

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08423

研究課題名(和文) 経口バイオアベイラビリティを代謝経路に依存せず予測する手法の確立

研究課題名(英文) Quantitative prediction of oral bioavailability independent of metabolic pathway

研究代表者

伊藤 智夫 (ITO, Tomoo)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：30223168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3A4基質の経口バイオアベイラビリティと相互作用を定量的に予測するモデルとして我々が確立したITAM-PKモデルを用いて、CYP1A2の基質であるチザニジンとテオフィリンの経口バイオアベイラビリティを定量的に予測可能であることが示された。一方、CYP1A2基質であるチザニジンと、CYP1A2阻害薬であるフルボキサミンおよびシプロフロキサシンの相互作用をITAM-PKモデルで予測したところ、フルボキサミンとの相互作用は良好に予測できたが、シプロフロキサシンの相互作用の予測性は低く、シプロフロキサシンの阻害様式または細胞内動態をさらに検討する必要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

試験管内の実験データをもとに、薬物を経口投与のバイオアベイラビリティや薬物間相互作用を定量的に予測することができれば、医薬品開発の無駄をなくし、ヒトに投与する前に薬物間相互作用を回避することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：ITAM-PK model was developed to quantitatively predict oral bioavailability and drug-drug interactions for orally administered CYP3A4 substrates. The present study aimed to apply the model to quantitatively predict the bioavailability and drug-drug interactions for the substrates that are metabolized by enzymes other than CYP3A4. Oral bioavailability of CYP1A2 substrates, tizanidine and theophylline, were reasonably well predicted. For propranolol, cellular binding of the substrate needs to be incorporated to predict oral bioavailability. Drug-drug interactions (DDI) between tizanidine and fluvoxamine, a CYP1A2 inhibitor, were quantitatively predicted very well. On the other hand, DDI between tizanidine and ciprofloxacin, another CYP1A2 inhibitor, was not well predicted.

研究分野：薬物動態学

キーワード：経口投与 バイオアベイラビリティ 薬物間相互作用 定量的予測

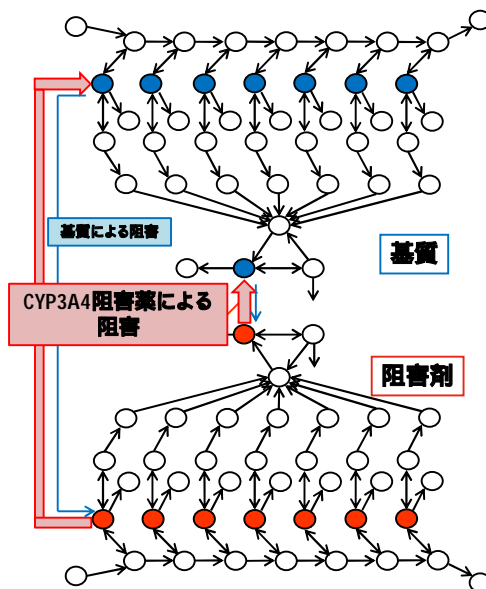
1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、ヒト小腸マイクロソームを用いた代謝実験と Caco-2 細胞を用いた薬物輸送実験を組み合わせることにより、シトクロム P450 (CYP) 3A4 の基質となる薬物の小腸初回通過効果を *in vitro* データから定量的に予測するモデルを提唱してきた。また、ヒト小腸を7つのコンパートメントに分割して小腸内の薬物の移動と吸収を考慮したモデル (CAT (Compartmental absorption and transit)モデル)に基づき、小腸の各コンパートメントに CYP3A4 発現量を割り振り、各コンパートメントにおいて、基質の消化管内移動、上皮細胞への移行、上皮細胞内での代謝、そして上皮細胞から血液側への移行を組み込んだ微分方程式を立て、得られた微分方程式を数値的に解くことによって、CYP3A4 基質の小腸アベイラビリティ (Fig) を予測する手法についても報告してきた。また、この ITAM (Intestinal transit, absorption and metabolism)モデルを用いて小腸初回通過代謝における薬物相互作用を定量的に予測することも試みてきた。

さらに我々は、肝灌流モデルに従って肝初回通過代謝における薬物相互作用 (代謝阻害) を *in vitro* で半定量的に予測するモデルを提示していたが、この肝灌流モデルと ITAM モデルを連結した ITAM-PK (ITAM based pharmacokinetic) モデルを構築して (Fig. 1) 経口投与後のバイオアベイラビリティと薬物相互作用が、ある程度定量的に予測可能であることを示してきた。

