

Cytochrome P450 3A4 トランスジェニックマウス を用いたヒト薬物動態の新規予測法の開発

満井, 哲也

<https://hdl.handle.net/2324/1500651>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



Cytochrome P450 3A4トランスジェニックマウスを用いた ヒト薬物動態の新規予測法の開発

分子衛生薬学分野 3PS10012E 満井 哲也

【序論】

医薬品開発において、化合物の薬効および毒性の評価に加えて薬物動態特性を評価することは、経口吸収性、組織移行性および体内滞留性等の特性を最適化するために重要であり、その評価方法は、ヒトの薬物動態を高い精度で予測しうるものである必要がある。評価すべき薬物動態パラメータの中で、全身クリアランス (CL_{tot}) およびバイオアベイラビリティ (F) は、薬物の薬効および毒性と密接に関係する全身曝露を決定するものであり、最も重要である。 CL_{tot} は肝クリアランス (CL_h) や腎クリアランス (CL_r) に代表される各臓器クリアランスの和として表されるが、近年の医薬品候補化合物は脂溶性が高く、肝臓で代謝を受ける割合が高いことから、 CL_{tot} の大部分を CL_h が占める。よって、 CL_h および F の高い精度でのヒト予測法の開発は重要な課題と考えられ、研究が進められている。

ヒト CL_h の予測は、実験動物の *in vivo* データを利用するアニマルスケールアップ法、ヒト肝組織を使った *in vitro* データを利用する *in vitro-in vivo exploratory* 法が主要な方法であるが、いずれの方法においても予測値の 1/2~2 倍の範囲に実測値を示す化合物の割合は 60% 程度にとどまり、その予測精度は満足できるレベルにはない。 F についても、いくつかのアプローチが試みられているが、高い精度で予測する標準的な方法は開発されていない。本研究では、マウスの遺伝子・細胞・組織の一部がヒトのものに置き換わったヒト化マウスに着目し、これがヒト CL_h および F の予測ツールとして適するのではないかと考えた。なぜなら、既存のアニマルスケールアップ法の欠点である代謝種差を埋めることで精度向上が期待されるからである。ヒト化マウスの中でも、市販される 50% 以上の薬物の代謝に関わる CYP3A4 のトランスジェニックマウス、特にマウスに発現する 8 種の Cyp3a 分子種全ての遺伝子がノックアウトされたマウス (Cyp3a-KO マウス) をベースにした CYP3A4トランスジェニックマウス (CYP3A4-Tg マウス) がヒト薬物動態予測モデルとして有用と考え、CYP3A4 基質のヒト CL_h および F 予測に対する有用性を評価した。

CL_{tot} および F には個体差があり、これが血漿中薬物濃度の個体差、ひいては医薬品の薬効や副作用の発現の個体差につながる。従って、個体間の血漿中薬物濃度のバラツキまで予測することが、医薬品のさらなる適性使用に寄与すると期待される。個体差の要因としては、代謝酵素の発現レベル、代謝酵素の遺伝子多型などが存在するが、それらだけでは全ての個体差を説明できない。そこで本研究では、ヒトにおける CYP3A4 基質の CL の個体差を生み出す要因の 1 つと考えられる、P450 と UGT の相互作用に着目し、CYP3A4-Tg マウス、Cyp3a-KO マウスおよび wild-type (WT) マウスの肝ミクロゾームを用いて酵素活性の変動を解析することで、Cyp3a/3A4 と Ugt の機能的相互作用を検討した。

【方法】

CYP3A4 基質の新規ヒト CL_h 予測法開発

本研究では、主として CYP3A4-Tg マウスの *in vivo* データを活用することで、ヒト CL_h および F の正確な予測法の確立を目指した。具体的には、6 種類の CYP3A4 基質、アルプラゾラム (ALP)、フェロジピン (FLD)、ミダゾラム (MDZ)、ニフェジピン (NFD)、ニトレンジピン (NTL) およびキニジン (QND) を

