

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07164

研究課題名(和文) ヒト薬物相互作用の定量的予測を指向した単一酵素不活化ヒト肝移植マウスモデルの開発

研究課題名(英文) Roles of human cytochrome P450 1A2, 2C9, and 3A4/5 enzymes in drug oxidations mediated by metabolically inactivated human hepatocytes in previously transplanted chimeric mice

研究代表者

山崎 浩史 (Yamazaki, Hiroshi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30191274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：相互作用評価には、被作用薬代謝に関する酵素寄与率の情報が重要である。免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植後、P450 1A2、2C9および3A4/5の不活化薬フラフィリン、チエニリン酸およびアザムリンを前投与し、それぞれ単一 P450 分子種を不活化させた。モデル動物での各P450プローブ薬として、クマリン、ワルファリンとジクロフェナクおよびデキサメタゾンの効果修飾された体内動態を明らかにした。これら前処置したヒト肝キメラマウスは、代謝的に不活性化された P450 1A2、2C9およびP450 3A4/5 の *in vivo* モデルとなりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定のP450 分子種を時間依存型阻害薬(生成代謝物による酵素との共有結合による)で不活化したヒト肝ミクロゾームと対照(非処置)肝ミクロゾームを用い、各P450 分子種の薬物代謝反応への*in vitro* 寄与率を簡便に検討する手法が有効であることを明らかにした。さらに本手法をヒト型モデル動物でも活用し、P450 1A2、2C9と3A4/5酵素の*in vivo*薬物体内動態での寄与を調べる手法を樹立した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the respective roles of cytochromes P450 1A2, 2C9 and 3A4/5 in drug oxidation in human livers, the *in vivo* pharmacokinetics of coumarin, S-warfarin and diclofenac, and dexamethasone were analyzed after intravenous administrations in chimeric mice that had been transplanted with human hepatocytes. P450 1A2, 2C9, and 3A4/5 were metabolically inactivated in the humanized mice by orally pretreating them with furafylline, tienilic acid, and azamulin, respectively. After intravenous administration of probe drugs, significant differences in the concentration-time profiles of the primary metabolites coumarin 3,4-epoxide (as estimated by the levels of o-hydroxyphenylacetic acid), 7-hydroxywarfarin and 4'-hydroxydiclofenac, and 6-hydroxydexamethasone between untreated mice and mice treated with suppressors were observed. These presumably resulted from suppressed P450 1A2, 2C9, and 3A4/5 activities in the primary oxidative metabolism *in vivo*.

研究分野：薬物動態学

キーワード：不活性化 ヒト肝細胞移植マウス フラフィリン チエニリン酸 アザムリン

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発と臨床適応の際、副作用発現や有効性の変動要因となり得る薬物相互作用の有無について、産官学のそれぞれが適正に試験し、評価することが求められている。被験薬の薬物動態に対する薬物代謝酵素分子等の影響を定量的に評価するための検討方法を提示した薬物相互作用ガイドラインの改定が、欧州、米国および我が国の規制当局で進められ、2018年7月日本の相互作用ガイドライン最新版が国内外に発信された。これらに提示された考え方を社会実装するためには、各薬物代謝反応への各チトクロム P450 分子種の寄与率および主反応経路の変換の程度を精度良く、簡便に検討する有効な手法が望まれている。しかしながら、特定の酵素寄与率を求めるにあたって、特異的阻害剤や抗体を用いた阻害実験等が歴史的に行われてきたが、材料の選択や阻害効率の一定化など、今なお検討課題が残されている。近年、特定の不活化薬を前処置することで単一 P450 分子種の活性を抑制した市販ヒト肝ミクロゾームがフランスにて開発され、我が国にも輸入されはじめた。これら *in vitro* 酵素源と指標薬の選択と *in vivo* 条への外挿が、その後の臨床での医薬品血中濃度変動予測に重要な役割をもつことが判明しているが、現状での *in vitro* での試験状況が、予測すべき *in vivo* 状況を十分に反映しているかは必ずしも明らかではない。

2. 研究の目的

薬物代謝が規定する相互作用試験では、相互作用が生じる代謝反応経路を特定し、被験薬が被相互作用薬となる場合は、全体の消失経路の中でその経路が占める重要性を定量的に把握し、一方、相互作用薬となる場合は、阻害、誘導等の機序によりその経路の代謝酵素活性に与える影響を詳しく評価することが重要である。薬物代謝が関与する薬物相互作用の多くには、酸化的代謝、特に P450 が触媒する代謝が関連する。そこで、簡便かつ正しく P450 寄与率を求める方法の提唱を目指し、組換えヒト P450 分子種、ヒト肝ミクロゾームおよび肝細胞、特にヒト肝細胞を生体に移植した免疫不全マウスを組み合せ、P450 1A2, 2C9 および 3A4/5 を始めとする主要代謝酵素が関わる合理的な *in vivo* 定量的薬物相互作用予測手法を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

既存の市販のヒト肝単一 P450 酵素を不活化した酵素源を活用する一方、新たに *in vivo* でヒト P450 1A2, 2C9 および 3A4/5 酵素を不活化したヒト肝移植モデルマウスの作出とそれらの評価を行った。免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植後、P450 1A2, 2C9 および 3A4/5 の不活化薬であるフラフィリン、チエニリン酸およびアザムリンをそれぞれ経口前投与し(13-15 mg/kg 体重) 生体中にて対応するヒト肝単一 P450 分子種を不活化させた。これらヒト型モデル動物での各 P450 プロブ薬として、それぞれクマリン、ワルファリンとジクロフェナクおよびデキサメタゾンを静脈内投与(10-30 mg/kg)し、単一 P450 分子種の不活化により効果修飾された体内動態を調べた。

4. 研究成果

相互作用評価には、被作用薬代謝に関与する酵素寄与率の情報が重要である。特定の P450 分子種を時間依存型阻害薬(生成代謝物による酵素との共有結合による)で不活化したヒト肝ミクロゾームと対照(非処置)肝ミクロゾームを用い、各 P450 分子種の薬物代謝反応への *in vitro* 寄与率を簡便に検討する手法が有効であることを確認した。次いでこれら時間依存型阻害薬の影響を、クマリンの反応性 3,4-epoxide の代償的代謝物(図1)、S-ワルファリン 7-水酸化体とジクロフェナク 4'-水酸化体(図2)およびデキサメタゾン 6'-水酸化体(図3)生成を指標として、*in vivo* 系にて評価した結果を図示する。

クマリンと S-ワルファリンは、*in vivo* 系と *in vitro* 系での P450 1A2 と 2C9 分子種の寄与率の評価結果は概ね高く、同様であった、しかし、ジクロフェナクとデキサメタゾン代謝で見込まれる P450 2C9 と 3A4/5 分子種の寄与率には、*in vivo* 条件にてやや *in vitro* 予測より低値を示すことが判明した。これらの知見は、P450 1A2, 2C9 および 3A4/5 を始めとする主要代謝酵素が関わる *in vivo* 定量的薬物相互作用予測において、*in vitro* から *in vivo* 状況を外挿する際の留意事項となることが示唆された。

以上、典型的な P450 不活化薬にて前処置したヒト肝細胞移植キメラマウスは、代謝的に不活性化された P450 1A2, 2C9 および P450 3A4/5 のヒト型 *in vivo* モデルとなりうることを示唆された。ヒト型モデル動物にて、P450 1A2, 2C9 と 3A4/5 酵素の *in vivo* 薬物体内動態での寄与を調べる手法を樹立した。

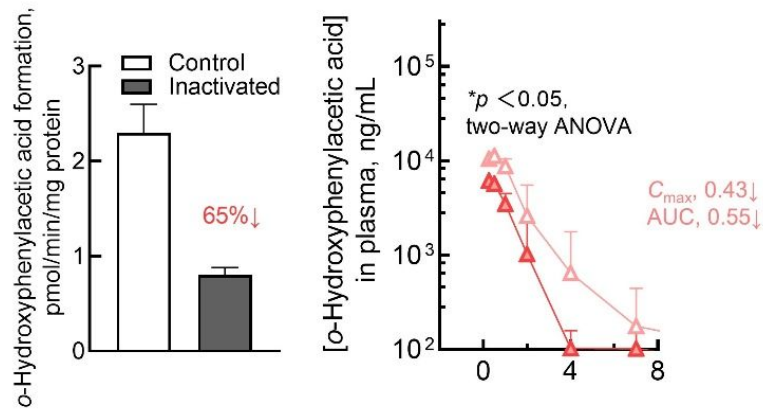


図1 クマリンの反応性 3,4-epoxide 由来代謝物のフラフィリンによる生成抑制

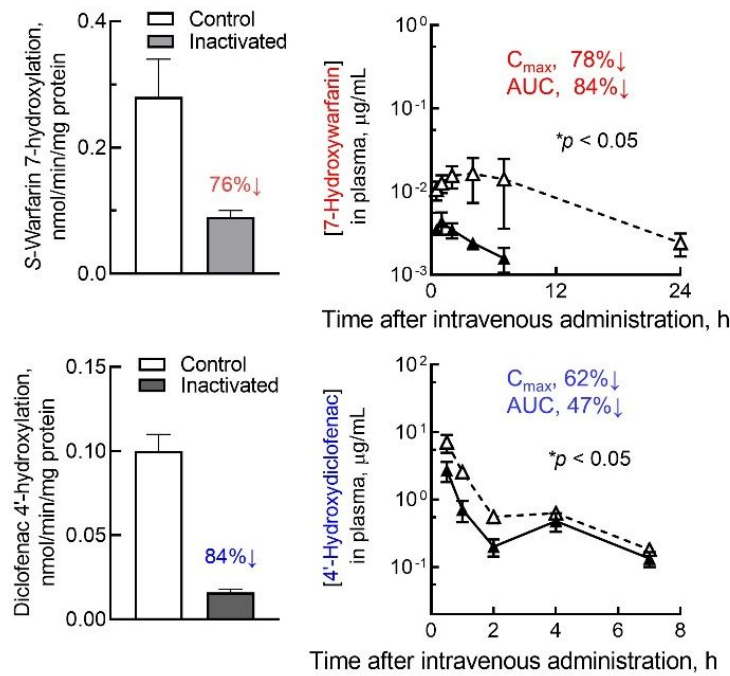


図2 S-ワルファリン 7-水酸化とジクロフェナク 4-水酸化体生成のチエニリン酸による抑制

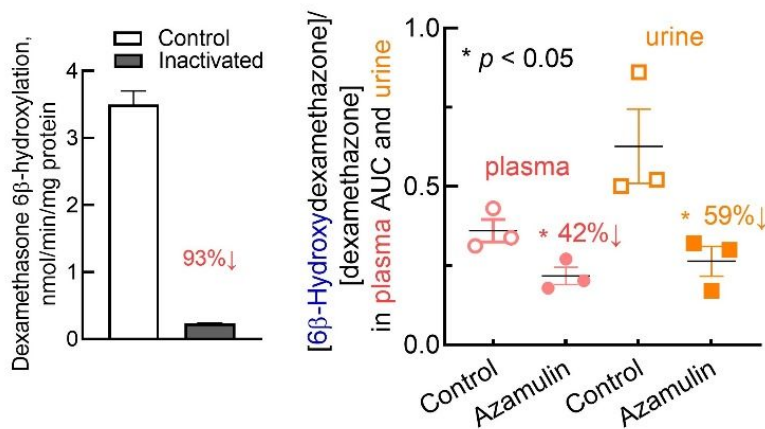


図3 デキサメタゾン 6 水酸化体生成のアザムリンによる抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uehara Shotaro, Shimizu Makiko, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Roles of human cytochrome P450 3A4/5 in dexamethasone 6-hydroxylation mediated by liver microsomes and humanized liver in chimeric mice metabolically suppressed with azamulin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100504 ~ 100504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2023.100504	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 Adachi Koichiro, Ohya Katsuhiro, Tanaka Yoichi, Sato Tasuku, Murayama Norie, Shimizu Makiko, Saito Yoshiro, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 49
2. 論文標題 High hepatic and plasma exposures of atorvastatin in subjects harboring impaired cytochrome P450 3A4?16 modeled after virtual administrations and possibly associated with statin intolerance found in the Japanese adverse drug event report database	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100486 ~ 100486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2022.100486	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 Yamazaki Hiroshi, Shimizu Makiko	4. 巻 51
2. 論文標題 Species Specificity and Selection of Models for Drug Oxidations Mediated by Polymorphic Human Enzymes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 123 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.121.000742	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 Uno Yasuhiro, Uehara Shotaro, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 197
2. 論文標題 Drug-oxidizing and conjugating non-cytochrome P450 (non-P450) enzymes in cynomolgus monkeys and common marmosets as preclinical models for humans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114887 ~ 114887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114887	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 Uehara Shotaro, Shimizu Makiko, PI? Karen, Routier Sylvain, Yoneda Nao, Higuchi Yuichiro, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Probe drug T-1032?N-oxygenation mediated by cytochrome P450 3A5 in human hepatocytes in?vitro and in humanized-liver mice in?vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100453 ~ 100453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2022.100453	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 Miura, T. Uehara, S. Shimizu, M. Murayama, N. Suemizu, H. Yamazaki, H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4-epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 525-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.525	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 Murayama, N. Yamazaki, H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Metabolic activation and deactivation of dietary-derived coumarin mediated by cytochrome P450 enzymes in rat and human liver preparations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 371-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.371	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 Kamiya, Y. Handa, K. Miura, T. Yanagi, M. Shigeta, K. Hina, S. Shimizu, M. Kitajima, M. Shono, F. Funatsu, K. Yamazaki, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 In Silico Prediction of Input Parameters for Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Models for Estimating Plasma, Liver, and Kidney Exposures in Rats after Oral Doses of 246 Disparate Chemicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem Res Toxicol	6. 最初と最後の頁 507-513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00336	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 Kamiya, Y. Handa, K. Miura, T. Ohori, J. Shimizu, M. Kitajima, M. Shono, F. Funatsu, K. Yamazaki, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 An Updated In Silico Prediction Method for Volumes of Systemic Circulation of 323 Disparate Chemicals for Use in Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Estimate Plasma and Tissue Concentrations after Oral Doses in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem Res Toxicol	6. 