本研究では、我々が構築してきた ITAM-PK モデルを用いて、CYP3A4 以外の酵素で代謝される薬物の経口バイオアベイラビリティおよび薬物相互作用の定量的予測を試みた。特に、CYP1A2 の基質であるチザニジンと、CYP1A2 阻害薬であるフルボキサミンおよびシプロフロキサシンの相互作用を定量的に予測することを試みた。

Fig.1 ITAM-PK model for quantitatively predicting drug-drug interactions



2. 研究の目的

CYP3A4 以外の酵素で代謝される薬物について、その経口バイオアベイラビリティと、阻害薬を併用したときの相互作用を定量的に予測するモデルを確立することを目的とする。CYP1A2 の基質としてチザニジン (TIZ)、テオフィリン、プロプラノロールを用いた。CYP1A2 阻害薬としては、フルボキサミン (FVX) およびシプロフロキサシン (CPF) を用いた。FVX および CPF とともに競合的に CYP1A2 阻害するとされている。これらの阻害薬は、相

相互作用が臨床上問題となっている薬物であり、両薬物ともチザニジンとは併用禁忌となっている。本研究では、これら2つの阻害薬による薬物相互作用の定量的予測を目指した。

3. 研究の方法

ヒト肝および小腸ミクロソームを用いた代謝実験、代謝阻害実験より、基質および阻害薬の代謝パラメータや代謝阻害パラメータを *in vitro* で算出した。また、Caco-2 細胞を用いた透過実験、蓄積実験より、基質および阻害薬の小腸上皮細胞内の移行パラメータを *in vitro* で見積もった。これらの *in vitro* で算出されたパラメータ値を、上記の ITAM-PK モデルに組み込むことで、CYP1A2 基質（チザニジン、テオフィリン、プロプラノロール）の経口バイオアベイラビリティを定量的に予測した。また、薬物間相互作用のために併用禁忌となっている、チザニジンとフルボキサミンおよびシプロフロキサシンとの併用時の相互作用を定量的に予測した。

4. 研究成果

まず、肝ミクロソームを用いた代謝実験から、チザニジンの代謝パラメータとして $K_m = 46 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 0.43 \text{ nmol/min/mg protein}$ が得られた。一方、小腸ミクロソームを用いた代謝実験ではチザニジンの代謝は認められず、チザニジンは小腸上皮細胞透過過程における初回通過代謝を受けないと考えられた。このことは、小腸ミクロソーム中の CYP1A2 の含有量が極めて小さいことから予想された結果であった。次に、Transwell 上に培養した Caco-2 細胞単層の透過係数 (P_{app}) は、apical basal の透過係数 $P_{\text{app, a-b}} = 18.8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 、basal apical の透過係数 $P_{\text{app, b-a}} = 18.2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ となり、両方向の透過係数がほぼ同じ値であったことから、チザニジンは単純拡散で小腸上皮細胞を透過し、排出輸送担体の影響を受けないと考えられた。

以上で得られたパラメータ値を用い、阻害薬非共存下で ITAM-PK モデルに従ってチザニジン (4 mg) を経口投与後のバイオアベイラビリティ (F) を算出したところ 0.27 となり、ヒトにおける報告値 ($F = 0.21$) とほぼ同じ値となった。さらに、分布容積等を考慮してチザニジン経口投与後の血中濃度を予測し AUC を算出したところ $3.5 \text{ ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$ となった。ヒト投与試験では AUC の値として、 $6.6 \pm 2.9 \text{ ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$ (Granfors MT. et al., Clin Pharmacol Ther 75:331-41, 2004.) および $3.4 \pm 2.3 \text{ ng} \cdot \text{h} / \text{mL}$ (Granfors MT. et al., Clin Pharmacol Ther 76:598-606, 2004.) が報告されており、ITAM-PK モデルによるチザニジン経口投与後の血中濃度の予測は、ヒト投与試験での報告値とほぼ同じであった。

