

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・薬理部
研究者 大野 泰雄

分担研究者

- | | |
|---------------------|------|
| (1)東北大学大学院薬学研究科 | 山添 康 |
| (2)東京大学大学院薬学系研究科 | 杉山雄一 |
| (3)三共(株)薬剤動態研究所 | 池田敏彦 |
| (4)塩野義製薬(株)新薬研究所 | 大野浩司 |
| (5)藤沢薬品工業(株)薬物動態研究所 | 丹波俊朗 |
| (6)大日本製薬(株)薬物動態研究所 | 藤井敏彦 |

要旨

フッ化ピリミジン系抗ガン薬の代謝活性化にヒトで最大約 18 倍の個体差があった。イヌ、サルの肝細胞がヒトと同様な酵素誘導能を示した。ヒト CYP3A4 誘導能検索系を開発した。2つのトランスポーターを導入した細胞系で経細胞輸送が観察された。

1. 研究目的

医薬品の適正使用のためには個々の患者における薬物の動態特性に基づいて薬剤の用法・用量を決定しなくてはならない。しかし、患者の薬物動態特性は遺伝的背景のみならず、年齢や性などの生理的状态、また、食事の影響や併用薬物による誘導・阻害などの非遺伝的因子によっても大きく左右されることが主に動物実験結果から知られている。しかしながら、ヒトと動物との間には酵素誘導における種差が存在する。欧米では薬物代謝酵素誘導能試験系としてヒト肝細胞を用いた試験が行われているが、我が国では酵素誘導能を有するヒト肝細胞の提供が現時点では困難である。そこで、ヒト細胞下画分、イヌ、サル肝細胞、ヒト由来の酵素遺伝子、トランスポーター遺伝子を導入・発現させた試験系を用いた *in vitro* 誘導試験系を開発し、ヒトの薬物の動態特性と比較検討する必要がある。

そこで、本研究では、1) 代謝動態特性の個体間変動とその要因に関する研究として、フッ化ピリミジン系抗癌剤（テガフル、ドキシフルリジン）のヒト肝における代謝活性化能および、経口避妊薬の主要な合成ステロイドであるエチニルエストラジオール (EE₂) の代謝能の個体差について検討する。2) 代謝酵素誘導能検索系を開発として、イヌ、サルの肝細胞を用いて、各種誘導剤の影響を検討し、ヒトとの酵素誘導の差を検討する。また、ヒト型の *in vivo* 酵素誘導能試験系として、ヒト型プロモーターを組み込んだ試験系を開発を行う。これら *in vitro* 及び *in vivo* 試験系を用いて非遺伝的因子の影響を明らかにする。3) トランスポーター発現細胞などを用いた薬物輸送、排泄能力の予測に関する研究として、消化管において発現している P-glycoprotein などの排出トランスポーターの基質となる薬物について、*in vivo* における吸収率を予測できる *in vitro* 実験系を確立するために、排出トランスポーターの遺伝子発現系を構築し、輸送の評価を行う。また、ラット肝細胞を用いて、薬物輸送活性の評価および、薬物の取り込み過程で生じる薬物間相互作用について検討することにより、ヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子について明らかにすることを目指した。

2. 研究方法

- 1) 12 人の白人由来ヒト肝ミクロソームおよび上清画分を酵素源とし、FT(Tegafur)または 5-DFUR (Doxifluridine)より 5-FU(5-Fluorouracil)への酵素反応に依存する変換活性を測定した。上清画分を用いる反応系には、透析した上清画分を使用し、5-FU の分解酵素であるジヒドロピリミジン脱水素酵素の阻害剤を共存させた。生成した 5-FU は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離定量した。また、ヒト肝上清画分の thymidine phosphorylase (dThdPase)様活性を測定した。また、EE₂(エチニルエストラジオール)の代謝能(2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合)は、³H-EE₂ をブール又はそれぞれ 35 及び 21 個体より調製されたヒト肝ミクロソーム又は上清画分と反応させた。反応後、代謝物を HPLC で分離し、その放射能を測定して活性値を算出した。
- 2) ビーグルイヌに Rifampicin 又は Omeprazole を 1 週間反復経口投与した後、肝ミクロソームを調製し、CYP3A 及び CYP1A1/2 のマーカー酵素活性である testosterone 6 β -hydroxylation (6 β -OHT) と ethoxyresorufin O-deethylation (EROD)活性を測定した。また、無処置のビーグルイヌから採取した肝臓より肝実質細胞を単離し培養を行い、細胞を Rifampicin 又は Omeprazole に暴露させ上記マーカー酵素活性の変動から CYP 誘導能を評価した。この際、代謝酵素活性を培養状態において実施し、ethoxyresorufin の代謝物として resorufin, resorufin O-glucuronide と resorufin O-sulfate の 3 者を分別測定した。(株)ケーエーシーから入手したラットおよびサルの凍結肝細胞をコラーゲンコート 24 穴 plate で培養した。CS-722 および β -ナフトフラボン(NF)に 72 時間曝露し、UGT1A 活性として *p*-ニトロフェノールのグルクロン酸抱合活性を測定した。
- 3) ヒト CYP3A4 遺伝子誘導能を評価するために、CYP3A4 の遺伝子上流域(-362~+11bp および-7kbp 付近)とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルス(AdCYP3A4-362 および AdCYP3A4-362-7k)を用いたレポーターアッセイ系を構築し、HepG2 細胞に導入した。CYP3A 誘導作用を有するデキサメサゾン、リファンピシンおよびクロトリマゾールを用いて、CYP3A4 誘導能を測定した。
- 4) 肝臓の有機アニオン系薬物の経細胞輸送モデルとして、極性を有する MDCK II 細胞を用いて、肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する OATP2 (organic anion transporting polypeptide 2)を basal 側に、MRP2 (multidrug resistance associated protein 2)を apical 側に発現した double-transfectant を構築し、17 β -estradiol 17 β -D-glucuronide (E₂17 β G), leukotriene C₄, pravastatin, cerivastatin の経細胞輸送を検討した。トランスポーターを介した薬物間相互作用はラット遊離肝細胞への cerivastatin 取り込みに対する、Cyclosporin A の影響を検討した。またラット凍結肝細胞を用い、³H]Estradiol-17 β -glucuronide(E₂17 β G)と、アニオン系化合物 [¹⁴C]P-001(P-001)の取り込み活性を評価した。

