

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790109

研究課題名（和文） ヒト肝細胞移植マウスを利用したヒトにおける医薬品代謝物の生成予測

研究課題名（英文） Prediction of human drug metabolism using chimeric mice transplanted with human hepatocytes

研究代表者

佐能 正剛 (SANOH SEIGO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手

研究者番号：00552267

研究成果の概要（和文）：

マウスの肝臓がヒトの肝細胞に置換された「ヒト肝細胞移植マウス」を用いて、ヒトにおける医薬品の体内動態の予測検証を行った。検証化合物として、肝臓で様々な薬物代謝酵素によって代謝される10数化合物を選択し、本モデルマウスに投与後の尿、糞、血漿中の検証化合物濃度、代謝物を分析した。その結果は、実際のヒトで報告されるプロファイルを反映していたことから、創薬においてヒトにおける医薬品の体内動態を予測することができる。

研究成果の概要（英文）：

The chimeric mice transplanted with human hepatocytes were used in this study. I selected some model compounds that are metabolized by several drug metabolic enzymes in liver and compared the profiles in humans to evaluate the utility of these mice for human prediction. These profiles in mice were approximately similar to those in humans. Thus, this model could be a good in vivo model for predicting drug metabolism and pharmacokinetics in humans during pre-clinical stage of pharmaceutical development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ヒト肝細胞移植キメラマウス、肝細胞、薬物代謝酵素、代謝物予測

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の中で安全性が原因で開発が中止になるケースは多い。このうちヒト特異的な代謝物が毒性に関与している可能性も高いが、動物での毒性試験の結果から、ヒトへの安全性を担保してきたため、ヒト特異的な代謝物の毒性を見逃す可能性があり、医薬品開発において、早期の段階からヒト特異的な代謝物を予測する必要性

がさらに高まってきている。しかし、ヒト特異的な代謝物を予測する場合、動物とヒトの代謝種差などを考慮に入れる必要がある。近年の医薬品候補化合物においては、化学構造の多様化に伴い、医薬品の多くの代謝に寄与している薬物代謝酵素チトクローム P450(P450)に留まらず、P450 以外の代謝酵素(Non-P450)であるアルデヒドオキシダーゼ(AO)や抱合酵素(UDP-グルク

ロン酸、硫酸、N-アセチル転移酵素)などが寄与するケースも増えてきた。しかし、これら酵素の代謝種差に関しては不明な点も残されている。

ヒトの代謝を予測する取組みとして、*in vitro*において、ヒト組織を用いた研究が広くされており、特にヒト肝ホモジネート、新鮮・凍結肝細胞を用いた研究が主流となってきた。しかし、Non-P450や複数の薬物代謝酵素が寄与するケースでは、実際のヒトの代謝を完全に反映できていないとの報告もあることから、予測精度が高い評価系の構築が求められている。

## 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か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ツール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、多くの薬物代謝酵素がヒトと同レベルで発現しており、その活性も確認されている。さらに、本モデルは医薬品のヒトでの薬物代謝酵素の阻害、誘導の予測ツールとして利用できる可能性も報告されている。これら背景から、ヒト肝細胞移植キメラマウスでの代謝物プロファイルは、実際ヒトで生成される代謝物プロファイルを反映したものになることが期待され、ヒト代謝物予測に有用なツールとなりうる。

本研究では、肝臓における P450、グルクロン酸抱合転移酵素 (UGT)、硫酸抱合転移酵素 (SULT) やアルデヒドオキシダーゼ (AO) で代謝される 10 数個の医薬品を検証化合物として取り上げ、ヒト肝細胞移植マウスを用い、ヒトにおける薬物代謝を定性的・定量的に予測できるかどうかの検証を *in vitro/in vivo* 両面からのアプローチから行うことを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

実験に使用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。

### (1) 代謝物予測

P450やUGTで代謝されるイブプロフェン、ナプロキセンやミルタザピンなどを検証化合物として、ヒト肝細胞移植キメラマウスに投与し、その尿および糞中に排泄された代謝物について質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いて検索した。その結果は、実際ヒトで報告されている代謝物プロファイルと比較検証を行った。

### (2) 血中動態予測

#### ① *In vivo* からのアプローチ

実験には、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓が 73.4~93.4%の割合でヒトの肝細胞に置換されたマウスを用いた。

医薬品 13 個の検証化合物をヒト肝細胞移植キメラマウスに静脈内投与 (0.3~5mg/kg) し、血液を採取後、血漿分離し、分析前処理後、LC/MS/MS を用いて未変化体濃度を測定した。得られた血漿中濃度推移から全身クリアランス ( $CL_t$ )、消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) を求めた。全身クリアランスは、肝クリアランスとし、ヒト肝細胞移植キメラマウスにおける血漿タンパクに対する非結合型分率 ( $f_u$ )、血液/血漿濃度比 ( $R_b$ ) の値は、実際のヒトと値と同じとして、well-stirred model (式 A) から *in vivo* 肝固有クリアランス ( $CL_{int, in vivo}$ ) を算出した。これら  $CL_{int, in vivo}$  および  $t_{1/2}$  は、実際のヒトにおける報告値と比較した。

$$CL_{int, in vivo} = CL_t / \{ (f_u / R_b) \times (1 - CL_t / Q) \} \dots (A)$$

#### ② 光学異性を考慮した血中濃度予測

ラセミイブプロフェンをヒト肝細胞移植キメラマウスに経口投与後、経時的に採血を行い、キラルカラムを用いて光学分割後 LC/MS/MS にて血漿中濃度を測定した。

#### ③ *In vitro* からのアプローチ

ヒト肝細胞移植キメラマウスから単離、精製した新鮮肝細胞に検証化合物 (10  $\mu$  M) を添加後、2 時間までの未変化体の減少から式 (B) より消失速度係数 ( $k_e$ ) を算出し、*in vitro* 肝固有クリアランス ( $CL_{int, in vitro}$ ) を算出した。 $CL_{int, in vitro}$  ( $\mu$  L/min/ $10^6$  cells) から、ヒトの体重当たりの肝重量 (26g/kg) および肝臓あたりの肝細胞数 (132 x  $10^6$  cells / g liver) を用い、Scaled  $CL_{int, in vitro}$  (mL/min/kg) までスケールアップした。

$$C_{(t)} = C_0 \times \exp(-k_e \times t) \dots (B)$$

## 4. 研究成果

### (1) 代謝物予測

解熱鎮痛薬イブプロフェンやナプロキセンはヒトにおいて P450、UGT、SULT、タウリン抱合転位酵素によって代謝され、それぞれ 6 種類および 4 種類の代謝物が投与後ヒト尿中から検出されることが知られている (図 1, 2)。これら代謝物の尿中排泄率には実験動物とヒトで種差がある。ヒト肝細胞移植キメラマウスにイブプロフェンやナプロキセンを投与し、尿中における代謝物を検索した。その結果、ヒトで報告される代謝物が同様に検出され、その排泄率は実際のヒトと高い相関が認められた (図 3, 4)。このことから、ヒト肝細胞移植キメラマウスは、ヒトの P450、UGT、SULT などの薬物代謝酵素活性を反映しており、これらの薬物代謝酵素で代謝される医薬品の代謝予測に、有用である可能性が示唆された。