CYP3A4-Tg マウスおよび WT マウスへ静脈内投与したのち、 CL_{tot} を算出した。各基質の尿中排泄結果から腎クリアランス (CL_r) を算出し、 CL_{tot} から CL_r を差し引くことで CL_h を算出した。次に、血漿中タンパク非結合率 (f_u) および血球移行率 (R_B) 等のパラメータを実験により求め、生理学的モデル (Dispersionモデル) にあてはめることで CL_h から肝固有クリアランス ($CL_{int,h}$) を算出した。ヒトと CYP3A4-Tg マウスもしくは WT マウスの $CL_{int,h}$ に関して回帰分析を行い、ヒトと各マウスの相関について検討した。ヒトの体内動態パラメータは文献調査により入手した。さらに得られた回帰式を用いたヒト CL_h の予測精度を算出することで、ヒト CL_h 予測ツールとしての CYP3A4-Tg マウスの有用性を評価した。CYP3A4-Tg マウスに発現するマウス由来の代謝酵素が、本試験で用いた CYP3A4 基質の代謝を触媒する可能性が考えられたことから、CYP3A4-Tg マウスから調製した肝マイクロゾームと CYP3A4 特異的な抗体を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し、CYP3A4 基質の CYP3A4-Tg マウスの代謝における CYP3A4 の寄与率 ($f_{m,CYP3A4}$) を算出し、CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ に対する補正項として用いた。

CYP3A4 基質の新規ヒト F 予測法開発

F は $F = F_a \times F_g \times F_h$ で表される。本研究では、CYP3A4 基質をそれぞれ CYP3A4-Tg マウスに経口投与した時の各基質の血漿中濃度推移から薬物動態パラメータを求め、静脈内投与時のデータと合わせることで F 、 F_h および $F_a F_g$ の各パラメータを算出した。ヒトと CYP3A4-Tg マウスの各パラメータを回帰分析することで両者の相関を明らかにし、ヒト F 予測に対する CYP3A4-Tg マウスの有用性を評価した。

次いで、CYP3A4-Tg マウスへの静脈内投与試験から算出された CYP3A4 基質の $CL_{int,h}$ を用いることにより、ヒトの F 予測を試みた。なぜなら、ヒトにおける CYP3A4 基質の F_h および F_g と CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ との間に相関があることが、本研究結果および論文報告により推察されており、さらにヒトの F_a がマウスの F_a と同等である可能性も、論文情報から見出されているからである。よって、CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ とヒトの $F_a F_g$ 、 F_h および F について相関を検討することで、ヒト F 予測の可能性を推察した。

クリアランスの個体差要因としての P450-UGT 相互作用検討

Cyp3a-KO マウス、CYP3A4-Tg マウスおよび WT マウスの各肝マイクロゾームを用いて、Ugt の基質であるモルヒネを代謝させ、モルヒネの主代謝物である 3 位のグルクロン酸抱合体 (モルヒネ-3-グルクロニド; M-3-G) を測定することで Ugt の酵素活性変動の有無を解析した。同時に、各マウスの肝臓に発現する主要な Ugt 分子種 11 種の mRNA 発現レベルの解析も実施し、活性変動と合わせて分析することで、Ugt 機能に及ぼす Cyp3a/3A の役割を推察した。

【結果】

CYP3A4 基質の新規ヒト CL_h 予測法開発

6 種の CYP3A4 基質に関して、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの $CL_{tot,b}$ および CL_h をそれぞれ比較し、相関について検討した。しかし、いずれのパラメータも、明確な相関は得られなかった。次に、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ に関して回帰分析を行うことで、両者の相関を検討した。まず直線回帰により回帰直線を求めたところ、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ に高い相関 ($R^2=0.977$) が認められたが、回帰直線の 1/2~2 倍の範囲から 6 化合物中 3 化合物 (MDZ, QND および ALP) が外れていた。CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ を $f_{m,CYP3A4}$ で補正し

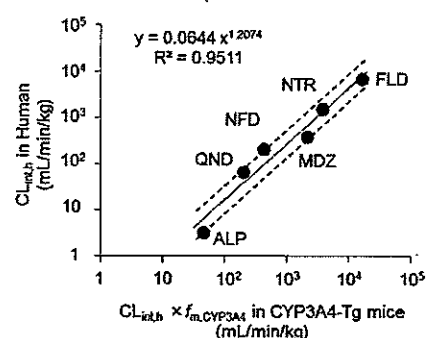


Fig. 1. Correlation estimated by power regression analysis for the $CL_{int,h}$ of CYP3A4 substrates between humans and CYP3A4-Tg.

