

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 隆志

医薬品開発過程において医薬品候補化合物は薬効面、物性面、安全性面など様々な観点から評価され、総合的に優れた化合物が臨床試験へと進む。近年では薬理評価と並行して薬物動態面からの評価も早期に行われており、動物実験やヒト試料を用いた *in vitro* 実験が実施されている。これらの検討により、薬物相互作用等の危険性を制限しつつ、ヒトにおいて望ましい血漿中濃度を必要時間維持可能な候補化合物を効率的に獲得できるようになった。このように非臨床段階において効率的に医薬品探索が行われるようになった一方で、臨床において遺伝子変異や環境要因の影響により、薬物動態や薬効発現に個人差が生じることがある。そのため医薬品開発過程においては個人間変動につながりうる要因を特定し、可能な限り改善された候補化合物を選抜することが求められている。

4-[1-[3-chloro-4-[*N*-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl]-(4*S*)-fluoro-(2*S*)-pyrrolidine-2-yl]methoxybenzoic acid (D01-4582) は申請者が属する製薬企業で見いだされた $\alpha_4\beta_1$ インテグリン阻害作用を有する化合物である。この D01-4582 を日本 SLC から購入した Sprague-Dawley ラット (Slc:SD、以下 SD ラット) とチャールズリバー・ジャパンから購入した Sprague-Dawley ラット (Crj:CD(SD)IGS、以下 CD ラット) に静脈内投与すると、CD ラットにおける血漿中濃度曲線下面積 (AUC) は SD ラットにおける AUC の 6 倍であった。経口吸収率は CD ラットが 3 倍高く、経口投与後の AUC は CD ラットにおいて SD ラットの 19 倍であった。一方、ビーグル犬においても血漿中濃度推移に個体間変動が認められ、常に高血漿中濃度を示す個体と常に低血漿中濃度を示す個体に分類できた。このような体内動態の変動は他の D01-4582 誘導体にも認められた。両動物種における変動要因が不明であったことから、本化合物は臨床においても同様に薬物動態の個人差を生じ、薬効発現の個人差につながる可能性や、医薬品探索において化合物の体内動態を正しく評価できていない可能性が懸念された。今後の医薬品探索の方針決定を正しく行うために、申請者は D01-4582 をモデル化合物として実験動物における体内動態の個体差の原因究明と、ヒトにおける個人間変動に関するリスク評価を行った。

1. ラットにおける体内動態のブリーダー差および系統差に関する検討

申請者は Wistar, Lewis, Brown Norway の各系統のラットについて D01-4582 の体内動態を検討し、Lewis ラットは CD ラット同様に高い血漿濃度を示すこと、その他の系統は SD ラット同様、低血漿中濃度を示すことを明らかにした。RI 標識体を用いた検討の結果、D01-4582 は肝排泄型化合物であり、代謝物の生成にはブリーダー差がないことを示した。次に肝臓への取り込みを検討した結果、肝取り込み過程にブリーダー差が存在し、肝取り込みの差が直接、体内動態のブリーダー差へ反映されていることが示唆された。肝細胞の血液側には種々のトランスポーターが発現していることから D01-4582 の肝取り込みトランスポーターによる輸送を検討した結果、D01-4582 は有機アニオントランスポーターによって取り込まれるものの、ブリーダー差の原因ではないことが示唆された。次に SD ラット、CD ラットから調製した遊離肝細胞を用いた取り込み実験の結果、buffer 中での取り込みにはブリーダー差が認められず、血漿共存下でのみ肝取り込みに差が認められるこ

