

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460209

研究課題名(和文) 生理学的薬物速度論解析に基づく肝取り込み・代謝過程での薬物相互作用予測方法の確立

研究課題名(英文) Physiologically based pharmacokinetic analysis for predicting drug interactions involving hepatic uptake and metabolism.

研究代表者

伊藤 清美 (Ito, Kiyomi)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：60232435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数の酵素で代謝される薬物では、併用薬による酵素阻害の影響を定量的に評価するために、代謝における各酵素の寄与率を正確に見積もることが重要である。レパグリニドの代謝におけるCYP2C8およびCYP3A4の寄与率について推定した結果から、*in vitro*代謝試験において緩衝液条件に留意することの重要性が確認された。また、クラリスロマイシンとグリベンクラミドの相互作用について生理学的薬物速度論(PBPK)モデル解析を実施し、肝取り込み阻害と肝代謝阻害の両者の関与を明らかにした。本研究と同様なPBPK解析の実施により、効率的な医薬品開発および複数薬物の併用による安全な薬物治療に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：For drugs metabolized by multiple enzymes, precise estimation of the contribution of each metabolic enzyme is important in evaluating the effects of metabolic inhibition by co-administered drugs. Importance of paying attention to the buffer condition in *in vitro* metabolic studies was confirmed by our study investigating the contribution of CYP2C8 and CYP3A4 in the metabolism of repaglinide. In addition, a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling analysis demonstrated the involvement of both hepatic uptake inhibition and metabolic inhibition in the interaction between clarithromycin and glibenclamide. Similar PBPK analyses as in the present study are expected to facilitate the efficiency in drug development and to provide security in medication involving multiple drugs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物相互作用 生理学的薬物速度論モデル

1. 研究開始当初の背景

臨床において、薬物相互作用は予期せぬ副作用や毒性につながる危険性があることから、医薬品開発過程あるいは医療現場での適正使用において、相互作用の程度を定量的に予測することが重要である。従来、臨床で生じる薬物相互作用の主な要因として、薬物代謝酵素の阻害あるいは誘導に基づく体内動態変動が注目され、相互作用による血中濃度変化を定量的に予測する方法論が検討されてきた。

近年、薬物の吸収・分布・排泄において、生体膜に発現する種々の薬物トランスポーターが重要な役割を担うことが明らかとなり、それらを介する薬物相互作用も次々と明らかになっている。一例として、肝細胞の血管側膜に発現する organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1, OATP1B3 などのトランスポーターが併用薬によって阻害された場合、それらの基質となる薬物の肝細胞への取り込みが抑制され、代謝反応や胆汁排泄が抑制される結果、それらの薬物の消失が遅れ、血中濃度が上昇する可能性がある。肝取り込みと代謝の両者の関与が示唆される薬物相互作用も数多く報告されており、*in vitro* 試験データからそのような相互作用を定量的に予測することは、医薬品開発の効率化や臨床での危険な相互作用を回避する上で重要であると考えられる。

2012年に米国FDAと欧州EMAから相次いで発表された薬物相互作用に関する指針において、臨床相互作用試験実施の必要性を判断する際に生理学的薬物速度論(PBPK)モデルを利用することが提唱され、医薬品開発におけるその重要性が急速に高まっている。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓への取り込みトランスポーターおよび肝臓内の代謝酵素の両者が関与する薬物相互作用について、*in vitro* 試験データおよび各薬物の体内動態情報からPBPKモデルを用いて定量的に予測する方法を確立することにより、医薬品開発の効率化および臨床試験での危険や無駄の回避に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 薬物代謝におけるCYP分子種の寄与率推定に及ぼす緩衝液条件の影響

複数の代謝酵素の基質となる薬物では、併用薬による酵素阻害の影響を定量的に評価するために、当該基質の代謝における各酵素の寄与率を正確に評価することが重要である。ヒト肝ミクロソームを用いた*in vitro* 代謝試験において、緩衝液条件に依存してシトクロムP450(CYP)の代謝活性が異なることが報告されていることから、本研究では、これまでに報告のないCYP2C8および最も多くの薬物の代謝に関与するCYP3A4につ

