

論文の内容の要旨

論文題目 創薬初期段階におけるヒト薬物代謝の予測

氏 名 成富 洋一

【序論】

従来、医薬品開発においてキャンディデイト化合物は主に薬効や毒性面の評価により選択されてきた。しかしながら、多くの化合物が臨床試験で薬物動態学的問題点から開発を断念してきたことから近年、創薬初期段階における薬物動態研究が重要視されている。特に P450(CYP)などによる薬物代謝に関する研究は重要である。この薬物代謝研究を実施する際、創薬初期段階の状況を踏まえた予測評価系を構築することが必要である。

私の研究では、創薬初期段階における薬物代謝研究として、肝マイクロゾーム・肝細胞を用いたヒト肝クリアランスの予測法の構築とその際観察された *in vitro* と *in vivo* の乖離の原因について検討した。さらに薬物代謝に関与する CYP 分子種の同定について、創薬初期段階を想定した方法を検討した。

【本論】

1 肝マイクロゾームを用いた *in vitro* 代謝及び実験動物の *in vivo* 試験によるヒト肝クリアランスの予測

血中濃度を規定するパラメーターとして重要な肝クリアランスの予測については生理学的モデル、クリアランスコンセプトに基づく方法が確立されてきた。すなわち、肝マイクロゾーム、肝細胞等による *in vitro* 代謝試験から得られた代謝固有クリアランス

($CL_{\text{int, in vitro}}$) を *in vivo* 代謝固有クリアランス ($CL_{\text{int, in vivo}}$) の予測値とし、数学モデルを用いて肝クリアランスを定量的に予測する。しかしながら、 $CL_{\text{int, in vitro}}$ と $CL_{\text{int, in vivo}}$ が一致せず、予測が困難な場合も多い。そこで P450 で代謝されるモデル化合物について、実験動物及びヒト肝マイクロゾームを用いた *in vitro in vivo scaling* を再検討した。まず P450 で主に代謝される 8 モデル化合物について、ラット、イヌ、ヒト肝マイクロゾームで代謝させた際の未変化体濃度推移から $CL_{\text{int, in vitro}}$ を算出した。 $CL_{\text{int, in vivo}}$ は *in vivo* データより数学モデル (well stirred, parallel-tube, dispersion model) を用いて算出した。さらに各化合物について $CL_{\text{int, in vivo}}$ と $CL_{\text{int, in vitro}}$ を比較、scaling factor ($CL_{\text{int, in vivo}} / CL_{\text{int, in vitro}}$) を評価した。ヒト scaling factor の値は化合物間で 0.3–26.6 倍と大きな違いが認められた。一方、同一化合物においてほとんどの動物 scaling factor はヒトと比べて 2 倍以内とほぼ同じ値を示した。そこで、ヒト $CL_{\text{int, in vitro}}$ を動物 scaling factor で補正することにより、ヒトにおける予測精度の向上を試みた。その結果、動物 scaling factor で補正していない $CL_{\text{int, in vitro}}$ は $CL_{\text{int, in vivo}}$ とほとんどの化合物で 2 倍以上の違いを示したのに対し、動物 scaling factor で補正した場合では 2 倍以内と良好な相関が得られた。さらに動物 scaling factor で補正したヒト $CL_{\text{int, in vitro}}$ を用いて予測した薬物代謝能の指標である肝抽出率も実測値と良く一致した。

以上、ヒト肝マイクロゾームによる $CL_{\text{int, in vitro}}$ を実験動物 scaling factor で補正する方法はヒト肝クリアランス予測をより正確なものにすると考えられた。

2 薬物代謝の予測における肝細胞の有用性：ラットおよびヒトにおける $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ の比較

肝細胞を用いた場合、複数種の薬物代謝酵素による代謝の評価が可能になると考えられる。そこで検討には P450 以外にグルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素、エステラーゼで代謝される 9 モデル化合物を用いた。まずモデル化合物をラット遊離肝細胞で代謝させた際の未変化体濃度推移から $CL_{\text{int, in vitro}}$ を算出、さらに scaling factor を評価したところ、ラット scaling factor は化合物間で 0.2–73.1 倍と大きな違いが認められた。また、ラットの非凍結と凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ には良好な相関が認められ両肝細胞間で代謝活性は維持されていることが示唆された。次に各化合物について 5–7 検体のヒト凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ を測定したところ、その値には大きな個体差が認められた。 $CL_{\text{int, in vitro}}$ の平均値を $CL_{\text{int, in vivo}}$ の予測値とした場合、実測値との差は化合物で異なり、いくつかの化合物では 10–200 倍の大きな違いが認められた。一方、ヒト $CL_{\text{int, in vitro}}$ をラット scaling factor で補正し、ヒト $CL_{\text{int, in vivo}}$ を予測したところ、その予測値と実測値はほとんどが 5 倍の範囲内で一致した。

以上、ヒト凍結肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ をラット scaling factor で補正することで $CL_{\text{int, in vivo}}$ をより正確に予測できるものと考えられた。

3 $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ における乖離の原因に関する検討

肝マイクロゾーム、肝細胞を用いた *in vitro* *in vivo* scaling において、いくつかの化合物では $CL_{\text{int, in vitro}}$, $CL_{\text{int, in vivo}}$ 間の乖離が観察された。ここで、P450 で主に代謝される化合物について、実験動物における全血中非蛋白結合率と scaling factor との相関を検討したところ、両値に逆相関の傾向が認められた。また、乖離の原因として、反応液中の肝マイクロゾームや肝細胞への結合による $CL_{\text{int, in vitro}}$ の過少評価が考えられた。しかしながら、ヒト肝マイクロゾーム、ラット肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ を反応液中の非結合率で補正してもなおいくつかの化合物では $CL_{\text{int, in vivo}}$ との一致は見られなかった。さらに乖離が化合物の血液から肝細胞への移行に起因する可能性を考え、ラット肝細胞による代謝を血清中で実施した。しかし、全ての化合物で *in vitro* と *in vivo* の一致は見られなかった。

以上、 $CL_{\text{int, in vivo}}$, $CL_{\text{int, in vitro}}$ における乖離の原因は、化合物の血中蛋白結合と関連性のあることが示唆された。一方、これらの乖離は反応液中での結合性や血液から肝細胞への移行に起因する可能性のみでは説明できなかった。

4 Glibenclamide, lansoprazole 代謝に関与するヒト cytochrome P450 分子種の同定と寄与率：未変化体の消失による評価

薬物動態における個体差や薬物間相互作用を予測する上で重要である代謝に関与する CYP 分子種の同定は発現系による代謝、分子種マーカー活性との相関、分子種阻害剤・抗体を用いた検討や relative activity factor (RAF) を用いた各分子種の寄与率評価などにより行われる。これらは一般に代謝物の生成速度を用いるが、代謝物に関する情報が少ない創薬初期段階では適用され難い。そこで、創薬初期段階を想定した CYP 分子種同定法として、肝クリアランス予測でも用いた基質の消失による方法を適用、glibenclamide, lansoprazole 代謝に関与する CYP 分子種の同定を行った。9 種のヒト CYP 分子種発現系のうち、CYP2C19, 3A4 で両化合物の代謝が認められた。CYP2C19, 3A4 発現系、ヒト肝マイクロゾームで代謝させた際の未変化体濃度推移より算出した CL_{int} , および CYP2C19, 3A4 の RAF から、ヒト肝マイクロゾームの glibenclamide, lansoprazole 代謝における CYP2C19, 3A4 の寄与率を評価した。その結果、glibenclamide では CYP2C19 が 4.6%, CYP3A4 が 96.4% と CYP3A4 が主に代謝に関与していたのに対し、lansoprazole では CYP2C19 が 75.1%, CYP3A4 が 35.6% と、両 CYP 分子種ともある程度の寄与を示した。個別ヒト肝マイクロゾームにおける glibenclamide CL_{int} は、CYP2C19 マーカー活性とは相関を示さなかったのに対し、CYP3A4 とは非常に良好な相関性が認められた。一方、lansoprazole CL_{int} では、CYP2C19, 3A4 両分子種に対して比較的良好な相関性が見られた。ヒト肝マイクロゾームの glibenclamide 代謝は CYP3A4 阻害剤により顕著に阻害されたのに対し、lansoprazole 代謝は CYP2C19・3A4 阻害剤により中程度に阻害された。さらに anti-CYP3A serum は glibenclamide 代謝を顕著に阻害したが、lansoprazole では約 30% の阻害に留まった。

以上、ヒト肝マイクロゾームによる glibenclamide, lansoprazole 代謝に関与する CYP 分子種の同定を基質の消失により行ったところ、glibenclamide は主に CYP3A4 で代謝されるのに対し、lansoprazole では CYP2C19, 3A4 ともある程度の寄与を示した。

【結論】

ヒト肝マイクロゾーム、肝細胞による $CL_{\text{int, in vitro}}$ を実験動物の scaling factor で補正することにより、ヒト肝クリアランスの予測をより正確なものにすることが可能であった。また、代謝に関与する CYP 分子種同定を基質の消失を用いて評価したところ、各同定法で結果はよく一致し、本評価法の妥当性が示唆された。本研究で構築した方法論を創薬初期段階に適用することで薬物動態面でも良好な新薬の創出に貢献できるものと考えられた。