of biguanides by human organic cation transporter OCT2. *Biomed Pharmacother* 2013; 67: 425-430.

## 参考文献

---

---

1. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 1989; 12: 553-64.
2. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996; 334: 574-9.
3. Pomeranze J, Fujiy H, Mouratoff GT. Clinical report of a new hypoglycemic agent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 95: 193-4.
4. Sterne J. Pharmacology and mode of action of hypoglycaemic guanidine derivatives. In "Oral hypoglycaemic agents" (G.D. Campbell, ed.). *Academic Press New York* 1969; 193-245.
5. Jacker HJ. New pharmacologic products. 2. Buformin for oral therapy of diabetes. *Pharm Prax* 1964; 10: 247-9.
6. Natrass M, Alberti KG. Biguanides. *Diabetologia* 1978; 14: 71-4.
7. Stang MR, Wysowski DK, Butler-Jones D. Incidence of lactic acidosis in metformin users. *Diabetes Care* 1999; 22: 925-7.
8. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002;137: E25-E33.
9. Campbell IW. Metformin and the sulphonylureas: the comparative risk. *Horm Metab Res Suppl* 1985; 15:105-11.
10. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 541-9.
11. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352: 854-65.
12. Ito H, Ishida H, Takeuchi Y, Antoku S, Abe M, Mifune M, Togane M. Long-term effect of

- metformin on blood glucose control in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab (London)* 2010; 7: 83.
13. Mizuno N, Sugiyama Y. Drug transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin* 2002; 17: 93-108.
  14. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 425-61.
  15. Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GMM, Koepsell H, Meier PJ, Meijer DKF. Drug uptake systems in liver and kidney. *Current Drug Metabolism* 2003; 4: 185-211.
  16. Shitara Y, Horie T, Sugiyama Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* 2006; 27: 425-46.
  17. Yonezawa A, Inui K. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 693-701.
  18. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *JPET* 2004; 308: 2-9.
  19. Covitz KM, Amidon GL, Sadée W. Membrane topology of the human dipeptide transporter, hPEPT1, determined by epitope insertions. *Biochemistry* 1998; 37: 15214-21.
  20. Wang P, Hata S, Xiao Y, Murray JW, Wolkoff AW. Topological assessment of oatp1a1: a 12-transmembrane domain integral membrane protein with three N-linked carbohydrate chains. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1052-9.
  21. Koepsell H. Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 375-81.
  22. Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 871-81.

23. Meyer-Wentrup F, Karbach U, Gorboulev V, Arndt P, Koepsell H. Membrane localization of the electrogenic cation transporter rOCT1 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 673-8.
24. Urakami Y, Akazawa M, Saito H, Okuda M, Inui K. cDNA cloning, functional characterization, and tissue distribution of an alternatively spliced variant of organic cation transporter hOCT2 predominantly expressed in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1703-10.
25. Urakami Y, Okuda M, Masuda S, Saito H, Inui K. Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic cation transporters, OCT1 and OCT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 800-5.
26. Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D, Kaissling B, Bachmann S, Koepsell H. Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F679-87.
27. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333: 550-4.
28. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4059-67.
29. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; 348: 607-14.
30. Lalau JD, Lacroix C, Compagnon P, Cagny BD, Rigaud JP, Bleichner G, Chauveau P, Dulbecco P, Guerin C, Haegy JM, Loirat P, Marchand B, Ravaud Y, Weyne P, Fournier A. Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes Care* 1995; 18: 779-84.
31. Lalau JD, Race JM. Lactic acidosis in metformin therapy. *Drugs* 1999; 58 (Suppl 1): 55-60, discussion 75-82.
32. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for

- microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 1981; 4: 879-85.
33. Choi YH, Lee I, Lee MG. Effects of water deprivation on the pharmacokinetics of metformin in rats. *Biopharm Drug Dispos* 2007; 28: 373-83.
  34. Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30: 359-71.
  35. Guest D, King LJ, Parke DV. Metabolism of phenformin in the rat and guinea-pig. *Xenobiotica* 1979; 9: 681-93.
  36. Beckmann R. The fate of biguanides in man. *Ann NY Acad Sci* 1968; 148: 820-32.
  37. Pentikäinen PJ, Neuvonen PJ, Penttilä A. Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur J Clin Pharmacol* 1979; 16: 195-202.
  38. Oates NS, Shah RR, Idle JR, Smith RL. On the urinary disposition of phenformin and 4-hydroxy-phenformin and their rapid simultaneous measurement. *J Pharm Pharmacol* 1980; 32: 731-2.
  39. Umehara KI, Iwatsubo T, Noguchi K, Kamimura H. Functional involvement of organic cations transporter1 (OCT1/Oct1) in the hepatic uptake of organic cations in humans and rats. *Xenobiotica* 2007; 37: 818-31.
  40. Kivistö KT, Niemi M. Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res* 2007; 24: 239-47.
  41. Yamazaki M, Suzuki H, Hanano M, Tokui T, Komai T, Sugiyama Y. Na<sup>+</sup>-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. *Am J Physiol* 1993; 264: G36-G44.
  42. Yamazaki M, Tokui T, Ishigami M, Sugiyama Y. Tissue-selective uptake of pravastatin in rats: contribution of a specific carrier-mediated uptake system. *Biopharm Drug Dispos* 1996; 17: 775-89.
  43. Waring MJ. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2010; 5: 235-48.

44. Hale TW, Kristensen JH, Hackett LP, Kohan R, Ilett KF. Transfer of metformin into human milk. *Diabetologia* 2002; 45: 1509-14.
45. Ramanathan K, Karthick H, Arun N. Structure based drug designing for diabetes mellitus. *J Proteomics Bioinform* 2010; 3: 310-3.
46. Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994; 372: 549-52.
47. Hart A, Cohen H. Treatment of obese non-diabetic patients with phenformin. A double-blind cross-over trial. *British Medical Journal* 1970; 1: 22-4.
48. Cairns SA, Shalet S, Marshall AJ, Hartog M. A comparison of phenformin and metformin in the treatment of maturity onset diabetes. *Diabete Metab* 1977; 3: 183-8.
49. Dietze G, Wicklmayr M, Mehnert H, Czempiel H, Henfling HG. Effect of phenformin on hepatic balances of gluconeogenic substrates in man. *Diabetologia* 1978; 14: 243-8.
50. Boobis AR, Murray S, Kahn GC, Robertz GM, Davies DS. Substrate Specificity of the form of cytochrome P-450 catalyzing the 4-hydroxylation of debrisoquine in man. *Mol Pharmacol* 1983; 23: 474-81.
51. Yu AM, Idle JR, Gonzalez FJ. Polymorphic cytochrome P450 2D6: Humanized mouse model and endogenous substrates. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 243-77.
52. Kerb R, Brinkmann U, Chatskaia N, Gorbunov D, Gorboulev V, Mornhinweg E, Keil A, Eichelbaum M, Koepsell H. Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 591-5.
53. ShuY, Leabman MK, Feng B, Mangravite LM, Huang CC, Stryke D, Kawamoto M, Johns SJ, DeYoung J, Carlson E, Ferrin TE, Herskowitz I, Giacomini KM. Evolutionary conservation predicts function of variants of the human organic cation transporter, OCT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5902-7.
54. Takeuchi A, Motohashi H, Okuda, M, Inui K. Decreased function of genetic variants, Pro283Leu and Arg287Gly, in human organic cation transporter hOCT1. *Drug Metab*

*Pharmacokinet* 2003; 18: 409-12.

55. Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Noshiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y, Endou H. Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1(SLC22A1) affecting transport functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 789-93.
56. Kang HJ, Song IS, Shin HJ, Kim WY, Lee CH, Shim JC, Zhou HH, Lee SS, Shin JG. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 667-75.
57. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007; 117: 1422-31.
58. Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, Sheardown SA, Yue L, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 273-80.
59. Wang DS, Kusuhara H, Kato Y, Jonker JW, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of organic cation transporter1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol Pharmacol*. 2003; 63: 844-8.
60. Higgins JW, Bedwell DW, Zamek-Gliszczynski MJ. Ablation of both organic cation transporter (Oct)1 and Oct2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. *Drug Metab Dispos* 2012; 40: 1170-7.
61. Song IS, Shin HJ, Shim EJ, Jung IS, Kim WY, Shon JH, Shin JG. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 559-62.
62. Leabman MK, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Clark AG, Herskowitz I, Giacomini KM. Polymorphisms in a human kidney xenobiotic transporter, OCT2, exhibit altered function. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 395-405.
63. Fukushima-Uesaka H, Maekawa K, Ozawa S, Komamura K, Ueno K, Shibakawa M, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Saito Y, Sawada J. Fourteen novel single nucleotide polymorphisms in the SLC22A2 gene encoding human organic cation transporter (OCT2). *Drug Metab*

*Pharmacokinet* 2004; 19: SNP8(239)-SNP13 (244).