3. 研究成果

- 1) フッ化ピリミジン系抗癌プロドラッグのテガフル(FT)、ドキシフルリジン(5-DFUR)について、肝における代謝特性を比較した。12 人の白人由来ヒトサンプルを用いて検討した結果、FT から 5-FU の変換活性は、ミクロソーム画分では、最小で 44.9(pmol/min/mg protein)、最大で 808.3 の酵素活性値が得られ、約 18 倍の個体差が認められた。上清画分では、最小で 46.8、最大で 219.0 の酵素活性値が得られ、約 5 倍の個体差が認められた。5-DFUR から 5-FU への変換活性は、ミクロソーム画分では、最小で 10(検出限界)、最大で 160.1 の酵素活性値が得られ、約 16 倍以上の個体差が認められた。上清画分では、最小で 3164.6、最大で 6026.6 の酵素活性値が得られ、約 2 倍の個体差が認められた。5-DFUR の活性化に対する肝ミクロソーム、上清画分では、圧倒的に上清画分の寄与が大きいことが示された。FT, 5-DFUR から 5-FU への変換活性は共に、ミクロソーム画分では CYP2A6 活性に相関が認められ($r=0.624$ 及び 0.774)、CYP1A2、CYP3A4 については、相関は認められなかった。上清画分では thymidine phosphorylase(dThdPase)様に相関が認められた($r=0.753$ 及び 0.889)(Fig. 1)。

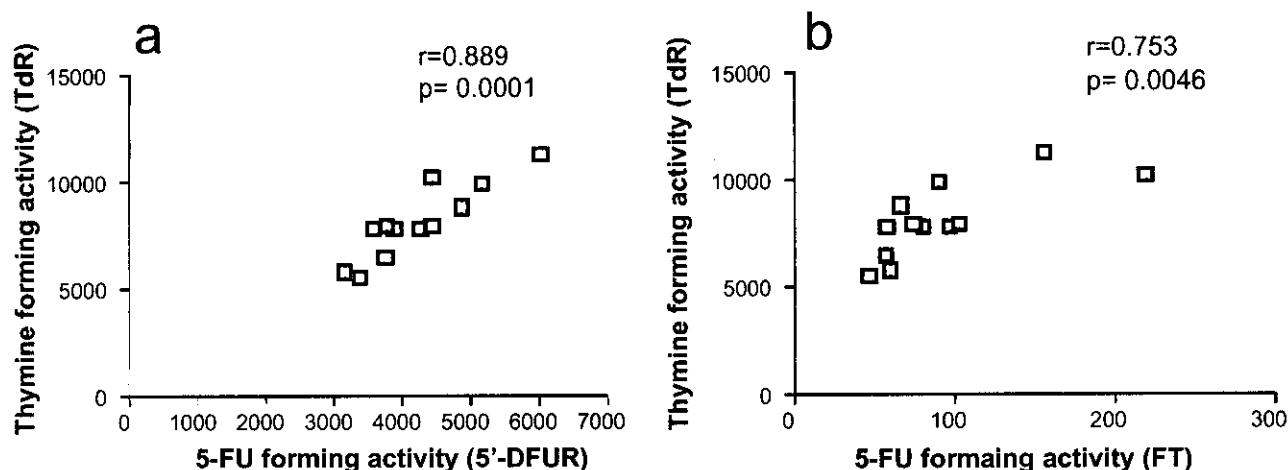


Fig. 1 Correlation between 5-FU formation from doxifluridine (5'-DFUR) and tegafur (FT) and thymidine phosphorylase activities in cytosols of livers of 12 human individuals