た値を用いた場合、補正無しの場合に比べて相関は高まったものの ($R^2=0.993$)、回帰直線の 1/2~2 倍の範囲から ALP が外れていた。次に、累乗回帰により回帰直線を求めたところ、直線回帰と同等の相関 ($R^2=0.951$) が得られた。さらに $CL_{int,h}$ を $f_{m,CYP3A4}$ で補正した場合には、補正無しの場合と比べて R^2 は変わらなかったが、検討した低クリアランス (ALP) から高クリアランス (FLD) の 6 種全ての CYP3A4 基質が回帰直線の 1/2~2 倍の範囲に収まった (Fig. 1)。このように、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ に関して、 $f_{m,CYP3A4}$ 補正と累乗回帰により最も良好な相関関係を見出すことができた。Fig. 1 に示される回帰式を用いて、CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h} \times f_{m,CYP3A4}$ からヒト $CL_{int,h}$ の予測値を計算し、さらに Dispersion 式および $F_h=1-CL_h/Q_h$ 式よりヒト CL_h の予測値を算出し、ヒト CL_h の実測値と比較した (Q_h : 肝血流速度)。その結果、すべての予測値が実測値の 1/2~2 倍の範囲に入る結果が得られた (Table 1)。WT マウスから得られた $CL_{int,h}$ を用いても同様の解析を行ったが、ALP は実測値の 452%、NFD は 18% となり、CYP3A4-Tg マウスに比べて明らかに低い予測精度であった。

CYP3A4 基質の新規ヒト F 予測法開発

6 種の CYP3A4 基質の F 、 F_h および F_aF_g に関して、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの間で回帰分析を行った結果、いずれのパラメータも全く相関が認められず、よって CYP3A4-Tg マウスに CYP3A4 基質を経口投与した時の F を用いてヒトの F を予測することは困難と考えられた。次に CYP3A4 基質を CYP3A4-Tg マウスに静脈内投与した時の $CL_{int,h}$ を用いることで、ヒトの F 予測が可能か検討した。ヒトの F_aF_g と CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ との相関は、 $f_{m,CYP3A4}$ の補正の有無にかかわらず、 R^2 が 0.3-0.4 程度であり、明確な相関は得られなかった。しかし、ヒトの F_h および F と CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ との相関に関しては、 $f_{m,CYP3A4}$ で補正しない場合とした場合のいずれにおいても、 R^2 はそれぞれ 0.90 以上および 0.85 以上でどちらも高い相関が認められた。CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ を $f_{m,CYP3A4}$ で補正した場合において、補正しない場合に比べて相関が高くなることが示され、補正した場合の F に関しては、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの R^2 は 0.907 であった (Fig. 2)。

クリアランスの個体差要因としての P450-UGT 相互作用検討

Cyp3a-KO マウス、CYP3A4-Tg マウスおよび WT マウスの各マウスから調製した肝ミクロゾームを用いてモルヒネに対する Ugt 酵素活性を測定した結果、いずれの群の酵素活性も Michaelis-Menten

Table 1. Accuracy for the prediction of human CL_h in terms of six CYP3A4 substrates: the prediction based on the correction with $CL_{int,h}$ and $f_{m,CYP3A4}$ obtained from CYP3A4-Tg mice

Substrate	CL_h (mL/min/kg)		Accuracy (%)
	Observed	Predicted	
ALP	1.03	2.01	195
FLD	16.4	17.3	106
MDZ	7.26	10.7	147
NFD	5.82	2.98	51
NTR	12.3	11.2	92
QND	4.14	2.65	64

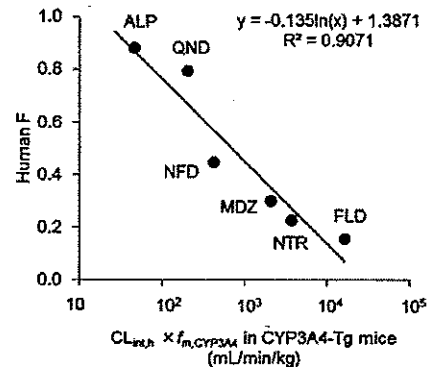


Fig. 2. Correlation between the corrected $CL_{int,h}$ by $f_{m,CYP3A4}$ in CYP3A4-Tg mice and F in humans.

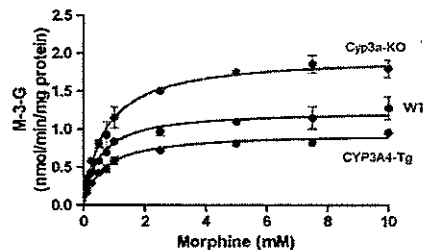


Fig. 3. Michaelis-Menten plots of morphine-3-glucuronidation activity catalyzed by liver microsomes from Cyp3a-KO, CYP3A4-Tg and WT mice.

