

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04006

研究課題名(和文) ヒト肝キメラマウスの活用による複雑な薬物相互作用の定量的予測法の精緻化

研究課題名(英文) Precise quantitative prediction of complex drug-drug interactions with the use of human liver chimeric mice

研究代表者

前田 和哉 (Maeda, Kazuya)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：00345258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト肝クリアランスの新たな予測系として、ヒト肝臓キメラマウスおよび単離肝細胞が利用可能であるかを、主にトランスポーターを介した薬物輸送の観点から定量的解析を行った。その結果、取り込みクリアランスは複数のロット由来のキメラマウスについて、既報のヒト肝固有クリアランスをヒト凍結肝細胞同様の精度で予測可能であることが示された。サンドイッチ培養肝細胞による薬物の胆汁排泄も複数ロットについて観察可能であった。さらにキメラマウス *in vivo*での胆汁排泄クリアランスは、ヒトでの実測値とよく相関した。故に本実験系は、薬物のヒト肝胆系輸送を模倣可能な実験系として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、創薬におけるヒト動態予測の一環として行われる肝クリアランスの予測ツールとして、これまでのヒト凍結肝細胞が有するロットの有限性やロット間差といった欠点のため、安定したデータを継続的に取るのが困難である状況を鑑み、ヒト肝臓キメラマウスおよび単離肝細胞が新たな動態予測ツールとなりえるかを定量的に評価すべく、特に知見の少ない薬物トランスポーター活性に着目して検討を行ったものであり、少し利用法には留意すべき点はあるものの、概ね本実験系がこれまでの実験系の代替手段になることを明らかにした点で、創薬の推進に貢献する研究であるといえる。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to clarify whether human liver chimeric mice and their isolated hepatocytes can be used as a novel system for the quantitative prediction of human hepatic clearance of drugs. As a result, *in vivo* hepatic intrinsic clearance in humans could be well predicted from uptake clearance of drugs estimated with various batches of hepatocytes isolated from chimeric mice. Biliary excretion clearance of drugs in sandwich cultured hepatocytes from various batches of chimeric mice can also be observed. Moreover, *in vivo* biliary excretion clearance in chimeric mice is well correlated with human biliary excretion clearance. Thus, this experimental system with chimeric mice is very useful to mimic hepatobiliary transport of drugs in humans.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：ヒト肝臓キメラマウス 胆汁排泄 肝取り込み 薬物動態予測 トランスポーター 肝細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物動態を定量的に理解する上で、肝クリアランスの定量的な予測は必須要件の一つとなる。従来、薬物の肝クリアランスは主に cytochrome P450 (CYP) に代表される代謝酵素を介した代謝によるとされており、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝試験の結果導かれた肝固有クリアランスを基に推定されてきた。しかしながら近年、肝取り込み・排出過程にトランスポーターの関与が認められる薬物が認められるようになり、定量的なヒト肝クリアランス推定のためには、代謝のみならず膜透過過程も考慮する必要に迫られており、ヒト凍結肝細胞を用いた代謝酵素・トランスポーターの両方を考慮したクリアランス推定が進められている。現状、ヒト凍結肝細胞は購入可能な状況ではあるが、代謝・輸送機能のロット間差が大きく、1ロットの肝細胞数には限りがあることから、安定的なデータを継続して得ることは難しいのが現状である。また、培養時間依存的に薬物の代謝・輸送に関わる異物解毒関連遺伝子の発現が著しく低下することが知られており、長期間培養には限界がある。一方、近年、ヒト肝細胞を肝障害かつ免疫不全マウスに移植したヒト肝臓キメラマウスの薬物動態解析への利用が進みつつある。本系の特徴は、マウス *in vivo* 試験で、肝クリアランスだけをヒトの値として評価できるメリットがある。さらに、ヒト肝臓キメラマウスにおいては、移植したヒト凍結肝細胞の約 100 倍に細胞数が増殖することから、同じロットのヒト肝細胞が大量に利用可能になることに関しても期待が持たれる。しかしながら、網羅的な蛋白発現の観点からは、キメラマウス由来肝細胞とヒト肝細胞は類似の発現プロファイルを示すことが既報で示されているものの、個々のトランスポーターの機能を定量的に解析した情報は極めて欠如している。そこで、ヒト肝臓キメラマウスをヒト肝クリアランスの予測系や薬物相互作用の精緻な評価として創薬に活用するために定量的な情報を収集することが必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