いて、代謝活性および阻害活性に及ぼす緩衝液条件の影響を検討した後、糖尿病治療薬レパグリニドの代謝における両酵素の寄与率を測定した。

ヒト肝ミクロソームにおけるCYP2C8およびCYP3A4活性の緩衝液条件依存性

プールドヒト肝ミクロソームを使用し、パクリタキセル6-水酸化反応(CYP2C8活性)およびトリアゾラム-および4-水酸化反応(CYP3A4活性)を種々の緩衝液条件下で測定した。緩衝液としてはリン酸緩衝液あるいはトリス塩酸緩衝液(いずれもpH7.4)を用い、濃度はそれぞれ10mM, 50mM, 100mM, 200mMとした。各々の結果をMichaelis-Menten式に当てはめ、非線形最小二乗法により最大代謝速度(V_{max})およびMichaelis定数(K_m)を算出した。

また、上記代謝試験の反応液中におけるパクリタキセルおよびトリアゾラムの非特異的ミクロソーム結合を、それぞれ超遠心法および平衡透析法により測定した。

CYP2C8およびCYP3A4に対する阻害活性の緩衝液条件依存性

CYP2C8およびCYP3A4の阻害薬として、それぞれモンテルカストおよびケトコナゾールを使用し、ヒト肝ミクロソームにおけるパクリタキセル6-水酸化(CYP2C8)活性およびトリアゾラム-および4-水酸化(CYP3A4)活性に対するそれらの阻害活性が緩衝液条件に依存する可能性について検討した。汎用される緩衝液として、リン酸緩衝液およびトリス塩酸緩衝液(それぞれ50mMおよび100mM; pH7.4)を用いた。

レパグリニド代謝におけるCYP2C8およびCYP3A4の寄与率の推定

ヒト肝ミクロソームにおけるレパグリニドの代謝活性に対するモンテルカストおよびケトコナゾールの影響について、上記と同様の各緩衝液条件下で検討し、上記で得られた両阻害薬のCYP2C8およびCYP3A4に対する阻害活性を考慮することにより、レパグリニド代謝における両酵素の寄与率を推定した。

(2) 肝取り込み阻害と肝代謝阻害の両者を組み入れたPBPKモデル解析

肝取り込みと代謝の両者の関与が示唆される薬物相互作用の例として、臨床において、クラリスロマイシンの併用により経口血糖降下薬であるグリベンクラミドの血中濃度が上昇することが報告されている。この相互作用はグリベンクラミドの消失に関与する肝取り込みトランスポーター(OATPs)および代謝酵素(CYP3A4)をクラリスロマイシンが阻害することに起因すると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。この相互作用について、消化管、肝臓、肝臓外ス

ペース、脂肪、皮膚、筋肉および循環血から成る PBPK モデル (図 1) に基づいてシミュレーションを行った。肝臓 - 肝臓外スペース間の薬物の移動には、「肝取り込みにおける能動輸送と受動拡散の比」および「取り込み方向と汲み出し方向の受動拡散の比」を組み込み、それらの値はヒト遊離肝細胞を用いた *in vitro* 試験から求めた。また、グリベンクラミドの経口クリアランスが主代謝酵素である CYP2C9 の変異を持つヒトにおいて顕著に低いことから、グリベンクラミドの肝における固有クリアランスは肝取り込み律速ではないと考えられたため、本解析でもグリベンクラミドの消失は肝取り込み阻害および肝代謝阻害の両者から影響を受けるように設定した。各薬物単独投与時の体内動態パラメータを fitting 解析により求めた後、クラリスロマイシンによる CYP3A4 阻害パラメータを *in vitro* の報告値に固定し、両薬物併用時の血中グリベンクラミド濃度推移を単独投与時と同時 fitting することで、肝取り込みの阻害定数を見積もった。

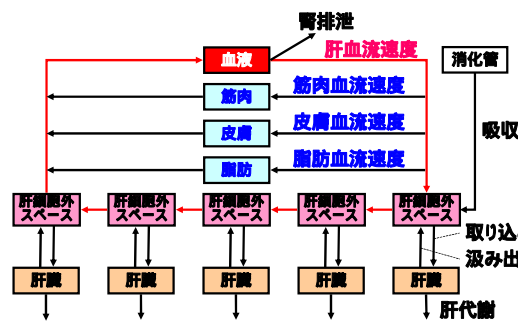


図 1 グリベンクラミドおよびクラリスロマイシンの PBPK モデル

4. 研究成果

(1) 薬物代謝における CYP 分子種の寄与率推定に及ぼす緩衝液条件の影響

ヒト肝ミクロソームにおける CYP2C8 および CYP3A4 活性の緩衝液条件依存性

パクリタキセル 6-水酸化反応 (CYP2C8 活性) およびトリアゾラム - および 4-水酸化反応 (CYP3A4 活性) のいずれにおいても、算出された Km 値はリン酸緩衝液と比較してトリス塩酸緩衝液の方が高く、緩衝液の種類により見かけの親和性が異なることが示唆された。また、両代謝活性ともに緩衝液の濃度によっても変動し、その変動パターンは緩衝液の種類により異なっていた (図 2)。CYP2C8 活性と CYP3A4 活性とは異なる変動パターンが認められたことから、薬物代謝における両酵素の寄与率を評価する際に、緩衝液条件によって異なる結果が得られる可能性が明らかとなった。

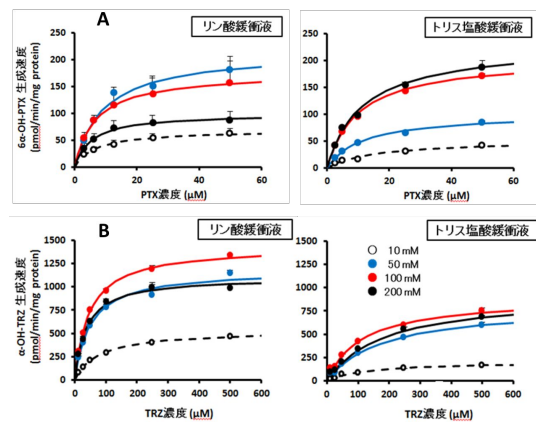


図 2 CYP2C8 によるパクリタキセル (PTX) 6-水酸化活性 (A) および CYP3A4 によるトリアゾラム (TRZ) 4-水酸化活性 (B) に及ぼす緩衝液条件の影響 (mean ± S.D., n=3)

パクリタキセルおよびトリアゾラムの非特異的ミクロソーム結合を測定した結果、緩衝液条件により若干の変動が見られたものの、その程度は小さく、緩衝液条件に依存した代謝活性の変動はミクロソーム結合の相違のみでは説明できないことが明らかとなった。

CYP2C8 および CYP3A4 に対する阻害活性の緩衝液条件依存性

トリアゾラムの代謝速度には緩衝液条件により最大 5.0 倍の相違が認められたが、ケトコナゾールによる阻害率は緩衝液条件に依存せず、50%阻害濃度 (IC₅₀) は 0.023 - 0.037 μM であった。同様に、パクリタキセルの代謝速度には緩衝液条件により最大 2.4 倍の相違が認められたが、モンテルカストによる阻害率は緩衝液条件に依存せず、IC₅₀ は 0.10 - 0.14 μM であった。すなわち、汎用される緩衝液条件下において、CYP2C8 および CYP3A4 の代謝活性は緩衝液依存的に大きく変動するものの、モンテルカストおよびケトコナゾールによるそれらの阻害活性は、緩衝液条件の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。

レパグリニド代謝における CYP2C8 および CYP3A4 の寄与率の推定

レパグリニドの代謝はモンテルカストおよびケトコナゾールのいずれによっても濃度依存的に阻害され、いずれの緩衝液条件においても、ケトコナゾールと比較してモンテルカストにより強く阻害された (図 3)。

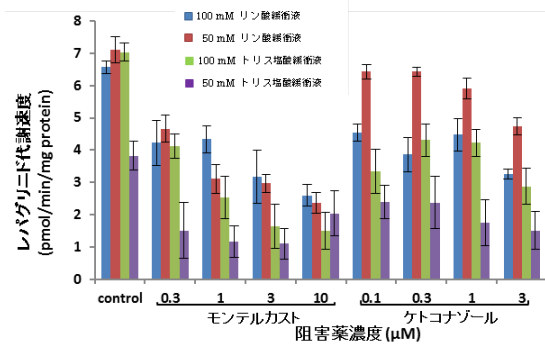


図 3 ヒト肝ミクロソームにおけるレバグリニド代謝に対するモンテルカストおよびケトコナゾールの阻害効果 (mean ± S.D., n=4)

