

平成 21 年 6 月 6 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790119
 研究課題名(和文) ヒト・動物組織並びに遺伝子発現系を利用した薬物の肝腎振り分けの予測法の確立
 研究課題名(英文) Prediction of hepatic and renal clearance of drugs by using human- and animal-derived tissue samples and gene expression systems
 研究代表者
 前田 和哉 (MAEDA KAZUYA)
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：00345258

研究成果の概要：薬物の肝腎振り分けは、体内動態の特徴を知る上で重要であり、創薬の初期段階で予測できる方法論が望まれる。本研究では、ラットおよびヒト由来の肝細胞ならびに腎スライスを用いた取り込み実験の結果から、トランスポーター基質薬物の肝・腎クリアランスを定量的に予測する方法を構築し、さらに、肝細胞や胆管側膜ベシクルへの取り込みの阻害の情報を用いてトランスポーターを介した薬物間相互作用を予測できることを実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：分子薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：肝腎振り分け、トランスポーター、肝細胞、腎スライス、薬物間相互作用、薬物動態

1. 研究開始当初の背景

一般的に、投与された薬物は、肝臓もしくは腎臓のいずれかから排泄される。すなわち、全身クリアランスは、肝クリアランスと腎クリアランスの和で表されるケースが圧倒的に多く、どちらが相対的に大きいかで、肝排泄型、腎排泄型薬物として分類される。肝疾患・腎疾患を有する患者に薬物を投与する場合には、肝臓・腎臓における異物解毒機能の低下に伴い、臓器クリアランスの低下が観察されるが、薬物の血中濃度上昇の程度は、肝

腎の各クリアランス機能の低下割合と、正常時における肝腎クリアランスの大きさの相対比の両方から決定される。特に、薬物が対象とする疾患が、肝腎の機能低下とリンクする可能性がある場合、薬物の開発当初より肝腎振り分けについても考慮する必要がある。また逆に、薬物の薬効ターゲットが、肝臓や腎臓の場合には、臓器指向性の高い薬物を開発の初期段階で簡便にスクリーニングし、予測するためのシステムが必要であると考えられる。速度論的に考察すると、各臓器にお

ける見かけの固有クリアランスは、取り込み過程の固有クリアランスに、細胞内からの薬物の移行のうち消失に至る（代謝＋未変化体の胆汁排泄）過程への振り分け率を乗じたものとして定義される。仮に消失過程の速度が、血管側への backflux の速度と比べて十分に速ければ、見かけの固有クリアランスは、取り込み過程の固有クリアランスに近似される。近年、特に、多くの有機アニオン系の薬物については、膜透過過程に一連のトランスポーターの関与が示されており、その多くは、取り込み過程がクリアランスの律速過程になっているケースが多いと考えられる。このような場合、肝腎への振り分け効率は、血中から肝臓および腎臓への取り込みクリアランスの比で表すことができると考えられる。これまで、臓器レベルでの取り込みクリアランスの評価は、肝臓については、遊離肝細胞を用いた系が有効であり、腎臓については、腎スライスをを用いることが所属研究室の研究により示されてきた。また、薬物によっては、肝腎振り分けについてラット・マウスとヒトとの間で大きな種差が見られるケースがあるため、ヒトにおける予測系の確立が必須であると考えられる。現在では、ヒトの予測についても、肝臓の in vitro 系としてはヒト凍結肝細胞が使用可能であり、腎臓の基質の取り込みを観察する in vitro 評価系としてのヒト腎スライスに関しては、東京女子医科大学の協力を得て、腎がんなどのため手術で摘出された腎臓の正常部よりスライスを調製することで、有機アニオン類の能動的な取り込みを観察できうることをすでに示している。従って、ヒトにおける肝腎振り分け率の予測も可能な環境にある。これまで、肝臓・腎臓での取り込みクリアランスの予測やトランスポーターの関与の証明については、各臓器や各トランスポーターごとで個別に行われてきたのが現状である。しかしながら、それぞれの異なる実験系から予測された結果を用いて、多数の例を持って、定量的に肝腎振り分けの予測が可能であるかどうかについては、ほぼ検討されていない。そこで、本研究では、トランスポーターの基質となる薬物を中心として、ヒト・動物の組織や遺伝子発現系を用いた検討を通じて、薬物の肝腎振り分けを予測できる in vitro 実験系の確立を目指すことを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、複数のトランスポーターの基質薬物について、みかけの固有クリアランスが、取り込みクリアランスに近似できる（取り込み律速が成立している）事を、動物実験を用いて実証すると共に、肝細胞・腎スライスをを用いた in vitro 取り込み実験の結果に基づき、取り込みクリアランスを予測すること