- 2) 35 種のヒト肝ミクロソーム及び 21 種の上清画分による 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性を検討したところ、平均値はそれぞれ 2.04、11.2 及び 1.20 pmol/min/mg protein であり、25、5.8 及び 24 倍の個体差が認められた。これらの活性と各個体の年齢との間には相関性は認められなかった。また、各活性間の相関性を検討したところ、2-水酸化活性と 3-硫酸抱合活性及び 2-水酸化活性と 3-グルクロン酸抱合活性の間のみ低い相関性 ($r^2 = 0.32$ 及び 0.463) が認められたが、他の活性間では相関性は認められなかった。各個体のヒト肝ミクロソームによる 2-水酸化活性において、CYP3A4 阻害剤である ketoconazole の影響を検討したところ、平均で 51.6% (最大値: 78.0%、最小値: 17.8%) 阻害され、4.4 倍の個体差が認められた。
- 3) ビーグルイヌに、ヒト肝 CYP3A4 の誘導剤である Rifampicin とヒト肝 CYP1A2 の誘導剤で Omeprazole を投与した結果、イヌ肝ミクロソームにおける 6 β -OHT 活性は顕著に上昇し、また Omeprazole 投与によって EROD 活性が著しい上昇を示した。これらの活性上昇は、抗 CYP3A12 抗血清と抗 CYP1A2 抗血清の添加によりそれぞれ特異的に消失したことから、CYP3A12 と CYP1A1/2 の誘導によると結論された。これに対して、*in vitro* イヌ培養肝細胞系でのこれら薬物による CYP 誘導パターンの評価をしたところ、*in vivo* 投与時と同様に Rifampicin の処理濃度と処理時間に依存した 6 β -OHT 活性の有意な上昇と、Omeprazole の処理濃度と処理時間に依存した EROD 活性の有意な上昇が確認された。更に Omeprazole 処理によって ethoxyresorufin O-glucuronide の産生量が顕著に増加したことから、CYP1A1/2 のみならず UDPGT 活性も誘導されている可能性が強く示唆された。
- 4) β -ナフトフラボン (NF) および CS-722 添加による、ラットおよびサル培養肝細胞における *p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性の変化は、ラット肝細胞では、陽性対照物質である NF 曝露により *p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性が約 1.5 倍上昇した。また CS-722 曝露では 0.1 μ M の濃度では顕著な誘導が認められなかったものの、1 および 10 μ M の濃度では 1.6~1.7 倍の活性上昇が確認された。この活性の増加の程度は *in vivo* でラットで認められた酵素誘導 (2.97 倍) を若干下回る程度であった。100 μ M の濃度では上昇の程度が抑制される傾向が観察された。甲状腺肥大が確認されなかったサルの肝細胞では、*p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性の上昇は認められなかった。陽性対照物質の NF も誘導効果を示さず、サルは UGT1A の誘導を受けない動物種であることが強く示唆された。なお、高濃度の CS-722 (100 μ M) で活性が抑制される傾向がラットと同様に認められた (Fig. 2)。