レバグリニド代謝における CYP2C8 の寄与率 (fm_{2C8}) は、緩衝液条件により異なる値に見積もられたが、いずれの条件下においても CYP3A4 の寄与率より大きく、50 mM リン酸緩衝液条件下では、臨床相互作用試験の結果から PBPK モデルに基づいて推定された値 (約 0.8) と同程度となった。他の基質について fm_{2C8} を見積もる際にも同緩衝液が適切であるかについては今後の検討課題である。

各緩衝液条件下で見積もられた fm_{2C8} の値を PBPK モデルに組み入れ、CYP2C8 阻害薬ゲムフィプロジルとレバグリニドとの相互作用をシミュレーションすると、 fm_{2C8} に依存した結果が得られたことから、相互作用の定量的予測において、緩衝液条件に留意して各代謝酵素の寄与率を正確に推定することの重要性が確認された。

(2) 肝取り込み阻害と肝代謝阻害の両者を組み入れた PBPK モデル解析

PBPK モデル解析により、グリベンクラミドおよびクラリスロマイシン (図 4A) のそれぞれ単独投与時の血中濃度推移をほぼ再現することができた。クラリスロマイシンの体内動態パラメータを固定して上記相互作用について解析した結果、クラリスロマイシン併用時の血中グリベンクラミド濃度推移が良好に再現された (図 4B)。肝取り込み阻害定数は *in vitro* での報告値と比べて小さい値 (7 - 80 分の 1 程度) に見積もられた。その相違の程度は、クラリスロマイシンと同様に OATP1B1 を阻害するシクロスポリンについて PBPK モデル解析から見積もられた阻害定数と、*in vitro* 試験から得られた阻害定数との相違 (5 - 32 分の 1 程度) と同程度であった。また、本解析で得られたパラメータに基づくと、本相互作用におけるグリベンクラミドの血中濃度上昇には、肝取り込み阻害および肝代謝阻害の両者がほぼ同程度 (それぞれ 58% および 42%) 寄与することが推定され、グリベンクラミドは OATPs 阻害薬および CYP3A4 阻害薬のいずれとも併用に注意を要することが示唆された。

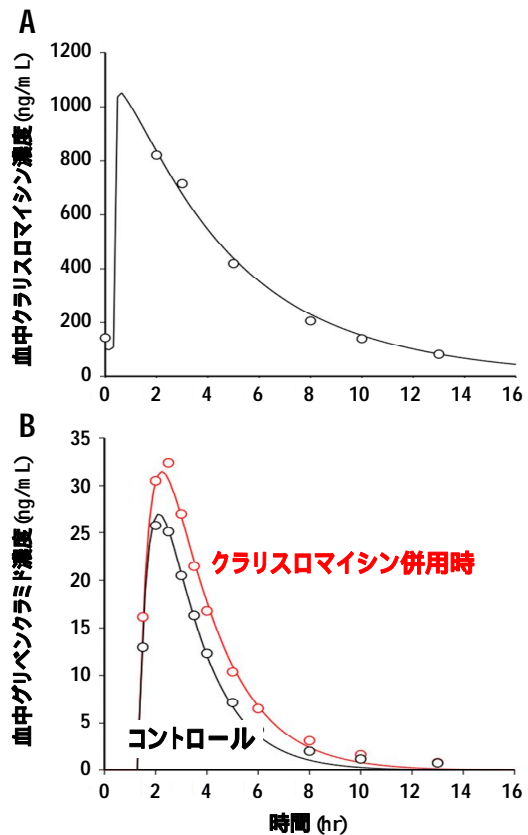


図 4 A: クラリスロマイシン反復経口投与時 (250 mg、1 日 2 回、5 回目の投与) の血中クラリスロマイシン濃度推移。B: グリベンクラミド単独経口投与時 (グリベンクラミド 0.875 mg 経口投与) およびクラリスロマイシン併用時 (クラリスロマイシン 5 回目の投与 1 時間後にグリベンクラミド 0.875 mg 経口投与) の血中グリベンクラミド濃度推移。シンボルは実測値、曲線は fitting ラインを表す。