ができるかどうか、それらの結果を元に、肝・腎クリアランスを予測できるかについてラットを用いた検討を進めるとともに、この方法論がヒトにおいても適用できるかどうかについて検証するために、ヒト in vivo における腎クリアランスならびに腎外クリアランス（＝肝クリアランス）を、ヒト凍結肝細胞およびヒト腎スライスをを用いた in vitro 取り込み実験の結果から予測可能であるかどうかについて検証を行う。さらに、肝取り込み・排出両方のトランスポーターを介した薬物間相互作用を予測するために、ラット in vivo においてあらゆる組み合わせで薬物間相互作用をおこしたときの基質薬物の体内動態・臓器分布の変動を、ラット肝細胞ならびにラット胆管側膜ベシクルを用いた in vitro 取り込みに対する阻害定数の情報から予測することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ラットおよびヒトにおけるトランスポーター基質薬物の肝腎振り分けの予測

ラット in vivo における取り込みクリアランスは、薬物を静脈内 bolus 投与後、速やかに血流をとめ臓器を摘出し、薬物の臓器内濃度を測定する integration plot 法を用いて見積もった。また、in vivo における肝・腎クリアランスは、ラットに胆管および膀胱カニューレを施した状態で、静脈内より薬物を infusion し、定常状態における血中濃度および臓器中濃度を測定することで、肝腎クリアランスを見積もった。また、in vitro 取り込み実験は、遊離肝細胞および腎スライスをを用いて常法に従い行った。

また、ヒトに関しては、肝・腎（＝肝外）クリアランスの情報は複数の文献より算出した。一方、in vitro 実験については、ヒト凍結肝細胞ならびにヒト腎スライスをを用いて取り込みを観察した。

検討方法



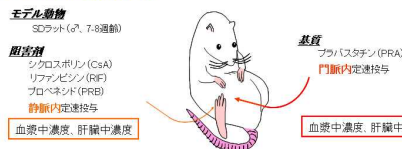
(2) ラットにおける肝取り込み・排出トランスポーターを介した薬物間相互作用の in vitro 実験からの予測法の確立

薬物間相互作用の被相互作用薬としては

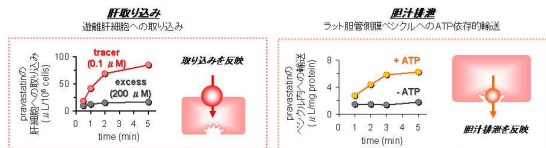
プラバスタチンを用い、相互作用薬としては、プロベネシド・リファンピシン・シクロスポリン A をそれぞれ投与量を変えて併用投与した。薬剤は被相互作用薬・相互作用薬ともに、静脈内 infusion して定常状態における血中・臓器中濃度を定量した。In vitro 実験としては、プラバスタチンを基質として、肝細胞および胆管側膜ベシクルを用いた取り込みに対する阻害試験を実施し、阻害定数を算出した。

臓器サンプル(肝細胞、膜ベシクル)を利用した薬物間相互作用の定量的な予測法の確立

▶ in vivoでの相互作用実験



▶ 阻害剤の効果を定量的に評価するためのin vitro実験



4. 研究成果

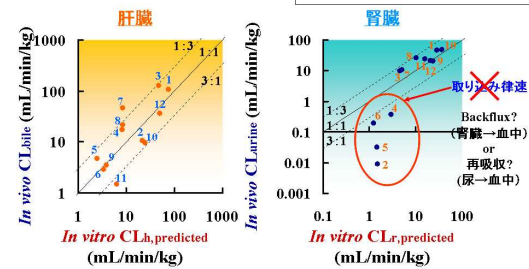
(1) ラットおよびヒトにおけるトランスポーター基質薬物の肝腎振り分けの予測

薬物トランスポーター基質薬物であり、肝腎振り分け率が多様な 12 化合物を選択して、in vitro 実験からの予測を行った。まず、これら化合物のクリアランスに占める組織取り込みクリアランスの重要性を示すため、integration plot 法により、in vivo における取り込みクリアランスを求め、肝・腎クリアランスと比較したところ、腎クリアランスの比較的小さな化合物を除き、3 倍以内の精度で予測できることが分かった。次に in vitro 実験として、ラット遊離肝細胞およびラット腎スライスにおける初期取り込みクリアランスを求め、in vivo での固有クリアランスの値に scale up を行なったところ、良好な予測が成立することが分かった。また、in vitro 実験の結果から in vivo の組織クリアランスを 3 倍程度の精度で予測できた。これらのことから、トランスポーター基質薬物については、取り込み過程が臓器固有クリアランスの律速段階を決めているケースが多いことが分かり、in vitro 取り込み実験の結果から、in vivo における臓器クリアランス、ひいては、その比として肝腎振り分けを予測可能であることが示された。

