

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659053

研究課題名（和文）創薬におけるヒト型肝臓動物モデルを利用した体内動態の個体間変動予測法

研究課題名（英文）Prediction of interindividual differences of drug metabolism and pharmacokinetics using chimeric mice with humanized liver

研究代表者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60160503

研究成果の概要（和文）：

近年、医薬品開発の中で、薬物代謝酵素の遺伝多型などによる薬物動態の個人差が大きな障害になっている。個人差の大きな医薬品は、安全性、有効性の観点から臨床においても使用が難しい。本研究では、マウスに異なる個体のドナーのヒト肝細胞を移植した「ヒト肝細胞移植キメラマウス」を用い、それぞれ種々の検証医薬品を投与することで、その体内動態を比較検証した。その結果、創薬においてヒト個体間における医薬品の体内動態予測に有用なモデルとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Recently, intra-individual differences of drug metabolism and pharmacokinetics caused by the polymorphism of drug metabolic enzymes have been concerned in drug development. It is difficult to use drugs which show interindividual differences because these result in changes of efficacy and safety. We used chimeric mice transplanted with human donor hepatocytes to examine whether chimeric mice reflect drug metabolism and pharmacokinetics of donors. In the results, it is possible to become useful models to predict interindividual differences of drug metabolism and pharmacokinetics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：薬物代謝学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：薬学，ヒト肝細胞移植キメラマウス，肝細胞，薬物代謝酵素，遺伝多型，薬物動態

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発の中で、薬物代謝酵素の遺伝多型などによる薬物動態の個人差が大きな障害になっている。個人差の大きな医薬品は、安全性、有効性の観点から臨床においても使用が難しい。その原因のひとつとして、薬物代謝酵素の遺伝子多型による酵素活性の低下がそのひとつに挙げられる。この場合、薬物血中濃度が上昇し、副作用に対するリスクが高くなる。また代謝されて初めて活性を

示す医薬品の場合、活性代謝物の生成が低くなるために薬効に影響を与える。

薬物代謝酵素のうちチトクローム P450 (CYP) の個人活性変動幅は、100 倍以上にわたるものも報告されており、遺伝子多型を有する薬物代謝酵素で代謝される医薬品開発は留意を要する。

以上の背景から、創薬段階において、ヒト代謝の個別化予測が精度よくできる新しい評価系の構築が期待されている。

2. 研究の目的

近年、免疫不全の性質をもつ SCID マウスと肝障害の性質をもつ uPA トランスジェニックマウスを掛け合わせたマウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞移植キメラマウスが、ヒトでの体内動態を予測できるモデル動物として注目されている。マウスの肝臓がヒト肝細胞に高い割合で置換されているため、肝臓において、ヒト型の種々の薬物代謝酵素の発現、活性を有することが報告されている。

本研究では、種々の薬物酵素活性を有する2個体のドナーの肝細胞を、マウス肝臓に移植したヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた。検証化合物をこれらのヒト肝細胞移植キメラマウスに投与後、その血中動態を評価し、報告されるヒトの血中動態との比較ならびに2個体のドナー肝細胞を移植したマウス間の血中動態との比較を行い、本モデル動物が薬物動態の個人差を予測するモデルとなりうるか予測検証を行った。

3. 研究の方法

2個体のドナー肝細胞（ドナーA;男性, ドナーB;女性）を uPA/SCID マウスに移植したヒト肝細胞移植キメラマウスは、生産元である株式会社フェニックスバイオより供与を受けたものを用いた。

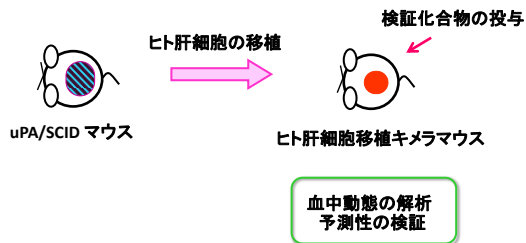


図1 研究アプローチの概略

(1) 血中動態の評価

実験には、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓が約80%の割合でヒトの肝細胞に置換されたマウスを用いた。

検証化合物には、医療用医薬品として使用されているキニジン、ジアゼパム、ベラパミル、ミダゾラム、レパグリニドを用いた。これらはヒトの薬物代謝酵素チトクロームP450 (CYP)のうちCYP3AやCYP2Cによって代謝排泄されることが知られている。