式に従う Kinetics を示した (Fig. 3)。3 種のマウスから得られた結果を比較すると、 K_m は各マウス間で差は認められなかった。しかし、 V_{max} は Cyp3a-KO マウス (1.96 nmol/min/mg) で最も大きく、WT マウス (1.25 nmol/min/mg) と比べて有意差が認められた。また CYP3A4-Tg マウス (0.95 nmol/min/mg) で最も小さな値となり、WT マウスおよび Cyp3a-KO マウスのいずれと比べても有意差が認められた。よって、Cyp3a/3A のは Ugt 機能に抑制的に働くことが明らかとなった。

【考察】

ヒト CL_h の予測に関しては、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの $CL_{int,h}$ に関して、累乗回帰による回帰分析結果を用いた場合、評価した 6 種の CYP3A4 基質の予測値は、すべて実測値の 1/2~2 倍の範囲に入ったことから、本法は既存の予測法を超え、より高い精度でヒト CL_h を予測しうる可能性を有することが示された。本研究では、CYP3A4-Tg マウスを用いた場合に、WT マウスに比べて明らかに高いヒト CL_h の予測精度を示した。これは、用いた CYP3A4-Tg マウスにヒト CYP3A4 が発現しているだけでなく、ヒトとの代謝種差の要因となるマウス由来の代謝酵素 Cyp3a 分子種の全てが欠失させられているためと考えられた。

ヒト F の予測に関しては、CYP3A4-Tg マウスに CYP3A4 基質を経口および静脈内投与した試験から算出した F を用いた場合には、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの間に明確な相関は認められず、予測は困難であった。しかし、CYP3A4 基質を CYP3A4-Tg マウスに静脈内投与した時の $CL_{int,h}$ を用いることで、ヒトと CYP3A4-Tg マウスの F は R^2 が 0.9 以上の高い相関を示したことから、高い精度でのヒト F 予測は可能となることが推察された。この時、 F_aF_g に関しては高い相関は得られず、原因は FLD にあると推察された。カルシウムチャンネルブロッカーである FLD や NFD は血管拡張作用を有し、肝血流速度を高めることが知られており、特に FLD はその効果が早く強いことが報告されている。本研究ではヒト Q_h を 20.7 mL/min/kg に設定したが、FLD の臨床試験時には想定より高く、その結果 F_aF_g が本来より高く算出され、相関を低下させていることが考えられた。

P450 と UGT の相互作用の検討では、マウスの Cyp3a および発現させたヒト CYP3A4 は、M-3-G を生成するマウス Ugt の V_{max} を抑制することが明らかとなった。その要因として、Ugt の発現を Cyp3a および CYP3A4 が低下させる可能性が考えられた。ただ、既発表のデータも考慮すると、P450 と UGT それぞれの分子種および発現している細胞の状況によって P450-UGT 間の相互作用は、内容や機構が異なる可能性が大きく、今回のモルヒネを対象とした解析のみでは全容の解明には至っていない。

本研究により、CYP3A4 基質のヒトにおける CL_h および F を既存の方法を超える高い精度で予測するには、CYP3A4-Tg マウスを活用し、in vivo 実験データから算出された $CL_{int,h}$ を用いることが有用であることが示された。その際、CYP3A4-Tg マウスの肝ミクロゾームを用いた CYP3A4 寄与率を補正項として用いることで、予測精度が向上することも示された。CYP3A4-Tg マウスの利用は、既存のアニマルスケールアップ法の欠点である代謝種差を埋めることで精度向上が実現できたものと推察される。これらの成績は、研究開始当初の仮説を支持するものであり、本研究の成果は医薬品開発の創薬段階における成功確率の高い化合物の選択や、精度の高い臨床試験プロトコル策定への応用が期待される。

【発表論文】

Mitsui T., Nemoto T., Miyake T., Nagao S., Ogawa K., Kato M., Ishigai M. and Yamada H. (2014) A useful model capable of predicting the clearance of cytochrome 3A4 (CYP3A4) substrates in humans: validity of CYP3A4 transgenic mice lacking their own Cyp3a enzymes. *Drug Metab. Dispos.*, 42: 1540-1547.