さらにヒトにおいても同様にヒト凍結肝細胞ならびにヒト腎スライスを用いた in vitro 取り込み実験の結果に基づき、in vivo における肝 (= 腎外)・腎クリアランスを予測したところ、ラット同様に 3 倍以内の精度

で予測できたことから、この方法論がヒトにおいても成り立つことが示された。

In vitro実験からの予測



腎クリアランスの小さな一部の化合物を除いては、in vivoの臓器クリアランスが、約3倍以内の精度で予測できた。

(2) ラットにおける肝取り込み・排出トランスポーターを介した薬物間相互作用の in vitro 実験からの予測法の確立

rifampicin, probenecid については、ラット in vivo において、阻害剤の投与量依存的な pravastatin の血漿中濃度・肝臓中濃度の変動が見られた。In vitro 阻害実験の結果に基づく阻害定数の情報を用い、適切な数理モデルをもとに pravastatin の血漿・肝臓中濃度の変動を予測したところ、良好な予測が成立した。一方、cyclosporin A については、旧来からの仮定である、蛋白非結合型薬物のみがトランスポーターの阻害に関与するという考え方では阻害効果の定量的な強さを説明できず、蛋白結合型薬物についても阻害に関わると考えないと相互作用の程度を定量的に予測できないことが示された。一方、in vitro 実験の結果、血漿存在下・非存在下のいずれにおいてもほぼ同じ阻害定数が得られたことから、上記の仮説が支持される結果を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Watanabe T, Maeda K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Kusuha H, Sugiyama Y. Prediction of the hepatic and renal clearance of transporter substrates in rats using in vitro uptake experiments. Drug Metab Dispos, in press (2009) 査読有

Matsushima S, Maeda K, Inoue K, Ohta KY, Yuasa H, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Kusuha H, Sugiyama Y. The inhibition of human multidrug and toxin extrusion 1 is involved in the drug-drug interaction caused by cimetidine. Drug Metab Dispos, 37, 555-559 (2009) 査読有

Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y
Involvement of multiple transporters in
the hepatobiliary transport of
rosuvastatin. Drug Metab Dispos, 36,
2014 -2023 (2008)査読有

Yamada A, Maeda K, Kamiyama E, Sugiyama
D, Kondo T, Shiroyanagi Y, Nakazawa H,
Okano T, Adachi M, Schuetz JD, Adachi Y,
Hu Z, Kusuhara H, Sugiyama Y. Multiple
human isoforms of drug transporters
contribute to the hepatic and renal
transport of olmesartan, a selective
antagonist of the angiotensin II
AT1 -receptor. Drug Metab Dispos, 35, 2166 -76
(2007)査読有

〔学会発表〕(計6件)

前田和哉、ヒト凍結肝細胞を利用した薬物
の肝取り込み・胆汁排泄の予測法、シンポジ
ウム「医薬品探索・開発のための細胞アッセ
イ技術」, 2009.1.8、東京

前田和哉、渡辺友子、渡辺貴夫、出堀泰之、
楠原洋之、杉山雄一、遊離肝細胞を用いた
in vitro 取り込み実験の結果に基づく in vivo
肝クリアランスの予測の検討、第 16 回肝病
態生理研究会、2008.6.4、松山

渡辺友子、前田和哉、渡邊貴夫、出堀泰之、
近藤恒徳、楠原洋之、杉山雄一、遊離肝細胞、
腎スライスを用いた医薬品の消失の肝腎振
り分けの in vitro 予測法の検討、第 15 回 HAB
研究機構学術年会、2008.5.17、東京

Maeda K, Watanabe T, Watanabe T, Debori
Y, Kusuhara H and Sugiyama Y. Prediction
of in vivo hepatic and renal clearance of
transporter substrates from in vitro
uptake clearance using isolated
hepatocytes and kidney slices. 2nd
Asian-Pacific ISSX meeting, 2008.5.12,
上海、中国

Watanabe T, Kusuhara H, Maeda, K and
Sugiyama Y. Physiologically based
pharmacokinetic (PBPK) modeling for
predicting transporter-mediated drug
disposition in humans. The 8th
International ISSX Meeting, 2007.10.10、
仙台

渡邊貴夫、楠原洋之、前田和哉、杉山雄一
トランスポーターを組み入れた生理学的薬
物速度論モデリングによるヒトにおける薬
物動態の予測と解析、第 15 回肝病態生理研
究会、2007.5.30、東京

〔図書〕(計2件)

前田和哉、最新創薬学 2007 (分担執筆：
肝取り込み・排泄の予測) メディカル・ドウ、
123-34 (2007)

Maeda K and Sugiyama Y. Drug
Transporters (分担執筆：In vitro -in vivo
scale up of drug transport activities),
John Wiley and Sons, Inc., 557 -588 (2007)

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 和哉 (MAEDA KAZUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：0 0 3 4 5 2 5 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし