

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689009

研究課題名(和文) 異物解毒分子の活性に根差した医薬品のバイオアベイラビリティの定量的予測

研究課題名(英文) Quantitative prediction of the bioavailability of drugs based on the activities of detoxification enzymes/transporters

研究代表者

前田 和哉 (Maeda, Kazuya)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：00345258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、経口投与薬物が全身循環血に到達する割合であるバイオアベイラビリティ(BA)を支配する要因探索ならびにin vitro実験データに基づく数理モデルを活用したBAの定量的予測を目的とした。BCRPの遺伝子多型(c.421C>A)による機能低下と臨床での消化管アベイラビリティ(FaFg)の関連を数理モデルを用いて解析することで、変異によるBCRPの輸送機能の低下割合を定量化することに成功した。P-gp, CYP3A4といった消化管吸収の抑制に働く分子の部位差を考慮した数理モデルを構築することで、P-gp, CYP3A4の基質となる複数の薬物のFaFgを良好に予測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the novel molecular mechanisms dominating the bioavailability (BA), which is defined as the fraction of orally-administered dose reached to the blood circulation, and quantitative prediction of BA by utilizing in vitro experimental data and mathematical model. Regarding the small intestine, I succeeded the quantitative estimation of decreased function of BCRP by genetic polymorphism (c.421C>A) by describing the relationship between the function of mutated BCRP and FaFg values of BCRP substrate drugs. I constructed the mathematical model with considering the uneven distribution of P-gp and CYP3A4 along the small intestine and succeeded in the good prediction of FaFg of multiple CYP3A4/P-gp substrate drugs by setting appropriate scaling factors for relating the in vitro data to in vivo human clinical data.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：バイオアベイラビリティ 消化管吸収 肝初回通過 トランスポーター 数理モデル

1. 研究開始当初の背景

大部分の医薬品の投与ルートは経口投与である。経口投与された薬物は、消化管より吸収され門脈に到達し、肝臓を1回通過してから循環血に到達する。医薬品も生体にとっては異物であるため、薬物の経口吸収過程には、種々のバリアーが存在し、医薬品の全身暴露の低下に寄与している。例えば、消化管腔側には P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), breast cancer resistance protein (BCRP) など種々の排出トランスポーターが発現しており、薬物の消化管上皮細胞へのアクセスを制限している。また、上皮細胞内には、CYP3A4 に代表される第1相酵素や UDP-glucuronosyl transferase (UGT) など第2相酵素が存在し、薬物が門脈中に到達する前に代謝により薬物を解毒する役割を果たしている。そして、肝初回通過により更なる代謝・排泄が起こる。一般的に、経口投与された薬物量のうち、一連の異物解毒システムの障壁を超えて循環血に到達した薬物量の割合はバイオアベイラビリティ (BA) と定義されている。BA の低い薬物は、投与量を増加させる必要があるのみならず、小さな BA の変動であっても、血中濃度が何倍にも変動することから、個人間変動の大きな薬物となる傾向があり忌み嫌われる。BA は、小腸・肝臓の複数の過程によって決定されることから、予測が難しいとされている。近年、BA を決定づける代謝酵素・トランスポーターについては全貌が明らかになりつつあるが、一方で、消化管の管腔側の OATP 類と想定される取り込みトランスポーターの可能性や血管側の排出トランスポーターの存在意義など不明確な部分も残されている。また、消化管においても肝臓においても、代謝酵素・取り込み/排出トランスポーターが複数存在しており、異物解毒過程の中で直列に配置されているわけではないことから、個々の分子の遺伝子多型や薬物間相互作用に起因する機能・発現変動が薬物の異物解毒効率、ひいては BA に与える影響は、他の分子の代謝・輸送の速度論パラメータのバランスに複雑に影響される。従って、BA を予測するためには、小腸における吸収、肝臓における代謝・輸送過程を分子レベルに基づき適切に再構築した数理モデルによる解析が必要であると考へた。これまで、肝臓・小腸とも、代謝酵素・トランスポーターの interplay の考え方を示すための仮想的なモデルや、単一の酵素・トランスポーターが関わる基質薬物の各臓器での挙動を限定的に説明するモデルの構築は行われてきた。しかし、実際の薬物は、異物解毒システムの分子が基質多選択性を有することから、複数の分子によって協調的に細胞への取り込み・排出・代謝が行われており、すべての分子を考慮に入れた実態に即した一般的なモデル構築が切望されている。そこで本研究では、BA の予測を、単に

経験則や動物種間の関係のような相関論に頼るのではなく、小腸・肝臓における薬物の吸収・代謝過程を分子レベルで組み込んだ数理モデルの出力として理論的に行う手法の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

創薬の成否を決定する要因の一つとして重要視されている、経口投与された医薬品が循環血に到達する割合であるバイオアベイラビリティ (BA) について、分子レベルの機能のボトムアップアプローチによる理論的かつ定量的な予測系の確立を本研究の目的とする。BA を支配する小腸・肝臓に発現する複数の代謝酵素・トランスポーターの個々の機能 (代謝・輸送) について、ヒト臓器サンプルや遺伝子発現系を用いた *in vitro* 実験より得られた速度論パラメータを用いて、消化管吸収および肝初回通過を定量的に表す数理モデルを構築する。さらに公表されている複数のヒト臨床研究の結果を用いて予測精度の検証・モデルの最適化を実施する。これにより構築されたモデルを利用し、個々の分子機能の変動が薬物の BA に与える定量的な影響について、*in silico* シミュレーションによる予測を試みる。

3. 研究の方法

(1) トリプタン系薬物の肝取り込み機構の解析

ヒト OCT1 及び OATP1B1, 1B3 発現細胞における取り込みを観察することで、各分子のトリプタン系薬物に対する基質認識性を確認した。また、ラットおよびヒト遊離肝細胞を用いた取り込みに対する各種阻害薬の影響を観察することで、各トランスポーターの薬物の肝取り込みに対する寄与率を検討した。併せて、Oct1/Oct2 ダブルノックアウトマウスを用いることで、*in vivo* におけるトリプタン系薬物の体内動態に対する OCT 分子種の寄与について検討を実施した。

(2) P-gp, CYP3A4 の部位選択的な発現が消化管吸収効率に与える影響に関する定量的考察

簡便に消化管における吸収過程をモデル化することに配慮して、消化管全体を 1-コンパートメントモデルの tube model を想定し、その中に、P-gp, CYP3A4 の分布関数を考慮した排出・代謝を考慮した各部位での吸収クリアランスを数式として表現する。そして、消化管コンパートメントにパルスで投与された薬物量のうち、吸収されて血液コンパートメントに現れた薬物の割合を消化管アベイラビリティと考えることとした。なお、P-gp, CYP3A4 の分布については、(i) 上部から下部にかけて全て等しい、(ii) 上部から下部にかけて直線的に減少する、(iii) 上部から下部にかけて直線的に上昇するの 3 パターンを考え、これらの組み合わせについてそれぞれ計算

を行って、吸収効率に対する影響を比較検討した。

(3) *in vitro* 実験における P-gp, CYP3A4 の輸送/代謝活性のデータに基づく *in vivo* 消化管アベイラビリティの予測

P-gp 及び CYP3A の選択的な基質ならびに両方の基質薬物を 10 数種選択し、ヒトにおける消化管アベイラビリティの値を文献調査した。一方、予測に用いる各種薬物のデータとして、P-gp における輸送活性は、Caco-2 細胞における経細胞輸送クリアランスの濃度依存性のデータを得ることによって、また、CYP3A の代謝活性については、リコンビナント CYP3A4, 3A5 発現ミクロソームにおける濃度依存的な代謝クリアランスを測定することで得た。また、トランスポーターが関わらない受動拡散による輸送については、P-gp の強力な阻害薬である quinidine 共存下における経細胞輸送クリアランスを用いることとし、他の薬物における Caco-2 系細胞輸送クリアランスとヒト消化管透過クリアランスの間の関係を用いて、各薬物のヒトにおける消化管輸送クリアランスを推定した。これらのデータを用いて、Gastroplus® software (Simulations Plus, Inc.) に搭載されている ACAT(Advanced compartmental absorption and transit)モデルおよび生理学的な基本パラメータに基づき予測計算を試みた。P-gp, CYP3A の活性については、発現の部位差については、過去の文献に基づく傾斜を考慮し、発現量に応じて、*in vitro* 実験で求められたパラメータに基づく予測計算の値と実際の *in vivo* 消化管アベイラビリティが合致するように、スケールリングファクターを最適化した。

(4) BCRP の遺伝子多型による輸送機能の低下割合と基質薬物の消化管アベイラビリティとの定量的関係に関する検討

BCRP 基質薬物について、既に機能低下が知られている c.421C>A 変異による薬物動態の変動に関する情報を文献調査により入手した。BCRP の変異の影響を考える上で、簡便なモデルを構築することを考え、消化管全体を 1-コンパートメントとして考え、tube model に基づく濃度勾配を仮定した。各薬物の受動拡散に基づく輸送クリアランスについては、過去に文献報告されている化合物の物性値に基づく予測値を採用した。また、BCRP の c.421C>A 多型の有無による薬物動態の変動を、消化管における BCRP の機能変化による $F_a F_g$ 値の変動に全て起因するとの仮定に基づき、BCRP を介したクリアランスをどこまで低下させたときに、c.421C>A 多型保持者の $F_a F_g$ 値を再現可能であるか最適化を行うことで、消化管における c.421C>A による機能低下割合を定量化した。

4. 研究成果

(1) トリプタン系薬物の肝取り込み機構の解

析

トリプタン系薬物 5 種類についてどのトランスポーターの基質になるか発現系を用いた検討を実施したところ、ヒト OCT1 の基質にはなるが、ヒト OATP1B1, OATP1B3 の基質にはならないことを確認した。一方で、ラット肝細胞を用いて、トリプタン系薬物の取り込みに対する OATPs 阻害薬 rifampicin ならびに OCT1 典型的基質/阻害薬である tetraethylammonium (TEA) の阻害効果を観察したところ、100 μ M rifampicin の共存では阻害は見られなかったものの、1 mM TEA によっては、取り込みの半分以上の阻害が観察された。また、同じカチオンで OCT1 も阻害することが知られている 100 μ M quinidine を阻害薬として用いた場合、TEA による阻害よりもさらに強い阻害が観察されたことから、ラット肝細胞におけるトリプタン系薬物の取り込みには、OCT1 および quinidine 感受性の別の輸送機構の両方が関与することが明らかとなった。一方で、ヒト肝細胞をもちいた検討では、トリプタン系薬物の取り込みに対して 1mM TEA は、ほぼ完全に取り込みを阻害したことから、ヒトにおいてはラットよりも OCT1 の寄与が大きいことが示唆された。また、*in vivo* 実験で、Oct1/2 ダブルノックアウトマウスを用いた検討の結果、特に肝細胞実験の結果でも、比較的 OCT1 の寄与が大きかった sumatriptan, zolmitriptan については、ノックアウトマウスで有意な血漿中濃度の上昇、肝臓対血中薬物濃度比の低下が観察されており、これらは、OCT1 の機能が体内動態の変動要因になりうることをはじめて見出すことができた。肝 OCT1 の機能が血中濃度の制御に関わる事例は、現在でも数少なく、興味深い知見であるといえる。

(2) P-gp, CYP3A4 の部位選択的な発現が消化管吸収効率に与える影響に関する定量的考察

P-gp, CYP3A4 の部位差の関数の違いによる消化管吸収率をあらゆる想定されるケースで予測するために、仮想的な薬物について、単純拡散による膜透過性や、それに対する P-gp, CYP3A4 の活性の相対的な大きさなど複数のパラメータを振った条件化で様々な比較を検討した。その結果、通常の生理的な分布である P-gp が下部優位、CYP3A4 が上部優位な分布にある場合において、ほとんどの仮想的なケースにおいて、最も消化管吸収率が低いことが分かった。但し、CYP3A4 の活性が小さく、P-gp の輸送活性が大きい場合は、その限りではないことも分かった。また、CYP3A4 の発現量の部位差の方が P-gp よりも消化管における吸収抑制の効率を決める上で重要であり、P-gp の発現の部位差については、CYP3A4, P-gp の両方の良好な基質薬物においては、更なる吸収抑制に貢献することが示唆されるシミュレーション結果を得た。このことにより、生理的な CYP3A4, P-gp の発