最初と最後の頁 2180-2183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.1c00249	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 Miura, T. Uehara, S. Shigeta, K. Yoshizawa, M. Kamiya, Y. Murayama, N. Shimizu, M. Suemizu, H. Yamazaki, H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Metabolic Profiles of Tetrabromobisphenol A in Humans Extrapolated from Humanized-Liver Mouse Data Using a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem Res Toxicol	6. 最初と最後の頁 522-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00358	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 Miura Tomonori, Uehara Shotaro, Shimizu Makiko, Murayama Norie, Utoh Masahiro, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Different Roles of Human Cytochrome P450 2C9 and 3A Enzymes in Diclofenac 4 - and 5-Hydroxylations Mediated by Metabolically Inactivated Human Hepatocytes in Previously Transplanted Chimeric Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 634 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.9b00446	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 Miura Tomonori, Shimizu Makiko, Uehara Shotaro, Yoshizawa Manae, Nakano Ayane, Yanagi Mayu, Kamiya Yusuke, Murayama Norie, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Different Hepatic Concentrations of Bromobenzene, 1,2-Dibromobenzene, and 1,4-Dibromobenzene in Humanized-Liver Mice Predicted Using Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Models as Putative Markers of Toxicological Potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 3048 ~ 3053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00387	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 Shin-ichiro, Uehara Shotaro, Tsunenari Yoshihiko, Kawai Hiroyuki, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidiabetic drug, using chimeric mice with humanized liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 769 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2019.1694198	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13件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Species Specificity and Selection of Animal Models for Drug Oxygenations Mediated by Polymorphic Human Enzymes
3. 学会等名 7th Asia Pacific Regional International Society of Study of Xenobiotics (ISSX) meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 サリドマイドのヒト型酸化的代謝物のウサギでの生成: 奇形のないラットとの比較
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 データ駆動型生理学的薬物動態モデルを用いる化学物質の体内濃度予測
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第35回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 小型非ヒト霊長類マーマセット薬物代謝特徴把握からヒト型動態を考える
3. 学会等名 JSSX-APDD合同ワークショップ(第六回)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 翼、安達 昂一郎、村山 典恵、清水 万紀子、田中 庸一、斎藤 嘉朗、山崎 浩史
2. 発表標題 簡易生理学的薬物動態モデルによるチトクロム P450 3A4/5 遺伝子多型患者でのアトルバスタチンおよびカルバマゼピン血中動態予測
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口 友美、加藤 望、加藤 晴敏、久米 俊行、清水 万紀子、山崎 浩史
2. 発表標題 創薬候補品のpH依存的N-酸化反応に対するフラビン含有酸素添加酵素の寄与予測
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki, Shotaro Uehara, Makiko Shimizu, Hiroshi Suemizu
2. 発表標題 Primary oxidative metabolites of Thalidomide in rat and humanized-liver mouse pharmacokinetics
3. 学会等名 24th North American ISSX (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野 泰広、山崎 浩史
2. 発表標題 カニクイザルにおける薬物代謝酵素の同定・解析
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神矢 佑輔、佐藤 翼、森國 紗帆、内海 正義、三浦 智徳、村山 典恵、清水 万紀子、半田 健太郎、北島 正人、庄野 文章、山崎 浩史
2. 発表標題 物質のヒト体内動態を規定する生理学的薬物動態モデル重要パラメータの予測と消化管吸収性推定の精緻化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Prediction of metabolic fates of food chemicals for risk assessment
3. 学会等名 2021 International Workshop for Non-animals Approaches in Food Sector（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 化学物質の予測物性値を用いる生理学的薬物動態(PBPK)モデルを活用するヒト臓器中濃度推移と毒性予測
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 一般化学物質の経口吸収過程を含む簡素な生理学的薬物動態モデルを活用する体内動態評価
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎浩史
2. 発表標題 AI-SHIPSにおける生理学的薬物動態 (PBPK) モデルを用いた一般化学物質の臓器内濃度予測手法開発の現状
3. 学会等名 CBI学会2020年大会シンポジウム
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
研究分担者	清水 万紀子 (Shimizu Makiko) (90307075)	昭和薬科大学・薬学部・准教授 (32624)	
研究分担者	村山 典恵 (Murayama Norie) (90219949)	昭和薬科大学・薬学部・講師 (32624)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------