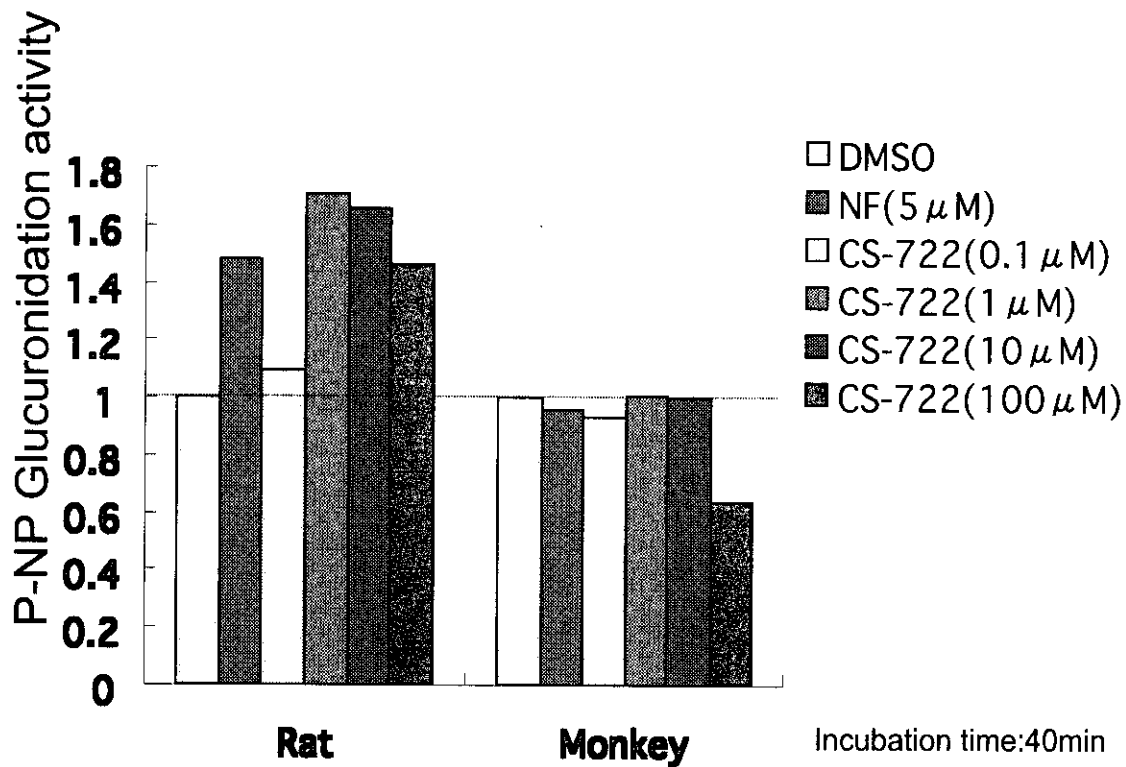


Fig. 2 Change in activity of *p*-nitrophenol glucuronidation after treatment of cryopreserved isolated hepatocytes of rats and monkeys with CS-722 for 72hr. DMSO: dimethyl sulfoxide, NF: β -naphthoflavon

5) ヒト CYP3A4 の遺伝子上流域(-362~+11bp および-7kbp 付近)とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルス(AdCYP3A4-362 および AdCYP3A4-362-7k)を用いたレポーターアッセイ系を構築し、HepG2 細胞に直線上にした本レポーター DNA を挿入し、恒常的に CYP3A4 誘導が検出可能なコロニーの単離を試みた。スクリーニングの結果、誘導様相の異なった複数のクローンを単離した。中でもクローン 3-1-20 とクローン 3-1-9 において、薬物による強い CYP3A4 遺伝子誘導が認められた(Fig. 3)。クローン 3-1-20 の他の薬物処置(10 μ M for 2 days)における CYP3A4 誘導の応答性について検討した結果、ヒトにおいて CYP3A4 の誘導が予測されているニフェジピン、トログリタゾン、デキサメサゾンにおいて応答性が認められた。また、今回グリセオフルビン、オメプラゾール等の薬物によっても CYP3A4 誘導応答が認められ、ヒトにおいても誘導を引き起こす可能性が示唆された。

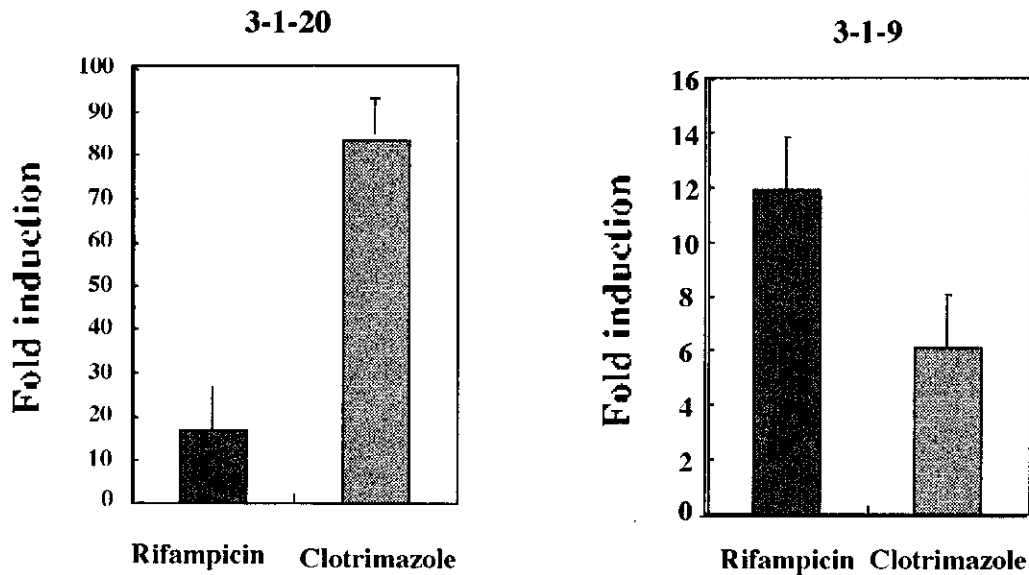


Fig. 3 Isolation of cell clones responded for inducers

6) 肝臓の有機アニオン系薬物の経細胞輸送モデルとして、極性を有する MDCK II 細胞を用いて、肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する OATP2 (organic anion transporting polypeptide 2) を basal 側に、MRP2 (multidrug resistance associated protein 2) を apical 側に発現した double-transfectant を構築した。17 β -estradiol 17 β -D-glucuronide(E₂17 β G), leukotriene C₄, pravastatin, の経細胞輸送を検討した結果、control 細胞や OATP2 や MRP2 の単独発現系ではみられず、basal から apical 方向への有意な方向性輸送が double transfectant においてのみ観察された。Cerivastatin は OATP2/MRP2 double transfectant において basal から apical への方向性のある輸送が観察され、cerivastatin が、OATP2 と MRP2 の両方の基質となることが示唆された (Fig. 4)。

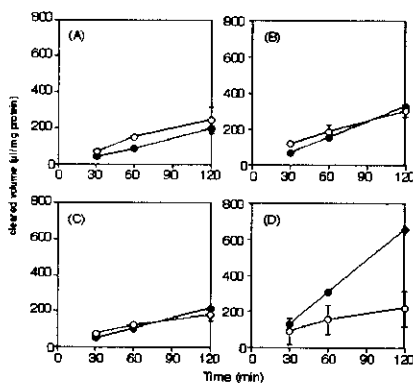


Fig. 4 Transcellular transport of [¹⁴C]CER across the control MDCK II cells (A), MDCK II cells expressing OATP2 (B), MRP2(C), and both OATP2 and MRP2 (D). Open and closed circles represent the transcellular transport in the apical-to-basal and basal-to-apical directions, respectively. (n=3, mean \pm S.E.)