薬物相互作用の精緻な予測のためには、薬物の肝胆系代謝・輸送挙動を正確に把握する必要がある。ヒト肝キメラマウスはヒト肝細胞が組織体を構成した状態でヒト肝代謝・輸送が観察可能な唯一の実験系であるが、現状では定性的な代謝物分析にしか活用されておらず、定量的な薬物動態解析に利用可能かはほとんど検討されていない。また、ヒト肝キメラマウス由来の肝細胞も安定的に同一ロットの性質を維持したヒト肝細胞を供給できる新たなソースとして期待が持たれる。そこで本研究では、キメラマウスをヒト *in vivo* 肝臓のサロゲートモデルとして利用すると共に、同一背景の新鮮ヒト肝細胞の供給源として活用することにより、モデルパラメータ設定における種々の *in vitro-in vivo* 乖離の原因探索と、適切なパラメータ設定に寄与する *in vitro* 評価法・キメラマウスを用いた *in vivo* 評価法を確立することで、創薬現場で利用可能な薬物相互作用リスクの精緻な定量的評価法を実現化するための基礎情報を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Hu-liver TK-NOG マウスを用いた胆汁排泄型薬物の *in vivo* 胆汁排泄クリアランスの評価

比較的ヒト肝細胞への置換率の高い(70%以上) Hu-liver TK-NOG マウスおよびヒト肝細胞を移植していない TK-NOG マウスは、(公財) 実験動物中央研究所よりご供与いただいた。両マウスに胆管カニューレを施した後、ヒトで胆汁排泄型とされる薬物群で、過去にげっ歯類とヒトで胆汁排泄クリアランスが大きく異なるとされている statin, sartan, cefem 系の各薬物群を複数まとめて同時にカクテルで静脈内定速投与を行い、投与開始 30, 60, 90 分後に血液と胆汁を採取した。薬物濃度は、LC-MS/MS にて測定を行った。それらのデータに基づき、血漿中濃度基準の胆汁排泄クリアランスおよび肝臓中濃度基準の胆汁排泄クリアランスの両パラメータを計算した。

#### (2) PXB マウス<sup>®</sup>由来肝細胞(PXB-cells<sup>®</sup>)を用いた培養肝細胞における薬物の取り込みクリアランスおよびその培養時間依存性の評価

PXB-cells<sup>®</sup>は、(株) フェニックスバイオにおいて単離・dish に播種された細胞をご供与いただいた。播種後 2, 3, 5, 7, 10, 14 日後の各時点で、OATP (organic anion transporting polypeptide) 1B1, OATP1B3, OCT (organic cation transporter) 1, NTCP (Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide) それぞれの放射標識プローブ(選択的) 基質および胆汁排泄型の薬物 8 種類を用いて肝細胞への短時間の取り込み実験を行った。対照としては、IVAL 社の 2 ロットのヒト凍結肝細胞を用いて同様の実験を行った。薬物濃度の定量は、放射標識化合物は、液体シンチレーションカウンターを用いて、非標識体は、LC-MS/MS を用いて測定を行った。本実験は、PXB マウスに移植する元の肝細胞として、異なる 2 ロット由来のヒト凍結肝細胞を用いて実施した。また、mRNA の定量は、各トランスポーターに対する選択的なプライマーを用いた定量的 PCR 法により行い、タンパクの定量は、トランスポーターに対する抗体を用いて Western blot 法を行って、バンド濃度を定量することにより行った。

#### (3) Hu-liver TK-NOG マウスから単離した肝細胞を用いたサンドイッチ培養系での薬物の胆汁排泄クリアランスの評価

Hu-liver TK-NOG マウス由来の単離ヒト肝細胞は、(公財) 実験動物中央研究所よりご供与いただいた。単離 1 日後の遊離細胞を、常法に従い、collagen type I でコートした dish の上に肝

細胞を播種し、24 時間後に細胞の上に Matrigel を重層して培養するサンドイッチ培養を行った。その後、Ca<sup>2+</sup>を含む buffer で incubation して bile pocket が閉じた状態と、Ca<sup>2+</sup>を含まない buffer で incubation して bile pocket が開放された状態の両方において、一定時間の薬物の取り込みを観察し、それらの差分を求めることで bile pocket 中の薬物量を見積もった。薬物量の定量は、LC-MS/MS を用いて行った。また、mRNA の定量は、各トランスポーターに対する選択的なプライマーを用いた定量的 PCR 法により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Hu-liver TK-NOG マウスを用いた胆汁排泄型薬物の in vivo 胆汁排泄クリアランスの評価

ヒトとげっ歯類の間で胆汁排泄に種差が存在することが既報の薬物について、胆汁排泄を in vivo で比較したところ、対照マウス(TK-NOG マウス)における胆汁排泄クリアランスは、ヒト肝臓キメラマウスと比較して全体的に大きい傾向が見られ、既報の複数の薬物のヒト胆汁排泄クリアランスとの間の相関では、キメラマウスの方が対照マウスと比較して、回帰直線の傾きが 1 に近く、さらに回帰直線に対して測定値がより近い値を示すことが分かった。なお、細かく見ると、9 種類の薬物の動態の変動パターンは、4 パターンに分類できることが示唆され、キメラマウスにおいて、血漿中及び肝臓中濃度の上昇がみられ、薬物の肝臓内から胆汁中への排泄の顕著な低下が示唆される群、血漿中濃度の上昇および肝臓内濃度および胆汁排泄速度の低下がみられ、肝取り込み・胆汁排泄の両過程の低下が示唆される群、血漿中濃度は変化しないが、肝臓内濃度および胆汁排泄速度の低下がみられ、血漿中濃度に対する肝クリアランスの影響が小さい群、全てのパラメータの変動が見られない群に分かれることが分かった。また、胆汁排泄クリアランスの絶対値の比較において、ヒト肝臓キメラマウスの胆汁排泄クリアランスは、全体的にはヒトでの報告値の 1/2 ~ 1/3 程度であった。但し、ヒトの胆汁排泄クリアランスの報告値が胆管カニューレを施した患者データしかなく極めて限定的であることから、必ずしもこのデータをもって胆汁排泄クリアランスの予測値の大小を議論できるものではない。この点については、今後ヒト PET 試験によるより非侵襲的な胆汁排泄クリアランスの測定値との比較を行うことで検討を継続していきたいと考えている。一方、キメラマウスの胆管の走行について、胆管の出口からインクを逆注入して臓器を透明化する手法をとったところ、胆管の末端部がコイル状になっており、一部胆管構造の異常が認められた。こういった事象が、キメラマウスにおける胆汁排泄クリアランスの減少に寄与するかは現時点で不明であり、今後の課題である。

##### (2) PXB マウス<sup>®</sup>由来肝細胞(PXB-cells<sup>®</sup>)を用いた培養肝細胞における薬物の取り込みクリアランスおよびその培養時間依存性の評価

キメラマウス(PXB マウス<sup>®</sup>)由来単離肝細胞(PXB-cells<sup>®</sup>)の培養日数依存的な肝取り込み能力の変動について、ヒト凍結肝細胞と比較して調べたところ、複数の薬物の取込みクリアランスの間には良好な相関性が観察され、血漿中濃度基準のヒト胆汁排泄クリアランスとの間にも良好な相関関係が認められた。また、その取り込みは、既報の別ロットのヒト凍結肝細胞における取り込みとも良好な相関が観察された。一方、培養時間に依存して OATP1B1 基質薬物は、2 週間にわたってあまり取り込み活性は低下しないものの、OATP1B3 基質は培養後数日後には著しく取り込み活性が低下する。一方、mRNA やタンパクレベルでの発現変動を調べたところ、培養後 2 日目に降顕著な mRNA 発現低下が認められたことから、マウス由来の肝細胞の混入はほぼ考えなくてよいことが示唆された。但し、特に OATP1Bs については、典型的な基質薬物の輸送活性の培養時間依存性と mRNA 発現の時間推移が必ずしも一致しないこと、また、OATP2B1 や NTCP のように、基質選択性の類似した別のトランスポーターの mRNA 発現が、培養 7 日後位から上昇傾向を示すことから、長期培養後の薬物の取込みは、本来の生理的な状態での肝取り込みを担うトランスポーターとは別の分子種によって担われている可能性が考えられ、結果の解釈に注意が必要である。

さらに、薬物の取り込みトランスポーターの輸送活性ならびに培養期間依存的な輸送機能維持の傾向が、ヒト肝臓キメラマウスを構築する元のヒト凍結肝細胞のロットに依存するか否かを調べるべく、別ロットのヒト凍結肝細胞由来のヒト肝臓キメラマウス由来の肝細胞を用いて、in vitro 実験を行った。その結果、薬物のキメラマウス由来肝細胞への取り込み活性及びその培養期間依存性については、一部のトランスポーターの活性変動は見られたものの、全体としてみれば、前ロットとほぼ同一の傾向を示したことから、ヒト肝臓キメラマウスは、少なくとも異なる 2 ロット由来のものであっても、単離肝細胞は安定的に良好な輸送活性を維持できている可能性が示唆された。

##### (3) Hu-liver TK-NOG マウスから単離した肝細胞を用いたサンドイッチ培養系での薬物の胆汁排泄クリアランスの評価

ヒト肝臓キメラマウス由来の肝細胞をサンドイッチ培養法により胆汁排泄トランスポーターの機能評価を試みたところ、各種薬物について、良好な胆管腔への排出が観察され、ヒト凍結肝細胞では良好な活性を有するロットを見つけることが困難であるのに対して、キメラマウス由

来の fresh な細胞がサンドイッチ培養肝細胞のアッセイに適している可能性が考えられた。

さらに、複数ロット由来のヒト肝臓キメラマウスから単離した肝細胞を用いて、サンドイッチ培養肝細胞の系を構築し、ヒトにおいて主に未変化体で胆汁排泄されることが想定される既知の薬物について胆管腔への排出およびその阻害薬による阻害効果を観察した。その結果、ロットに関わらず単離肝細胞は、単離後 1 日間遊離の状態であっても、type I collagen コートされた dish に対する生着性は非常に良好であり、サンドイッチ培養肝細胞を行った際も複数のロットに対して胆管腔の形成、carboxydichlorofluorescein diacetate (CDF-DA)の胆管腔への蓄積が見られた。また、胆汁排泄率の高い rosuvastatin や胆汁酸 taurocholate の胆管腔への排出は、論文報告されているヒト凍結肝細胞を用いて行ったサンドイッチ培養肝細胞(SCHH)の結果と同レベルであった。

また、ロットによっては、通常は SCHH の系では検出が難しいとされる胆汁排泄の絶対値が小さい pravastatin, olmesartan, valsartan の胆管腔への排出も検出されたが、ロット間差の明確な原因追及には至っていない。また、ヒト肝キメラマウスの系の場合、置換されず残存したマウス肝細胞由来の遺伝子発現がヒトにおける評価に影響するとの懸念があることから、マウス由来の各種トランスポーター遺伝子の mRNA 発現を調べたところ、培養 2 日後の時点では、調べたトランスポーター遺伝子はいずれも検出限界以下となったことから、サンドイッチ培養系においては、マウストランスポーターの影響は排除できることが示唆された。以上より、通常 SCHH の系では問題となる肝細胞の生着率や胆管腔形成効率については、ヒト肝キメラマウス由来肝細胞の方が、ロット間差を超えて高いことが示唆され、さらにマウス由来遺伝子の影響が少ないことが考えられたことから、有用な細胞ソースとなることが推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 前田 和哉	4. 巻 271
2. 論文標題 トランスポーターを介した薬物相互作用 ~ 臨床事例とその回避のための予測戦略 ~	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 136-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田和哉
2. 発表標題 新しい細胞・組織ソースを利用した薬物動態解析の最前線と今後の課題
3. 学会等名 第407回CBI学会講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuya Maeda
2. 発表標題 Recent progress in newly-developed cell systems for the characterization of pharmacokinetic properties of drugs
3. 学会等名 第15回 杉山特別研究室（理研）公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuya Maeda
2. 発表標題 Current situation and future perspective of the quantitative prediction of drug-drug interaction risks
3. 学会等名 International Symposium on drug-drug interaction and clinical rational drug usage（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古屋詩乃、寺島花野、前田和哉、石田雄二、立野知世、楠原洋之
2. 発表標題 ヒト肝臓キメラマウス(PXBマウス)由来肝細胞(PXB-cells)の作製由来凍結肝細胞ロットによるトランスポーター基質薬物の輸送活性の差異に関する検討
3. 学会等名 第26回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺島花野、前田和哉、米田直央、西脇恵、神村秀隆、末水洋志、楠原洋之
2. 発表標題 ヒト肝臓キメラマウスHu-Liver TK-NOGマウスを用いたトランスポーター基質薬物の肝胆系輸送の評価
3. 学会等名 第25回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺島花野、前田和哉、石田雄二、立野知世、楠原洋之
2. 発表標題 ヒト肝臓キメラマウス(PXBマウス)由来肝細胞(PXB-cells)を用いたトランスポーター基質薬物の胆汁排泄クリアランスのin vitro-in vivo予測の検討
3. 学会等名 第25回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺島花野、前田和哉、米田直央、西脇恵、神村秀隆、末水洋志、楠原洋之
2. 発表標題 ヒト肝臓キメラマウスHu-Liver TK-NOGマウスによるトランスポーター基質のヒト肝胆系輸送の定量的評価に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hanano Terashima, Kazuya Maeda, Yuji Ishida, Chise Tateno, Hiroyuki Kusahara
2. 発表標題 Comparison of the expression and function of hepatic drug uptake transporters in hepatocytes (PXB-cells) derived from humanized-liver mice (PXB-mice) and human cryopreserved hepatocytes
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第32回年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----