CYP1A2 の基質であるチザニジンの経口バイオアベイラビリティと血中濃度が予測可能であることが示されたので、同じ CYP1A2 の基質であるテオフィリンとプロプラノロールの経口バイオアベイラビリティの予測を試みた。テオフィリンについては文献報告より、肝ミクロソームにおける主代謝物の代謝パラメータとして $K_m = 2.7 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 1.3 \text{ nmol/min/mg protein}$ が得られた。また、Caco-2 細胞単層の透過係数として $P_{\text{app, a-b}} = 26.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ が報告されており、これらの値を ITAM-PK モデルに代入してテオフィリン (200 mg) を経口投与後の F を算出したところ 0.99 となり、ヒトにおける報告値 ($F = 0.96 \pm 0.08$) と同程度の値となった。主代謝物に加え、2つの代謝物の代謝パラメータも考慮して ITAM-PK モデルで経口バイオアベイラビリティを算出したところ、 F の値は同じ 0.99 となった。従って、テオフィリンは経口投与後に初回通過効果をほとんど受けないことが、ITAM-PK モデルによる予測でも示された。

プロプラノロールについては、文献報告より肝ミクロソームにおける S 体の代謝パラメータとして $K_m = 22 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 96 \text{ nmol/min/mg protein}$ が、ラセミ体としての Caco-2 細胞単層の透過係数として $P_{\text{app, a-b}} = 27.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ が得られ、これらの値を ITAM-PK モデルに代入してプロプラノロール (10 mg) を経口投与後の F を算出したところ 0.01 となり、ヒトに

おける報告値 ($F = 0.26 \pm 0.10$) より極めて小さい値となった。プロプラノロールは脂溶性が高く ($\text{LogP} = 3.48$)、細胞内での非結合率が小さいと考えられ、種々の薬物の LogP 値と Caco-2 細胞内非結合分率の関係から、プロプラノロールの細胞内非結合率が 0.05 と見積もられた。この値を ITAM-PK モデルに組み込んでプロプラノロールの経口バイオアベイラビリティを算出したところ、 F の値は 0.18 となり、報告値に近い値が得られた。従って、脂溶性の高い基質の経口バイオアベイラビリティの予測に際しては、細胞内非結合率を考慮する必要があることが示された。

他の CYP 基質についても、同様の手法で経口バイオアベイラビリティの予測が可能と考えられた。現在、グルクロン酸抱合代謝を受ける薬物の経口バイオアベイラビリティの予測を試みているが、現時点での結果では、*in vitro* 実験からの代謝クリアランスの見積もりが過小評価されており、代謝反応条件の改善が必要と考えられる。

次に、チザニジンとフルボキサミンおよびシプロフロキサシンの相互作用の予測を行った。Luciferin-1A2 を基質とする発光アッセイ法 (Promega Corp.) を用いて、チザニジン、フルボキサミンおよびシプロフロキサシンの CYP1A2 に対する阻害を調べ、結果を Dixon plot 解析したところ、チザニジン、フルボキサミン、シプロフロキサシンともに CYP1A2 に対する競合阻害を示し、阻害定数 (K_i) はそれぞれ 50, 170, 0.039 μM となった。また、フルボキサミンおよびシプロフロキサシンの Caco-2 細胞単層の透過係数 ($P_{app, a \rightarrow b}$) として、それぞれ 7.75×10^{-6} 、 $4.61 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ という値が得られた。

以上のパラメータ値を ITAM-PK モデルに代入して、チザニジン (4 mg) とフルボキサミン (100 mg) を併用時のチザニジンの血中濃度を計算し AUC を算出したところ、234 $\text{ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ となった。ヒトでの併用試験では、チザニジンの AUC が $216 \pm 52 \text{ ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ となることが報告されており (Granfors MT. et al., Clin Pharmacol Ther 75:331-41, 2004.)、本研究の予測値は報告値と近い値となり、本モデルを用いてチザニジンとフルボキサミン併用時の相互作用を定量的に予測可能であることが示された。

次に、チザニジン (4 mg) とシプロフロキサシン (500 mg) を併用時のチザニジンの AUC を ITAM-PK モデルで算出したところ、7.7 $\text{ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ となり、ヒトでの併用投与試験での報告値 ($216 \pm 52 \text{ ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$, Granfors MT. et al., Clin Pharmacol Ther 76:598-606, 2004.) より小さな値となり、本モデルではチザニジンとシプロフロキサシンの相互作用が過小評価された。シプロフロキサシンの CYP1A2 に対する阻害定数は 170 μM と大きく、CYP1A2 に対する親和性が小さい。このことは他の文献報告と同様である。従って、ヒト投与試験で観察されたシプロフロキサシンによる大きな阻害効果を予測するには、CYP3A4 の阻害薬であるエリスロマイシンやリトナビルで認められるような mechanism-based inhibition が起きている可能性がある。また、肝細胞内のシプロフロキサシン濃度が高くなれば阻害作用が増強されるため、シプロフロキサシンが肝細胞内に能動的に取り込まれて、高濃度になっている可能性がある。いずれにしろ、以上の可能性は今後の検討課題と考えられる。

以上、本研究をまとめると、CYP3A4 基質の経口バイオアベイラビリティと相互作用を定量的に予測するモデルとして我々が確立した ITAM-PK モデルを用いて、CYP1A2 の基質となる薬物の経口バイオアベイラビリティを定量的に予測可能であることが示された。CYP1A2 の基質であるチザニジンとテオフィリンの予測は良好であったが、プロプラノロールの予測には細胞内結合を考慮する必要があった。一方、チザニジンと、CYP1A2 阻害薬であるフルボキサミンおよびシプロフロキサシンの相互作用を ITAM-PK モデルで予測したところ、フルボキサミンとの相互作用は良好に予測できたが、シプロフロキサシンの相互作用の予測性は低く、シプロフロキサシンの阻害様式や細胞内動態をさらに検討する必要性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa C, Yatabe M, a, Inoue M, Hirose S, Ohashi Y, Yachi Y, Adachi S, Tomoo Itoh T.	4. 巻 138
2. 論文標題 Comparison of Chemical Behavior of Original and Generic Docetaxel Formulations as Non-Alcoholic Preparations: Discussion about Diluent Solvents for Docetaxel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 973-984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koyama M, Shirahata T, Hirashima R, Kobayashi Y, Itoh T, Fujiwara R.	4. 巻 32(4):
2. 論文標題 Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase (UGT)-mediated glycyrrhetic acid 3-O-glucuronidation by polyphenols and triterpenoids.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 218-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2017.04.003	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ogawa C, Inoue M, Yatabe M, Nagayama Y, Gomi H, Nakadate K, Adachi S, Yachi Y, Itoh T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Analysis of inline-filter blockage with trastuzumab formulation using scanning-electron microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed. & Pharmacother.	6. 最初と最後の頁 108711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.biopha.2019.108711	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Uchida T, Wakasugi M, Kitamura T, Yamamoto T, Asakura M, Fujiwara R, Itoh T, Fujii H, Hirono S.	4. 巻 79
2. 論文標題 Exploration of DPP-IV inhibitors with a novel scaffold by multistep in silico screening.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Mol Graph Model.	6. 最初と最後の頁 254-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jmgm.2017.12.005	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Fujiwara R, Mitsugi R, Uemura A, Itoh T, Tukey RH.	4. 巻 1(8)
2. 論文標題 Severe Neonatal Hyperbilirubinemia in Crigler-Najjar Syndrome Model Mice Can Be Reversed With Zinc Protoporphyrin.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 792-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/hep4.1082	査読の有無 有
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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奈良輪知也、山科知実、伊藤智夫
2. 発表標題 PCFTを介した葉酸輸送に対するカフェインフリー飲料の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野修平、大川春菜、伊藤智夫
2. 発表標題 OATP2B1を介したestrone-3-sulfateの輸送に対するルイボスティーの影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良輪知也、伊藤智夫
2. 発表標題 PCFTを介した葉酸輸送に対する種々ハーブティーの影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会 (金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中雛乃、奈良輪知也、伊藤智夫
2. 発表標題 フラボノイド類によるPCFTを介した葉酸吸収阻害とその種差
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野修平、室山祐理子、伊藤智夫
2. 発表標題 OATP2B1によるestrone-3-sulfateの輸送におけるHis618の役割
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野修平、石光遥奈、高橋菜月、渡邊真衣子、伊藤智夫
2. 発表標題 大豆抽出物によるOATP2B1の輸送阻害機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奈良輪知也、山岡杏里、伊藤智夫
2. 発表標題 PCFTを介した葉酸輸送におけるワインの影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若月梨子、伊藤智夫
2. 発表標題 UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1および2ノックアウトマウスを用いた内因性基質のグルクロン酸抱合の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (京都)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----