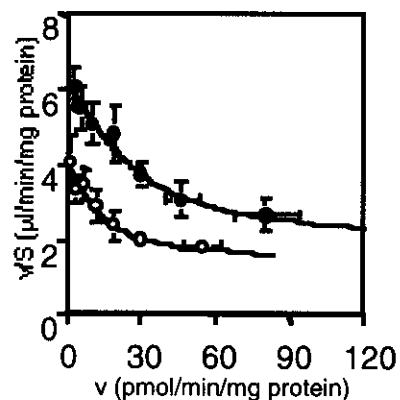


Fig. 5 Eadie-Hofstee plots of the transcellular transport of [¹⁴C]CER across MDCK II monolayers expressing OATP2 (open circle), and both OATP2 and MRP2(closed circle), studied for 2hr in the presence and absence of unlabelled CER at 37°C. The solid lines represent the fitted line. (n=2, mean \pm S.E.)

次いで、OATP2 単独発現系および double transfectant における経細胞輸送の定常状態 flux の飽和性を観察した結果、Eadie-Hofstee plot の結果から、見かけ上 one-saturable one-nonsaturable な fitting ができることが分かった (Fig. 5)。トランスポーターを介した薬物間相互作用は、ラット遊離肝細胞への cerivastatin 取り込みに対する Cyclosporin A の影響を検討した結果、ラット遊離肝細胞への CER の取り込みに対する CsA の影響を見たところ、 $K_i=0.2 \mu\text{M}$ で阻害することがわかった。Incubation buffer の 90%をラット血漿と置換した生理的条件に近い系で行った実験でも、 $K_i=2\mu\text{M}$ で阻害が見られた。同種の実験を凍結ヒト肝細胞を用いて行ったところ、ラットとほぼ同程度の阻害定数で、CsA が CER の取り込みを阻害することがわかった。一方、ラット凍結肝細胞を用い、 $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -glucuronide ($E_217\beta\text{G}$)と、アニオン系化合物 $[^{14}\text{C}]$ P-001(P-001)の取り込み活性を評価した。SD 系雄性ラットから採取した凍結肝細胞を異なる 3 社から購入し、薬物取り込み活性を評価した結果、B 社の細胞は生存率が低く、細胞数が不足したため取り込み実験を行うことが出来なかった。C 社の細胞は生存率が高く、またその取り込みクリアランスは fresh な細胞における結果とほぼ一致した。A 社の細胞の生存率は幾分低く、取り込みクリアランスは fresh な細胞の約 30%まで減少していた (Table 1)。C 社の細胞を用いて P-001 の取り込み活性について検討を行ったところ、取り込み活性は $E_217\beta\text{G}$ に比較して低いものであり、取り込みクリアランスとして $2\sim 3 \text{ l/min}/10^6 \text{ viable cells}$ 程度であった (Table 2)。これに対して、ラットに P-001 を静脈内投与後の肝取り込みクリアランスは約 $3 \text{ l/min}/10^6 \text{ cells}$ となった。

Table 1. 新鮮な肝細胞と凍結肝細胞との違い ($E_217\beta\text{G}$: 0.1 M)

company	viability (%)	uptake clearance ($\mu\text{l}/\text{min}/10^6 \text{ viable cells}$)
fresh	62%	1797 14
A	47%	55.17 1.4
B	23%	n.d.
C	81%	1427 12

Table 2. P-001 の取り込み活性

company	viability (%)	concentration (μM)	uptake clearance ($\mu\text{l}/\text{min}/10^6 \text{ viable cells}$)
C	81%	20	1.7357 0.329
		120	2.7937 0.395

4. 考察

本研究において、*in vitro* でのヒト肝ミクロソーム画分、ヒト肝上清画分いずれもが FT および 5-DFUR の代謝活性化に寄与し、5-FU を生成することが示された。5-DFUR は FT に比し、数倍速く活性化された。12 人の白人由来ヒトサンプルを用いて検討した結果、ミクロソーム画分では、FT、5-DFUR から 5-FU への変換活性は、それぞれ約 18 倍、約 16 倍の個体差が認められ、上清画分では、約 5 倍、約 2 倍の個体差が認められた。上清画分の変換活性に肝の thymidine phosphorylase (dThdPase) 様酵素の関与が示され、5-DFUR は腫瘍組織内以外に、肝における活性化も重要であると考えられた。35 種のヒト肝ミクロソーム及び 21 種の上清画分による 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性を検討したところ、25、5.8 及び 24 倍の個体差が認められた。この個体差は EE_2 をヒトに経口投与後の血漿中濃度の個体差 (10~15 倍) に匹敵しており、各個体における EE_2 の全身クリアランス及び代謝経路は、主に 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性の総和及びそれらの相対比により決定されるものと推察された。また、各個体のヒト肝ミクロソーム