これら検証化合物をヒト肝細胞移植キメラマウスに投与し、血液を採取後、血漿分離し、分析前処理を行ったのち、質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて血漿中濃度を測定した。得られた血漿中濃度推移から、全身クリアランス(CL_t)や分布容積(Vd_{ss})を算出した。

これらのヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるCL_tは、私たちが報告している Sanoh

et al., Drug Metab. Dispos (2012)におけるヒト肝細胞移植キメラマウスのクリアランスと実際の臨床試験で報告されるヒトのクリアランスの相関にあてはめ、予測性を確認した。

(2) 血漿中濃度推移の予測

ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた実験から算出されたCL_tやVd_{ss}は、Single Species Allometry Scaling (SSS)法(下記の算出式参照)を用いてスケールアップし、ヒトCL_tおよびVd_{ss}予測値を求めた。

$$\text{Predicted CL}_t = \text{CL}_{t, \text{animal}} \times (\text{B.W.}_{\text{human}}/\text{B.W.}_{\text{animal}})^a \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{Predicted Vd}_{ss} = \text{Vd}_{ss, \text{animal}} \times (\text{B.W.}_{\text{human}}/\text{B.W.}_{\text{animal}})^b \quad (\text{eq. 2})$$

キニジン、ジアゼパム、ベラパミル、ミダゾラム、レパグリニドの検証化合物に加え、Sanoh et al., Drug Metab. Dispos (2012)で検証に用いた13化合物を加え、それぞれのヒト肝細胞移植キメラマウスおよび臨床で報告されるヒトのCL_tならびにVd_{ss}とヒト肝細胞移植キメラマウスとヒトの体重を上記SSSの式に代入、各検証化合物のべき乗値a, bを算出した。各検証化合物のべき乗値は平均化し、再度上記式に代入、各検証化合物のヒト肝細胞移植キメラマウスのCL_t, Vd_{ss}からヒトCL_t, Vd_{ss}予測値を見積もった。この値は実際臨床で報告されるCL_t, Vd_{ss}と比較検証した。

次に血漿中濃度推移を予測するため、算出した平均べき乗値a, bを以下のcomplex Dedrick plotに代入し、投与後時間、それに伴う予測血漿中濃度の算出を行った。

$$\text{Predicted time} = \text{Real time}_{\text{animal}} \times [(\text{B.W.}_{\text{human}})^{b-a}/(\text{B.W.}_{\text{animal}})^{b-a}] \quad (\text{eq. 3})$$

$$\text{Predicted plasma concentrations (C}_p) = \text{C}_{p, \text{animal}} \times [(\text{B.W.}_{\text{human}})^{1-b}/(\text{B.W.}_{\text{animal}})^{1-b}] \quad (\text{eq. 4}).$$

(3) In vitro 代謝活性評価

ヒト肝細胞移植キメラマウスから採取した肝臓を用いて、肝ミクロゾーム画分を調製し、検証化合物とインキュベーションさせた。消失する検証化合物濃度をLC/MS/MSを用いて解析し、代謝活性の指標となる検証化合物の消失速度を算出した。

4. 研究成果

ドナーAの肝細胞が移植されているヒト肝細胞移植キメラマウスに検証化合物を投与後のCL_t, Vd_{ss}についてSSS法を用いてCL_t, Vd_{ss}予測値を算出した。これを臨床で報告されるヒトのデータと比較したところ、CL_t、

Vd_{ss} ともに高い相関性が認められた(図 3, 4)。

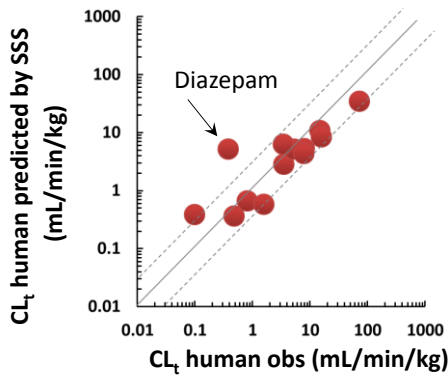


図 3 CLt の予測性

(縦軸；ヒト肝細胞移植キメラマウスからの予測値、横軸；ヒト報告値)