また、この他にも、実験動物とヒトで顕著な活性種差が報告される AO で代謝される医薬品についてもヒト型モデルとして有用で

あることを示すことができた。

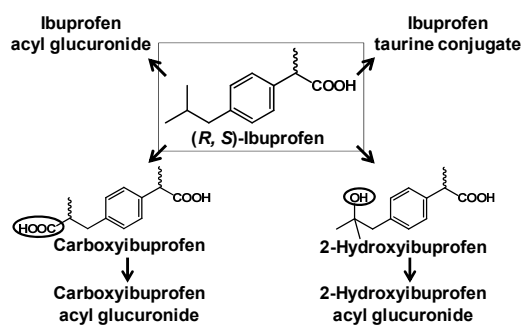


図1 イブプロフェンの代謝経路

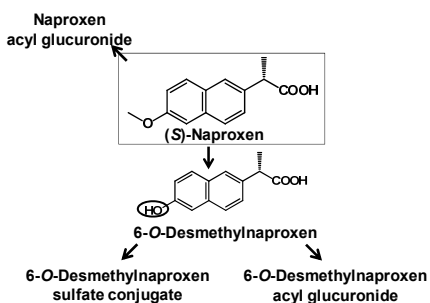


図2 ナプロキセンの代謝経路

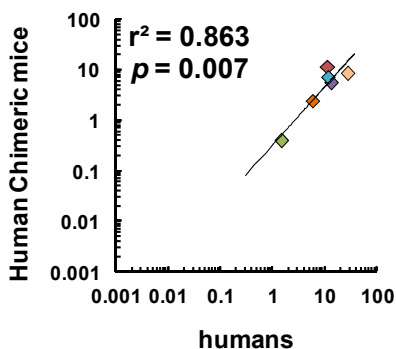


図3 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるイブプロフェンの各尿中代謝物排泄率の関係

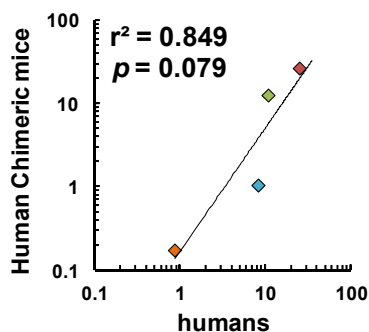


図4 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにおけるナプロキセンの各尿中代謝物排泄率の関係

## (2) 血中動態予測

### ① *In vivo* からのアプローチ

ヒト肝細胞移植キメラマウスに 13 個の検証化合物(図 5)を静脈内投与後の血中動態とヒトに静脈内投与(一部経口投与)後の血中動態(報告値)から算出した  $CL_{int, in vivo}$  を比較(表 1)し、その相関性を調べた。その結果、相関係数は  $r^2=0.754$  ( $p=1.174 \times 10^{-4}$ ) を示し、有意かつ良好な相関関係が認められた(図 6)。その中で、 $CL_{int, in vivo}$  値が 3 倍以内で一致した検証化合物は、全体の 31%、3 倍から 10 倍以内で一致したものは 54%であった。

一方、同様に  $t_{1/2}$  における相関性を調べたところ、その相関係数も  $r^2=0.886$  ( $p=1.506 \times 10^{-4}$ ) を示し、有意かつ良好な相関関係が認められた(図 7)。その中で、 $CL_{int, in vivo}$  値が 3 倍以内で一致した検証化合物は、全体の 67%、3 倍から 10 倍以内で一致したものは 33%であった。

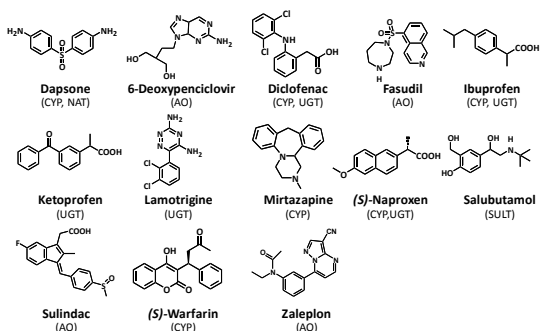


図5 血中動態予測のための検証化合物

表1 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにおける *In vivo* 肝固有クリアランス

Compounds	Human $CL_{int, in vivo}$	Human Chimeric mice $CL_{int, in vivo}$
	mL/min/kg	mL/min/kg
Dapsone	2.0	8.6
6-Deoxypenciclovir	118.0	209.0
Diclofenac	1004.3	4905.0
Fasudil	370.6	1588.2
Ibuprofen	147.1	686.0
Ketoprofen	232.2	442.0
Lamotrigine	0.7	3.2
Mirtazapine	123.6	408.7
(S)-Naproxen	10.1	230.2
Salbutamol	13.5	1148.2
Sulindac	47.8	86.5
(S)-Warfarin	3.7	13.4
Zaleplon	173.6	261.3