による 2-水酸化活性に対して、CYP3A4 阻害剤である ketoconazole により 17.8~78.0%阻害され、その阻害には 4.4 倍の個体差が認められた。この結果より、2-水酸化反応における CYP3A4 の寄与においても個体差があることが示された。

ビーグルイヌを用いて、*in vivo* 投与時の CYP 誘導と、*in vitro* イヌ培養肝細胞系での CYP 誘導について比較検討した。Rifampicin による CYP3A 誘導と Omeprazole による CYP1A2 の誘導はヒトでは惹起されるものの、げっ歯類では発生せず CYP 誘導における種差の代表例とされてきたが、今回、ビーグルイヌがヒトと同様の CYP 誘導パターンを示したことから、ヒト肝 CYP の誘導能評価予測動物種としてビーグルイヌがげっ歯類に比べ有用であることが確認された。また、*in vivo* のみならず *in vitro* 培養肝細胞系においても同様の CYP 誘導パターンが検出された点は、*in vitro* の CYP 誘導能試験結果から *in vivo* の結果を定量的に予測する方法の確立に応用できるモデルとしても期待できる。また、甲状腺肥大を予測する *in vitro* 試験系として、CS-722 をモデル化合物とし、*p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性を甲状腺ホルモン代謝活性 (UGT1A 活性) のサロゲートとして用い、ラットおよびサル肝細胞における誘導能を検討した結果、*p*-ニトロフェノールを基質とし、凍結肝細胞を用いた UGT1A 誘導 *in vitro* 評価系は、*in vivo* における甲状腺ホルモン代謝の亢進を予測し得ると考えられた。すなわち前臨床試験における各種動物の *in vivo* および *in vitro* 試験結果から、ヒトにおける甲状腺肥大の予測も可能である。このような意味で、霊長類であるサルの肝細胞は、ヒトにおける酵素誘導を予測する上でも有用なツールになり得ると考えられた。

ヒト CYP3A4 の遺伝子上流域(-362~+11bp および-7kbp 付近)とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルス(AdCYP3A4-362 および AdCYP3A4-362-7k)を用いたレポーターアッセイ系を構築し、恒常的に CYP3A4 誘導が検出可能な、誘導様相の異なる複数のクローンを単離した。これらのクローンは、CYP3A4 誘導のスクリーニング系としては、使用可能と考えられる。しかし、今後、ヒト肝初代培養細胞との比較、及び異なった複数のグループ間での再現性比較等の実験を行う必要がある。また、本研究で報告した方法が、96well を用いてスクリーニング可能であれば、ハイプットスクリーニング系としても応用可能と考えられる。

肝臓の有機アニオン系薬物の経細胞輸送モデルとして、極性を有する MDCK II 細胞を用いて、肝特異的な発現を示し広範な基質特異性を有する OATP2 を basal 側に、MRP2 を apical 側に発現した double-transfectant を構築した。この double-transfectant において、種々の有機アニオン化合物の経細胞輸送の検討を行った結果、basal から apical 方向への有意な方向性輸送が double transfectant においてのみ観察され、今後、ヒト肝臓のそれぞれのトランスポーターの発現量を比較する必要があるが、この実験系は少なくともヒト肝臓における経細胞輸送を定性的に反映する系としては有用であり、トランスポーターの輸送評価の high throughput screening 系として使いうことが示唆された。OATP2 単独発現系および double transfectant における経細胞輸送の定常状態 flux の飽和性を観察した結果、Eadie-Hofstee plot の結果から、見かけ上 one-saturable one-nonsaturable な fitting ができるとことが分かり、その K_m は、いずれも同様の値を示し、 V_{max} は、double transfectant の値が OATP2 単独発現系の値の約 2 倍程度となった。一方、理論的考察により、経細胞輸送の定常状態 flux の saturation kinetics は、取り込みトランスポーターの K_m , V_{max} に強く依存する場合とそうでない場合があることがわかった。トランスポーターを介した薬物間相互作用はラット遊離肝細胞への cerivastatin(CER)取り込みに対する、Cyclosporin A(CsA)の影響を検討した結果、ラット遊離肝細胞への CER の取り込みに対する CsA の影響を見たところ、 $K_i=0.2 \mu\text{M}$ で阻害することがわかった。この *in vitro* 実験で得られた結果から、*in vivo* での阻害を定量的に説明することが可能であることから、ラットにおける相互作用は肝臓への取り込み過程での阻害で説明できることが示唆された。同種の実験を凍結ヒト肝細胞を用いて行ったところ、ラットとほぼ同程度の阻害定数で、CsA が CER の取り込みを阻害することがわかり、ヒトにおける薬物間相互作用についても、肝への取り込み過程での阻害が原因の一つである可能性があることが示唆された。一方、ラット凍結肝細胞を用い、 $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -glucuronide($\text{E}_217\beta\text{G}$) と、アニオン系化合物 $[^{14}\text{C}]$ P-001(P-001)の取り込み活性を評価した結果、生存率の高い肝細胞を用いることにより、fresh な肝細胞を用いた場合と同様の結果を得ることが出来ることが明らかとなった。さらに、P-001 の取り込み実験の結果より、ラット凍結肝細胞における取り込みクリアランスは 2~3 $1/\text{min}/10^6$ viable cells 程度であり、これに対して、