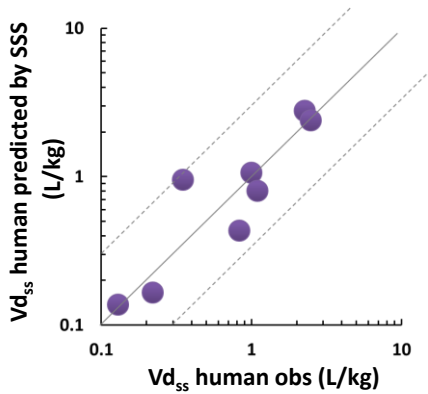


図 4 Vd_{ss} の予測性

(縦軸；ヒト肝細胞移植キメラマウスからの予測値、横軸；ヒト報告値)

(*Vd_{ss} の予測については、ヒトの報告値が検索できなかった化合物は検証から除いた。)

CLt の予測性については、ジアゼパムが相関から外れた(図 3)。その要因としてヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓に残存するマウス肝細胞の代謝寄与が考えられた。そこで、その寄与を調べる目的でドナーA のヒト肝細胞定着率が 30%、60%、80%のヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓から肝ミクロゾームをジアゼパムとインキュベートさせ、代謝消失速度を評価した(図 5)。

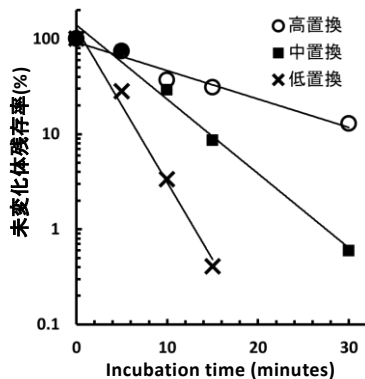


図 5 ジアゼパムをヒト肝細胞移植キメラマウス肝ミクロゾームで代謝反応させたときのジアゼパムの代謝消失 (○高置換キメラマウス(約 80%)肝ミクロゾーム, ■中置換キメラマウス(約 60%), ×低置換キメラマウス(約 30%))

置換率の低いキメラマウスの肝ミクロゾームにおいてジアゼパムの代謝速度が速いことがわかり、マウスの肝細胞の代謝寄与が大きいことが示された(図 5)。

前述の研究の方法に記載のように Complex Dedrick plot を用いてキニジン、ジアゼパム、ベラパミル、ミダゾラムの血漿中濃度推移を予測した(図 6)。

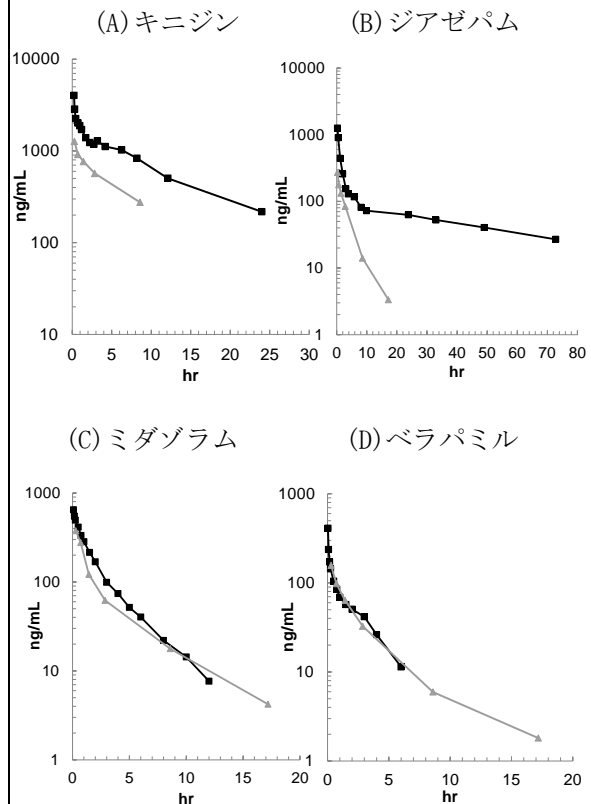


図 6 Complex Dedrick Plot によるヒト肝細胞移植キメラマウスからの血漿中濃度推移予測値 (△) と臨床で報告されるヒトの実測値 (■) の比較

ジアゼパム以外の化合物についてはおおむねドナーA の肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスの血漿中濃度推移予測性は高いことが分かった。言い換えれば、ドナーA の薬物代謝活性は、今回用いた臨床で報告されるヒトの活性と類似している可能性も考えられる。