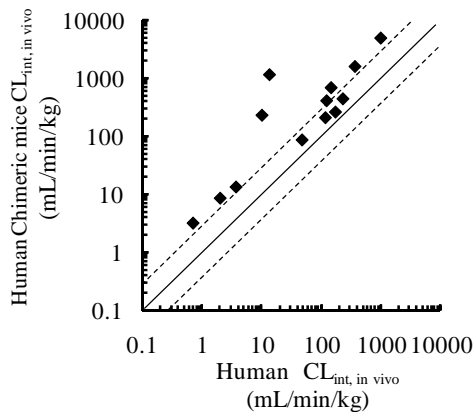


図6 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにおける *in vivo* 肝固有クリアランス( $CL_{int, in vivo}$ )の関係

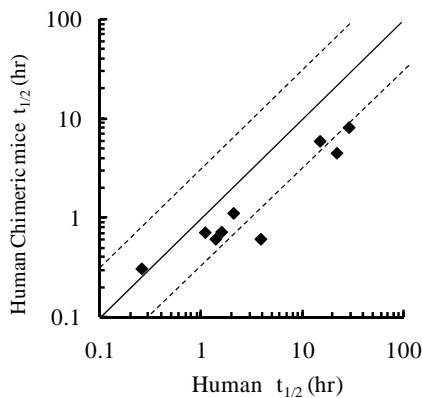


図7 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにおける消失半減期( $t_{1/2}$ )の関係

## ②光学異性を考慮した血中濃度予測

イブプロフェンはラセミ体として臨床で使用されているが、ヒトにおいて(*R*)体は、より高い薬効を有する(*S*)体へ方向のキラル変換を受けることが知られている。ラセミ体のイブプロフェンをヒト肝細胞移植キメラマウスに投与し(*S*)体および(*R*)体の血漿中濃度をそれぞれ測定し、ヒトの報告値と比較検証した。ヒトに 400 mg 経口投与後の(*S*)体および(*R*)体の血漿中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)はそれぞれ 79.3、60.6  $\mu\text{g/mL}$ と報告されている。(*S*)体、(*R*)体全体の AUC に対する(*S*)体 AUC の占める割合は、ヒトでは 56.7%、ヒト肝細胞移植キメラマウスでは 56.3%となり、(*S*)体の変換活性がヒト肝細胞移植キメラマウスはヒトを反映していることが考えられた(表 2)。

イブプロフェンのように光学異性体間において薬効など生体反応が異なる医薬品も多く存在するため、光学異性体を考慮したヒト体内動態の予測は重要となるが、その評価の中でヒト肝細胞移植キメラマウスが有用なツールとなる可能性が示され

た。

表 2 ヒトおよびヒト肝細胞移植キメラマウスにラセミイブプロフェンを経口投与後の *R*, *S* 体血漿中濃度

Species	Dose	enantiomer	AUC <sub>0-∞</sub> (μg x hr/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> -ratio (%) S/(S+R)
Human chimeric mice	20 mg/kg p.o.	S	32.3 ± 18.3	56.3
		R	25.0 ± 9.3	
Humans	400 mg/person p.o.	S	79.3 ± 19.7	56.7
		R	60.6 ± 12.0	

## ③*In vitro*からのアプローチ

ヒト肝細胞移植キメラマウスから単離、精製した新鮮肝細胞 (h-hepatocytes) に検証化合物 (10  $\mu\text{M}$ ) を添加後、2 時間までの未変化体の減少を算出した  $CL_{int, in vitro}$  値とヒトに投与後の  $CL_{int, in vivo}$  値との関係を調べたところ、その相関係数は  $r^2=0.475$  ( $p=0.009$ ) となり、有意であるものの中程度の相関性であった(図 8)。しかし、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓からは、多くの肝細胞を単離することができることから、*in vivo* 実験のための評価化合物の絞り込みにおいて、有用なアプローチになるものと考えている。