現部位の差は、異物解毒の観点から考えた場合、極めて合理的であることが考えられる結果となった。

(3) *in vitro* 実験における P-gp, CYP3A4 の輸送/代謝活性のデータに基づく *in vivo* 消化管アベイラビリティの予測

CYP3A4 選択的基質薬物 4 種、P-gp 選択的基質薬物 4 種、CYP3A4, P-gp の両方の基質薬物 4 種の合計 12 種をモデル解析に供した。これらについて、*in vitro* 実験により、P-gp, CYP3A4 の速度論パラメータの収集を行った。次に、ACAT model を用いて、12 種のモデル薬物について、最初 CYP3A4, P-gp 両方の機能がないものとして消化管アベイラビリティ ($F_a F_g$) を計算したところ、かなりの薬物において、実測の $F_a F_g$ 値が予測値を下回る結果となり、CYP3A4, P-gp がこれら薬物の消化管吸収を抑制する方向で機能していることが分かった。次に、実測の $F_a F_g$ 値を最も良好に説明可能な、*in vitro* 実験系と *in vivo* の P-gp, CYP3A4 の相対的な発現量の比を与えると考えられるスケールリングファクターを設定したところ、ほとんどの薬物について実測の $F_a F_g$ 値を 0.67 ~ 1.5 倍の範囲内で予測することに成功した。さらに、過去前田らが行っていた臨床研究において、quinidine, verapamil の投与量依存的な AUC の非線形な変動に関するデータを本モデルが良好に説明できるかについてシミュレーションを試みた。その結果、quinidine については、P-gp, CYP3A4 の両方の飽和が非線形性に参与している一方で、verapamil については、CYP3A4 の飽和でほぼ非線形な血中動態を説明できることを明らかにすることができた。本方法論は、CYP3A4, P-gp 基質の $F_a F_g$ 値の予測につながることから、汎用可能な消化管吸収予測モデルとして有用であると考えられる。

(4) BCRP の遺伝子多型による輸送機能の低下割合と基質薬物の消化管アベイラビリティとの定量的関係に関する検討

BCRP の c.421C>A 変異における薬物動態の変動を観察する試験が行われた薬物で、十分に *in vivo*, *in vitro* の情報が収集できた 11 種類の薬物を対象として、解析を実施した。その結果、最初に c.421C>A 変異をホモで有するヒトと野生型遺伝子をホモで有するヒトのデータのみを焦点を当てて、臨床データを最もよく説明可能な BCRP 機能低下の割合をモデル解析により定めたところ、BCRP 機能が、c.421C>A 変異により 23% に低下したと考えたときに、最もよく臨床での事象が説明可能であることが示唆される結果を得た。また、この値を用いて、c.421C>A 変異をヘテロで有するヒトのデータを予測してみたところ、比較的良好な予測結果を得ることができた。通常、消化管のトランスポーターの機能と $F_a F_g$ 値は、線形な関係ではないことから、機能変動の予測は困難であるが、モデル解析

をうまく活用することにより、多型の影響を定量化することに成功した。本アプローチは、他の消化管に存在するトランスポーターの機能の変動を臨床データから予測する上でも使いつつと考えられ、方法論として汎用性があると考えている。

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 7 件)

Tanaka Y, Kitamura Y, Maeda K, Sugiyama Y. Quantitative Analysis of the ABCG2 c.421C>A Polymorphism Effect on In Vivo Transport Activity of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Using an Intestinal Absorption Model. *J Pharm Sci*, 査読有, in press
DOI: 10.1002/jps.24366

Tomaru A, Takeda-Morishita M, Maeda K, Banba H, Takayama K, Kumagai Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of Cremophor EL on the absorption of orally administered saquinavir and fexofenadine in healthy subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*, 査読有, in press
DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.01.002

Maeda K, Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as Important Regulators of the Pharmacokinetics of Substrate Drugs. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 38, 2015, 155-168
DOI: 10.1248/bpb.b14-00767

Watanabe T, Maeda K, Nakai C, Sugiyama Y. Investigation of the effect of the uneven distribution of CYP3A4 and P-glycoprotein in the intestine on the barrier function against xenobiotics: a simulation study. *J. Pharm. Sci.*, 査読有, 102, 2013, 3196-3204
DOI: 10.1002/jps.23623