欧米に続いて 2014 年に厚労省から発出された相互作用ガイドライン (最終案) においても、医薬品開発過程で臨床相互作用試験の必要性を判断したり、適切な臨床試験計画を立案するために、PBPK モデルに基づくシミュレーションにより薬物相互作用の可能性を予測することが提唱されている。肝臓への取り込みトランスポーターと肝細胞内の薬物代謝酵素の両者が関与する薬物相互作用について、本研究と同様な PBPK 解析を実施することにより、効率的な医薬品開発および複数薬物の併用による安全な薬物治療の一助となることが期待される。

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 9 件)

Kudo T, Goda H, Yokosuka Y, Tanaka R, Komatsu S, Ito K. Estimation of the contribution of CYP2C8 and CYP3A4

in repaglinide metabolism by human liver microsomes under various buffer conditions. J. Pharm. Sci., accepted 査読有

Kudo T, Ozaki Y, Kusano T, Hotta E, Oya Y, Komatsu S, Goda H, Ito K. Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6 α -hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam α - and 4-hydroxylation by human liver microsomes. Xenobiotica. 46, 241-246 (2016). 査読有

Kudo T, Endo Y, Taguchi R, Yatsu M, Ito K. Metronidazole reduces the expression of cytochrome P450 enzymes in HepaRG cells and cryopreserved human hepatocytes. Xenobiotica. 45, 413-419 (2015). 査読有

Mano Y, Sugiyama Y, Ito K. Use of a physiologically based pharmacokinetic model for quantitative prediction of drug-drug interactions via CYP3A4 and estimation of the intestinal availability of CYP3A4 substrates. J Pharm Sci. 104, 3183-3193 (2015). 査読有

Ozeki K, Kato M, Sakurai Y, Ishigai M, Kudo T, Ito K. Evaluation of the appropriate time range for estimating the apparent permeability coefficient (Papp) in a transcellular transport study. Int J Pharm. 495, 963-971 (2015). 査読有

伊藤清美. 医薬品の適正使用に必要な最近の薬物動態学：薬物相互作用のリスクを予測する。くすりとう糖尿病 3, 24-27 (2014) 査読無

〔学会発表〕(計 24 件)

左田野光代、合田ひとみ、横須賀友希、工藤敏之、伊藤清美. ヒト肝ミクロソームにおける S-ワルファリン代謝活性に及ぼす緩衝液条件の影響。第 26 回日本医療薬学会年会 (2016 年 9 月 18 日, 国立京都国際会館, 京都)

工藤敏之、荻原将人、中村敏明、伊藤清美. 抗てんかん薬の薬物相互作用 (バルプロ酸 - ラモトリギン) の生理学的薬物速度論モデル解析。医療薬学フォーラム 2016/第 24 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2016 年 6 月 25 日, 滋賀県立芸術劇場 びわ湖ホール, 滋賀)

横須賀友希、吉原早映、左田野光代、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美. Repaglinide 代謝における CYP2C8 の寄与率に及ぼす緩衝液条件の影響。日本薬剤学会第 31 年会 (2016 年 5 月 19 -

20 日, 長良川国際会議場, 岐阜)
東川 汀、河合柚佳里、草野友見、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美. トリアゾラムおよびパクリタキセルのミクロソーム結合に及ぼす緩衝液の種類および濃度の影響。日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜, 神奈川県)

横須賀友希、藤原里紗、合田ひとみ、工藤敏之、伊藤清美. ケトコナゾールおよびモンテルカストの CYP3A4 および CYP2C8 阻害活性に及ぼす緩衝液の種類および濃度の影響。日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜, 神奈川県)

伊藤清美. 代謝レベルで生じる薬物相互作用の定量的解析。第 36 回日本臨床薬理学会学術総会 (2015 年 12 月 11 日, 京王プラザホテル, 東京)

Kudo T, Ozaki Y, Kusano T, Kawai Y, Hotta E, Goda H, Oya Y, Komatsu S, Ito K. Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6 α -hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam α - and 4-hydroxylation by human liver microsomes. 日本薬物動態学会第 30 回年会 (2015 年 11 月 12 日, タワーホール船堀, 東京)