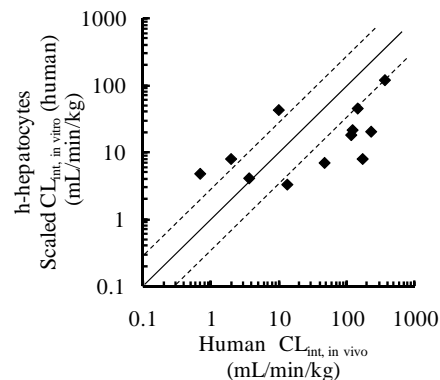


図8 ヒト肝細胞移植キメラマウスから単離した肝細胞 (h-hepatocytes) 実験から算出した *in vitro* 肝固有クリアランスとヒトの *in vivo* 肝固有クリアランス( $CL_{int, in vivo}$ )の関係

## まとめ

以上より、創薬において、ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いることで、様々な薬物代謝酵素で代謝される医薬品のヒトにおける代謝・動態を定性的のみならず半定量的に予測することができ、ヒトにおいて良好な動態を示す医薬品候補化合物の効率的な創出に貢献でき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3件)

1. 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 Metabolism and Disposition*, 40(2) 322-328(2012) 査読有

DOI コード;10.1124/dmd.111.040923

2. 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 Metabolism and Disposition*, 40(1), 76-82 (2012) 査読有

DOI コード;10.1124/dmd.111.041954

3. 佐能正剛 生理学的薬物速度論モデルを用いた化学物質及びその代謝物のヒトリスク評価  
ファルマシア(日本薬学会)461-462 (2010) 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. 佐能正剛、堀口 彩、杉原数美、浦丸直人、立野知世、堀江 透、北村繁幸、太田 茂 「ヒト肝細胞移植マウスを用いたイブプロフェンの代謝、血中動態の予測」日本薬学会 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌

2. 堀口 彩、佐能正剛、杉原数美、立野知世、堀江 透、北村繁幸、太田 茂 「ヒト肝キメラマウスを用いたイブプロフェンのキラール変換」第26回日本薬物動態学会、2011年11月17日、広島

3. 佐能正剛、野崎和吉、村井英継、寺下茂之、寺村俊夫、太田 茂 「アルデヒドオキシダーゼで代謝されるFK3453におけるヒトおよびラット肝キメラマウスを用いたヒト体内動態予測」第 26 回日本薬物動態学会、2011 年 11 月 17 日、広島

4. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S 「Prediction of PK parameters of human using human chimeric mice」17<sup>th</sup> International Society for the Study of Xenobiotics North American Meeting, 2011年10月17日、Atlanta, Georgia, USA

5. 佐能正剛、堀口 彩、杉原数美、立野知世、堀江 透、北村繁幸、太田 茂 「ヒトおよびラット肝キメラマウスを用いた医薬品の代謝プロファイルの予測」第38回日本トキシコロジー学会学術年会、2011年7月11日、横浜

6. 佐能正剛、堀口 彩、杉原数美、立野知世、堀江 透、北村繁幸、太田 茂 「ヒト肝キメラ

ウス in vitro/in vivoにおける医薬品のヒト代謝クリアランス予測」第131回日本薬学会年会、2011年3月31日、静岡

7. 堀口 彩、佐能正剛、杉原数美、立野知世、堀江 透、北村繁幸、太田 茂 「IN AND IN VITRO METABOLISM OF IBUPROFEN IN HUMAN-CHIMERIC MICE」第25回日本薬物動態学会年会、2010年10月7日、大宮

6. 研究組織

(1)研究代表者

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手  
佐能 正剛(SANO SEIGO)

研究者番号:00552267

(2)研究分担者 なし

(3)研究協力者

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

堀口 彩(HORIGUCHI AYA)