Ieiri I, Tsunemitsu S, Maeda K, Ando Y, Izumi N, Kimura M, Yamane N, Okuzono T, Morishita M, Kotani N, Kanda E, Deguchi M, Matsuguma K, Matsuki S, Hirota T, Irie S, Kusuhara H, Sugiyama Y. Mechanisms of pharmacokinetic enhancement between ritonavir and saquinavir; micro/small dosing tests using midazolam (CYP3A4), fexofenadine (p-glycoprotein), and pravastatin (OATP1B1) as probe drugs. *J. Clin. Pharmacol.*, 査読有, 53, 2013, 654-61 DOI: 10.1002/jcph.62

Maeda K and Sugiyama Y. Prediction of Hepatic transporter-mediated Drug-drug interaction from *in vitro* data. *Transporters in Drug Development*, 査読無(招待執筆), 1, 2013, 121-153
<http://www.springer.com/us/book/978146148228>

Yoshida K, Maeda K, Sugiyama Y. Hepatic and intestinal drug transporters: prediction of pharmacokinetic effects caused by drug-drug interactions and genetic polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 査読有, 53, 2013, 581-612
DOI:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140309

〔学会発表〕(計12件)

中山丈史、前田和哉、Paul A. Dawson、楠原洋之、Ussing chamber を用いた薬物の消化管組織透過性に関する担体輸送機構の検討、第22回HAB研究機構学術年会、2015年6月26日~27日、昭和大学上條講堂(東京都品川区)

Maeda K, Quantitative analysis of the boosting effect of ritonavir on the pharmacokinetics of saquinavir by using physiologically-based pharmacokinetic modeling, 2014 Annual Meeting of KSAP (招待講演), 2014年10月31日、Seoul, Korea

Takeshi Nakayama, Kazuya Maeda, Shinya Fukizawa, Yukio Kato, Paul A. Dawson, Hiroyuki Kusuhara, CHARACTERIZATION OF THE SECRETORY TRANSPORT OF DRUGS IN THE MOUSE SMALL INTESTINE USING USSING CHAMBER SYSTEM, 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014年10月19日~23日、San Francisco, CA, USA

Xuan Zhang, Kazuya Maeda, Hiroshi Suzuki, Hiroyuki Kusuhara, Hepatic Organic Cation Transporter 1 (OCT1) Regulates the Hepatic Clearance of Triptans, But Not Beta-blockers, 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014年10月19日~23日、San Francisco, CA, USA

Maeda K, Clinical Importance of Transporter-mediated Drug-Drug Interactions: Basics and Applications of Evidence-based Decision Making, 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting (招待講演), 2014年10月19日~23日、San Francisco, CA, USA

Maeda K, Integration of Novel Microdosing Studies with Mechanistic Modeling to Understand Impact of Transporter-Metabolism Interplay, Gordon Research Conference "Drug Metabolism" (招待講演), 2014年7月6日~11日、Holderness, NH, USA

尾上朋弘、前田和哉、楠原洋之、HCV治療薬の肝取り込みにおけるOATP分子種の重要性の検討、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(東京都千代田区)

前田和哉、臨床試験における薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝子多型の影響を予測する：臨床試験による確認を最少にできるか？、第344回CBI学会研究講演会(招待講演)、2013年12月10日、東京大学山上会館(東京都文京区)

前田和哉、薬物トランスポーター分子の機能がヒト in vivo 薬物動態に与えるインパクトの定量的予測、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(招待講演)、2013年11月23日~24日、東北大学片平キャンパス さくらホール(宮城県仙台市)

前田和哉、薬物とトランスポーターの相互作用による薬効・副作用発現の変動とその予測にむけて、第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(招待講演)、2013年11月21日~22日、東京大学大学院薬学系研究科(東京都文京区)

Maeda K and Sugiyama Y., Prediction of Transporter-mediated DDIs involving hepatic transporters, The 16th International conference on drug-drug interactions (招待講演), 2013年6月24日~27日、Seattle, WA, USA

Maeda K and Sugiyama Y. Factors for the inter-individual differences in the pharmacokinetics of OATP substrates, The 4th International conference clinically relevant drug transporters 2013 (招待講演), 2013年4月22日~23日、Berlin, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和哉 (MAEDA, Kazuya)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：00345258