河合柚佳里、尾崎裕哉、堀田絵梨、草野友見、東川 汀、工藤敏之、伊藤清美. ヒト肝ミクロソームにおけるパクリタキセル代謝活性に及ぼす緩衝液の種類と濃度の影響。医療薬学フォーラム 2015/第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2015 年 7 月 4 - 5 日, 名古屋国際会議場, 愛知)

Ito K. Use of modeling and simulation for the prediction of drug interaction. 19th International Conference on Cytochrome P450 (2015 年 6 月 14 日, 国立オリンピック記念青少年総合センター, 東京)

伊藤清美. 代謝における DDI の予測; 今後の問題点。第 363 回 CBI 学会講演会 (2015 年 6 月 11 日, 東京大学山上会館, 東京)

草野友見、尾崎裕哉、合田ひとみ、河合柚佳里、東川 汀、工藤敏之、伊藤清美. ヒト肝ミクロソームにおけるトリアゾラムの水酸化活性に及ぼす緩衝液の種類と濃度の影響。日本薬学会第 135 年会 (2015 年 3 月 26 日, 神戸サンボホール, 兵庫)

工藤敏之、杉山雄一、伊藤清美. 肝取り込みおよび肝代謝阻害に基づく薬物相互作用の生理学的薬物速度論モデル解析。第 3 回日本くすりと糖尿病学会学術集会 (2014 年 11 月 2 - 3 日, アクロス福岡, 福岡)

Kudo T, Ozaki Y, Hotta E, Matsubara

A, Ito K. Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated 6 α -hydroxylation of paclitaxel by human liver microsomes. 19th North American ISSX meeting/29th JSSX meeting (2014 年 10 月 21 日, San Francisco, USA)

Kobashi A, Ciloy JM, Matsushita M, Maeda K, Ito K. Quantitative prediction of drug-drug interactions by PBPK model using the in vivo Ki values. 19th North American ISSX meeting/29th JSSX meeting (2014 年 10 月 20 日, San Francisco, USA)

尾崎裕哉、堀田絵梨、松原亜耶、工藤敏之、伊藤清美. パクリタキセル 6 α 水酸化反応におけるトリス塩酸緩衝液濃度依存的な活性の変動. 医療薬学フォーラム 2014/第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2014 年 6 月 28 - 29 日, 東京ビックサイト, 東京)

立原有夏、合田ひとみ、草野友見、工藤敏之、伊藤清美. Glibenclamide 代謝に関与する CYP 分子種の寄与率の推定. 医療薬学フォーラム 2014/第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2014 年 6 月 28 - 29 日, 東京ビックサイト, 東京)

伊藤清美. 代謝酵素の関わる薬物相互作用の予測. 第 351 回 CBI 学会研究講演会 (2014 年 6 月 19 日, 東京大学弥生講堂, 東京)

工藤敏之、杉山雄一、伊藤清美. 肝取り込みおよび肝代謝阻害に基づく clarithromycin と glibenclamide の相互作用の生理学的薬物速度論モデル解析. 第 22 回肝病態生理研究会 (2014 年 5 月 31 日, 都市センターホテル, 東京)

峯崎萌子、安部謙佑、伊藤 栞、工藤敏之、都丸充子、杉山雄一、伊藤清美. Clarithromycin による rosuvastatin の肝取り込み阻害の検討. 日本薬剤学会第 29 年会 (2014 年 5 月 22 日, 大宮ソニックシティ, 埼玉)

Kudo T, Hisaka A, Sugiyama Y, Ito K. Analysis of the repaglinide concentration increase produced by gemfibrozil and itraconazole based on the inhibition of the hepatic uptake transporter and metabolic enzymes. Experimental Biology 2014 (2014 年 4 月 28 日, San Diego, USA)

〔図書〕(計 1 件)

工藤敏之、伊藤清美. ミクロソームを用いたシトクロム P450 (CYP) 活性の測定. 薬剤学実験法必携マニュアル Pharmaceutical Scientist のために . 生物薬剤学 株式会社南江堂, 2014, pp. 163-174.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 清美 (ITO, Kiyomi)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号 : 6 0 2 3 2 4 3 5

(2) 研究分担者

工藤 敏之 (KUDO, Toshiyuki)
武蔵野大学・薬学研究所・講師
研究者番号 : 1 0 5 8 4 8 1 5