64. Fujita T, Urban TJ, Leabman MK, Fujita K, Giacomini KM. Transport of drugs in the kidney by the human organic cation transporter, OCT2 and its genetic variants. *J Pharm Sci* 2006; 95: 25-36.
65. Song IS, Shin HJ, Shin JG. Genetic variants of organic cation transporter 2 (OCT2) significantly reduce metformin uptake in oocytes. *Xenobiotica* 2008; 38: 1252-62.
66. Choi MK, Jin QR, Jin HE, Shim CK, Cho DY, Shin JG, Song IS. Effects of tetraalkylammonium compounds with different affinities for organic cation transporters on pharmacokinetics of metformin. *Biopharm Drug Dispos* 2007; 28: 501-10.
67. Kimura N, Masuda S, Tanihara Y, Ueo H, Okuda M, Katsura T, Inui K. Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 379-86.
68. Mizutani T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev* 2003; 35: 99-106.
69. Oates NS, Shah RR, Idle JR, Smith RL. Influence of oxidation polymorphism on phenformin kinetics and dynamics. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34: 827-34.
70. Marchetti P, Benzi L, Cecchetti P, Giannarelli R, Boni C, Ciociaro D, Ciccarone AM, Cianni GD, Zappella A, Navalesi R. Plasma biguanide levels are correlated with metabolic effects in diabetic patients. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41: 450-4.
71. Nattrass M, Todd PG, Hinks L, Lloyd B, Albrti KGMM. Comparative effects of phenformin, metformin and glibenclamide on metabolic rhythms in maturity-onset diabetics. *Diabetologia* 1977; 13: 145-52.
72. Bando K, Ochiai S, Kunimatsu T, Deguchi J, Kimura J, Funabashi H, Seki T. Comparison of potential risks of lactic acidosis induction by biguanides in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010 ;58: 155-60.
73. Terada T, Masuda S, Asaka J, Tsuda M, Katsura T, Inui K. Molecular cloning, functional

- characterization and tissue distribution of rat H<sup>+</sup>/organic cation antiporter MATE1. *Pharm Res* 2006; 23: 1696-701.
74. Tsuda M, Terada T, Mizuno T, Katsura T, Shimakura J, Inui K. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (Mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol Pharmacol* 2009; 75:1280-6.
75. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H<sup>+</sup>-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 359-71.
76. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17923-8.
77. Yonezawa A, Inui K. Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 1817-25.
78. Masuda S, Terada T, Yonezawa A, Tanihara Y, Kishimoto K, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H<sup>+</sup>/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2127-35.
79. Chen Y, Teranishi K, Li S, Yee SW, Hesselson S, Stryke D, Johns SJ, Ferrin TE, Kwok P, Giacomini KM. Genetic variants in multidrug and toxic compound extrusion 1, hMATE1, alter transport function. *Pharmacogenomics J* 2009; 9: 127-36.
80. Choi JH, Yee SW, Kim MJ, Nguyen L, Lee JH, Kang JO, Hesselson S, Stryke D, Johns SJ, Kwok PY, Ferrin TE, Lee MG, Black BL, Ahituv N, Giacomini KM. Identification and characterization of novel polymorphisms in the basal promoter of the human transporter, MATE1. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 770-80.
81. Kajiwara M, Terada T, Ogasawara K, Iwano J, Katsura T, Fukatsu A, Doi T, Inui K. Identification of multidrug and toxin extrusion (MATE1 and MATE2-K) variants with complete loss of transport activity. *J Hum Genet* 2009; 54: 40-6.

82. Schwabedissen HEM, Verstuyft C, Kroemer HK, Becquemont L, Kim RB. Human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter: functional characterization, interaction with OCT2 (SLC22A2), and single nucleotide polymorphisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F997-F1005.
83. Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20: 135-8.
84. Toyama K, Yonezawa A, Masuda S, Osawa R, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K, Katsura T. Loss of multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1) is associated with metformin-induced lactic acidosis. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 1183-91.
85. Stocker SL, Morrissey KM, Yee SW, Castro RA, Xu L, Dahlin A, Ramirez AH, Roden DM, Wilke RA, McCarty CA, Davis RL, Brett CM, Giacomini KM. The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93: 186-94.