ラットに P-001 を静脈内投与後の肝取り込みクリアランスは約 $3 \text{ l/min}/10^6 \text{ cells}$ となり、*in vivo* における肝取り込みクリアランスが凍結肝細胞を用いた実験より予測できることが示された。

5. まとめ

FT、5-DFUR は 5-FU のプロドラッグであり、主に、胃がん、大腸がんなどの消化器がんなどの治療に応用されてきたが、本薬の肝を中心とした代謝についての詳細は、十分には明らかにはされていなかった。本研究において *in vitro* でのヒト肝ミクロソーム画分、ヒト肝上清画分いずれもが FT および 5-DFUR の代謝活性化に寄与し、5-FU を生成することが示された。12 人の白人由来ヒトサンプルを用いて検討した結果、FT、5-DFUR から 5-FU への変換活性は、ミクロソーム画分では、約 18 倍、約 16 倍の個体差、上清画分では、約 5 倍、約 2 倍の個体差が認められた。FT、5-DFUR からの 5-FU への変換活性に肝ミクロソーム CYP2A6 および上清画分 thymidine phosphorylase (dThdPase) 様酵素の寄与が示され、5-DFUR は腫瘍組織内以外に、肝における活性化も重要であると考えられた。また、 EE_2 の主要な一次代謝経路である 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合反応の個体差について検討した。CL_{int} は 3-硫酸抱合反応が最も大きい値を示した (3-硫酸抱合 > 2-水酸化 = 3-グルクロン酸抱合)。基質濃度 $0.1 \mu\text{mol/L}$ (K_m 値の $1/29$ 以下) で測定した 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性には 6~25 倍の個体差が観察された。したがって、各個体における EE_2 の全身クリアランス及び代謝経路は、主に 2-水酸化、3-硫酸抱合及び 3-グルクロン酸抱合活性の総和及びそれらの相対比により決定されるものと推察された。今回、ヒト細胞下画分による Tegafur, Doxifluridine, EE_2 の代謝能について検討し、代謝動態特性の個体間変動について明らかにした。この個体間変動について、ヒト体内動態に個体差があることが報告されている種々の薬物について更に代謝活性の個体差を明らかにすると共に、個体差の責任代謝酵素、背景因子について検討を進める必要がある。

イヌ肝細胞を用いて、各種誘導剤の影響を検討し、ヒトとの酵素誘導の差を検討した結果、ビーグルイヌの CYP1A, 3A 誘導能評価モデル動物としての有用性の一端を検証することが出来た。サル肝細胞を用いて、甲状腺肥大を予測する *in vitro* 試験系として、CS-722 をモデル化合物とし、*p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性を甲状腺ホルモン抱合酵素 UGT1A のサロゲートとして用い、この酵素活性の誘導能の有無をラットおよびサル肝細胞を用いて検討した。その結果、CS-722 の曝露により、ラット肝細胞の UGT1A 活性の上昇が確認された。一方、甲状腺肥大が認められなかったサルの肝細胞では、UGT1A 活性の上昇が認められなかったことから、肝細胞を用いた *in vitro* UGT1A 活性評価により、副作用としての甲状腺肥大を予測し得ることが示唆された。

ヒト型の *in vivo* 酵素誘導能試験系として、CYP3A4 の遺伝子上流域とルシフェラーゼ遺伝子を挿入した組換えアデノウイルスを用いたレポーターアッセイ系を構築し、恒常的細胞樹立の手法が確立した。CYP3A4 遺伝子の転写活性化に関わる PXR 以外の因子の同定を行うことも可能となった。今後、HepG2 細胞以外のヒト由来の培養細胞を使って恒常的に CYP3A4 誘導を見ることが可能な細胞株の樹立を行い、更に詳細な検討を進める予定である。

トランスポーター発現細胞などを用いた薬物輸送、排泄能力の予測に関する研究として、ヒト OATP2/MRP2 の double transfectant の構築、double transfectant における CER の経細胞輸送の速度論的解析、トランスポーターを介した取り込み過程で生じる薬物間相互作用のメカニズム解析を CER と CsA 間で進めた。ラット遊離肝細胞への CER の取り込みに対する CsA の影響を見たところ、 $K_i=0.2 \mu\text{M}$ で阻害し、ラットにおける相互作用は肝臓への取り込み過程での阻害で説明できることが示唆された。同種の実験を凍結ヒト肝細胞を用いて行ったところ、ラットとほぼ同程度の阻害定数で、CsA が CER の取り込みを阻害することがわかった。したがって、ヒトにおける薬物間相互作用についても、肝への取り込み過程での阻害が原因の一つである可能性があることが示唆された。しかしながら、*in vitro* で得られた結果から臨床での相互作用の程度を定量的に予測することはできておらず、阻害薬の CsA の血中濃度が腸肝循環によって門脈内で高くなっている可能性などについて、更に検討していくが必要があると考えられる。