とを見い出した。血漿と肝細胞の組み合わせを入れ替えた実験の結果、CD ラット血漿存在下において肝取り込みが低下した。これにより D01-4582 の肝取り込み過程のブリーダー差は肝細胞によるものではなく、D01-4582 と血漿との相互作用によるものであることが示唆された。血漿蛋白結合を超遠心法で評価した結果、非結合型分率は SD ラットおよび CD ラットでそれぞれ 0.26% および 0.015% であり、解離定数 (K_d) はそれぞれ 1.7 および 0.077 μM であることを示した。Wistar, Lewis, Brown Norway の各系統のラットについても検討し、高血漿中濃度を示す Lewis ラットは高蛋白結合率を示し、低血漿中濃度を示す他のラットは低蛋白結合率を示すことを明らかにした。それぞれのラットにおける非結合型血漿中濃度推移はほぼ同様の推移であることを示した。以上のことからラット体内動態のブリーダー差および系統差は血漿蛋白結合の差によって引き起こされていることが示唆された。精製アルブミンを用いても K_d に系統差が認められたことから、アルブミンが主な原因蛋白と考えられた。アルブミンの遺伝子配列を解読し Genbank の参照配列 (NM134326) と比較した結果、低蛋白結合を示す系統は共通して V238L、T293I、V407I のアミノ酸変異を伴っていることを明らかにした。このうち V407 の変異は高蛋白結合を示すラットにも認められたことから、D01-4582 の蛋白結合の変化には薬物結合部位近傍に位置している V238 と T293 が関与していると考えられた。4 種のリコンビナントアルブミン (rSD, rCD, rV238L, rT293I) を作成し、 K_d の変動に対するこれら 2 箇所のアミノ酸変異の相対的な影響を検討した結果、rSD, rCD, rV238L, rT293I の K_d はそれぞれ 974, 210, 426 および 191 nM であった。V238L のみを有する rV238L において K_d が rCD の約 2 倍であったことから V238L の変異が相対的に重要であることが示唆されたが、V238L の変異のみでは両方の変異を有する rSD の K_d と一致しなかったことから、T293I と V238L の 2 つの変異が共存することで K_d が大きく変化する可能性が示唆された。

2. イヌにおける体内動態の個体差に関する検討

申請者は 26 頭のビーグル犬について全長 cDNA 配列を解読し、Genbank の参照配列 (AB090854) と比較した。その結果 Ala335Ser, Glu450Asp のアミノ酸変異が観察された。さらに 21 頭のビーグル犬について全血試料から遺伝子型を判定し、合計 47 頭について検討した結果、上記 2 箇所の変異は同一のアレル上に存在していることが示唆された。変異型アレルの推定存在確率は 40% であった。遺伝子型が明らかな 35 頭のビーグル犬の血漿蛋白結合は野生型のホモ接合体が最も低く (0.015%, CV%=20%, n = 10)、変異型のホモ接合体が最も高かった (0.059%, CV%=27%, n = 5)。ヘテロ接合体の個体はその中間であった (0.028%, CV%=39%, n = 20)。変異型の個体および野生型の個体から得た血漿の K_d 値はそれぞれ 88.8 nM および 15.2 nM であった。予めアルブミンの遺伝子型で群分けしたビーグル犬を用いて D01-4582 の体内動態を検討した結果、静脈内投与後の AUC は野生型、ヘテロ接合体、変異のホモ接合体の順に高かった。しかし非結合型濃度推移には差は認められなかった。以上より、イヌにおける体内動態の個体差には蛋白結合の個体差が関与しており、その蛋白結合の個体差はアルブミンの遺伝子変異によるものと考えられた。本検討により、以後はイヌの背景因子をそろえることにより各群においてばらつきの少ない血漿中濃度推移が得られ、精度のよい実験結果に基づいて化合物の体内動態を正しく評価できるものと考えられた。

ヒト血清アルブミン (HSA) には 70 以上の遺伝子変異が報告されているが、今回観察された変異箇所に対応するアミノ酸変異は報告されていない。また HSA のどのアミノ酸変異も発現頻度が非常に低い。万一、変異アルブミンを有する患者に薬物が経口投与されたとしても、薬効・毒性に関与する非結合型濃度の AUC は蛋白結合の変動の影響を受けない。以上、頻度および影響度の観点から、臨床においてはアルブミンの遺伝子変異に起因する体内動態の個人差が起こる可能性は低いと考えられた。本研究に基づく考察をうけて、医薬品探索研究ではアルブミン遺伝子型以外の因子による影響の改善・最適化へと方針が修正された。このように医薬品探索の早期に変動要因を特定し、ヒトにおける変動リスクを考察し、誘導体展開を妥当な方向へ導いた申請者の研究は安全で有効な医薬品を効率よく創出するための重要な研究であると考えられた。

申請者は D01-4582 に認められたラット体内動態のブリーダー差および系統差、並びにイヌ体内動態の個体差が、アルブミンの遺伝子変異による結合親和性の変化によるものであることを明らかにした。実験動物における体内動態の変動要因を早期に解明し、臨床におけるリスクの考察に基づきその後の医薬品探索の方針を決定した本研究は個別化医療への入り口となりうる研究であることから、申請者の得た研究意義は非常に大きく、申請者の研究は安全で有効な医薬品の創製のために重要な研究と位置づけられると考えられ、博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと認めた。