ジアゼパムの血漿中濃度推移の予測性が悪い要因は前述のようにキメラマウス肝臓に残存するマウス肝細胞の代謝活性の影響

をうけたものと考えられた。

次にドナーA とドナーB の肝細胞を移植したキメラマウス間での CLt, および Vdss の比較を行った(表 1)。

表 1. ヒト肝細胞移植キメラマウスに投与後の CLt (mL/min/kg) および Vdss (L/kg)

	ドナー	CLt	Vdss
キニジン	A	36.4	5.0
	B	77.6	3.5
ジアゼパム	A	29.7	1.9
	B	61.6	2.7
ミダゾラム	A	29.6	1.4
	B	54.5	3.3
レパグリニド	A	25.2	1.7
	B	33.7	1.7

ドナーA と B の肝細胞を移植したキメラマウスでの Vdss については一定の傾向は認められなかったが、CLt についてはドナーB の肝細胞を移植したキメラマウスの方が概ね CLt が大きくなる傾向が認められた。これは、これら検証化合物の代謝に関わる薬物代謝酵素 (CYP3A, CYP2C) の代謝活性の個体差を反映している可能性がある(表 1)。

以上の結果より、ヒト肝細胞移植キメラマウスは血漿中濃度推移の予測が概ね可能であることから、ドナーの肝細胞の代謝活性の特徴を血漿中濃度推移として示し、かつ血漿中濃度に反映する薬効や安全性の予測も同時に行うことが期待できる。血漿中濃度推移まで予測できる動物モデルの報告は少ないことからその意義は高い。

また本研究では、ドナーA と B の個体差がキメラマウスにも反映している可能性も示すことができた。今後、キメラマウスに移植するドナー肝細胞の種類を増やし、薬物代謝活性における特徴付けをしながら、さらなる評価が必要となると考えている。

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 5 件)

1. Tanoue C, Sugihara K, Uramaru N, Tayama Y, Watanabe Y, Horie T, Ohta S, Kitamura S. Prediction of human metabolism of the sedative-hypnotic zaleplon using chimeric mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica*. (査読有) 2013 (in press)
2. Kamikyouden N, Sugihara K, Watanabe Y, Uramaru N, Murahashi T, Kuroyanagi

M, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S. 2, 5-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone: a novel major in vitro metabolite of benzophenone-3 formed by rat and human liver microsomes. *Xenobiotica*. (査読有) 2013; 43(6):514-9.

3. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. (査読有) 2012 ; 40(12):2267-72.

4. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*. (査読有) 2012 ; 40(2):322-8.

5. Sanoh S, Nozaki K, Murai H, Terashita S, Teramura T, Ohta S. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. (査読有) 2012; 40(1):76-82.

[学会発表] (計 4 件)

1. 藤本真美, 佐能正剛, 成富洋一, 佐藤公也, 河村章生, 堀口 彩, 杉原数美, 立野知世, 堀江 透, 北村繁幸, 太田 茂 「ヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるアロメトリックスケーリングを用いたヒト体内動態予測」日本薬学会 133 年会 2013 年 3 月 27 日～3 月 31 日 横浜

2. 藤本真美, 佐能正剛, 成富洋一, 佐藤公也, 河村章生, 堀口 彩, 杉原数美, 立野知世, 堀江 透, 北村繁幸, 太田 茂 「ヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるアロメトリックスケーリングを用いた血中動態予測性の検証」日本薬物動態学会第 27 年会 2012 年 11 月 20 日～11 月 22 日 東京

3. Sanoh S, Naritomi Y, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of human pharmacokinetics by allometric scaling using chimeric mice with humanized liver. 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12th European Regional International Society for the Study of Xenobiotics meeting, 2012 年 6 月 17 日～6 月 21 日 Noordwijk aan Zee (オラン

ダ)

4. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitaura S, Ohta S. Prediction of PK parameters of human using human chimeric mice. 17th International Society for the Study of Xenobiotics North American Meeting, 2011年10月16日～10月20日 Atlanta(アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60160503

(2) 研究分担者

佐能 正剛 (SANOH SEIGO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：00552267

(3) 研究協力者

藤本 真美 (FUJIMOTO MAMI)

広島大学・薬学部・学生