6. 研究成果

1) Murayama, N., Sai, K., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Ozawa, S., Ohno, Y. and Sawada, J.: Expression of

- CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur. *Jpn. J. Cancer Res.* **92**, 524-528, 2001.
- 2) Ueda, K., Kato, Y., Komatsu, K. and Sugiyama, Y. Inhibition of the biliary excretion of methotrexate by probenecid in rats: Quantitative prediction of the interaction from in vitro data. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 1036-1043 (2001)
 - 3) Han, Y.-H., Kato, Y., Haramura, M., Ohta, M., Matsuoka, H. and Sugiyama, Y. Physicochemical parameters responsible for the affinity of methotrexate analogs for rat canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *Pharm. Res.* **18**, 579-586 (2001)
 - 4) Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T., Meier, P. J., Sekine, T., Endou, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Characterization of the efflux transport of estradiol 17 β -D-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 316-322 (2001)
 - 5) Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H. and Sugiyama, Y. Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 1179-1184 (2001)
 - 6) Sugiyama, D., Kusuhara, H., Shitara, Y., Abe, T. and Sugiyama, Y. Effect of 17 β estradiol-D-17 β -glucuronide (E217 β G) on the rat organic anion transporting polypeptide 2 (rOatp2)-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 220-3 (2002)
 - 7) Shitara, Y., Sugiyama, D., Kusuhara, H., Kato, Y., Abe, T., Meier, P. J., Itoh, T. and Sugiyama, Y. Comparative inhibitory effects of different compounds on rat Oatp1 (Slc21a1) - and Oatp2 (Slc21a5) - mediated transport. *Pharm. Res.*, accepted
 - 8) Sasaki, M., Suzuki, H., Ito, K., Abe, T. and Sugiyama, Y. Transcellular transport of organic anions across double-transfected MDCK II cell monolayer expressing both human organic anion transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J. Biol. Chem.* **277**, 6497-6503 (2002)
 - 9) Goto, Y., Kato, Y., Stieger, B., Meier, P. J. and Sugiyama, Y. Gender difference in the urinary excretion of estradiol 17 β -D-glucuronide in rats. *Am. J. Physiol.*, in press
 - 10) Horikawa, M., Kato, Y., Tyson, C. A. and Sugiyama, Y. The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: Probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab. Dispos.*, in press
 - 11) Nagata, Y., Kusuhara, H., Endou, H. and Sugiyama, Y. Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (Slc22a8) in the choroid plexus. *Mol. Pharmacol.*, accepted
 - 12) Hasegawa, M., Kusuhara, H., Sugiyama, D., Ito, K., Ueda, S., Endou, H. and Sugiyama, Y. Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOat3; Slc22a8) in the renal uptake of organic anions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press
 - 13) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1,2). *Drug Discov. Today* **6**, 150-156(1), 206-212 (2) (2001)
 - 14) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, kidney and brain. *J. Control. Rel.* **78**, 43-54 (2002)
 - 15) Kusuhara, H. and Sugiyama, Y. Drug-drug interactions involving the membrane transport process. In: "Drug-Drug Interactions" Ed. by A.D. Rodrigues. pp.123-188, 2001, Marcel Dekker, New York.
 - 16) 長谷川真綱、楠原洋之、鈴木洋史、杉山雄一 肝薬物代謝の最近の進歩：薬物の肝輸送機構. *肝臓* **42**, 281-287 (2001)
 - 17) 前田和哉、加藤将夫、杉山雄一 DDS と薬理動態. 特集「DDS の開発と臨床応用」 *分子がん治療* **2**, 205-214 (2001)
 - 18) 前田和哉、杉山雄一 薬物相互作用の予測. 特集「オーダーメイド医療：臨床応用への着実なアプローチ」 *Molecular Medicine* **38**, 1152-1163 (2001)
 - 19) 水野尚美、杉山雄一 トランスポーター研究の進歩：医薬品特性の至適化にむけて. 谷本学校 毒性質問箱：医薬品副作用予測の最前線 特集「21世紀の医薬品安全性評価の展望」pp.28-39 (2001), サイエンス出版社
 - 20) 佐々木 誠、鈴木洋史、阿部高明、杉山雄一 MDCK 細胞を用いた取り込みおよび排出輸送

担体 (OATP2, MRP2) 共発現系の構築 薬理と治療 29 (suppl.2), S-237-238 (2001)

21) 堀川雅人、加藤将夫、杉山雄一 胆汁排泄における相互作用の解析—肝胆管側膜ベシクルを用いた胆汁うっ滞の予測— 薬理と治療 29 (suppl.2), S-243-245 (2001)

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社