

## 医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・ 予測支援システムの構築とハイスループット試験系に ついての研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
研究者 頭金 正博

### 分担研究者

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| (1) 大塚製薬(株) 徳島研究所       | 宮本 剛八郎 |
| (2) 武田薬品工業(株) 薬物機能第一研究所 | 岩崎 正彦  |
| (3) 国立がんセンター中央病院内科      | 山本 昇   |

### 要旨

ヒト薬物代謝酵素の特性を解析するためにヒト CYP3A4 関連遺伝子を導入したマウスや培養細胞を用いる実験系を開発した。また、抗喘息薬や抗悪性腫瘍薬の服用患者での CYP1A2 および CYP3A4 による代謝能の個人差と薬理作用の関係を検討した。

### 1. 研究目的

ヒトでの薬物代謝酵素の活性には個人差が存在し、これが医薬品の体内動態に影響をおよぼすことによって、有効性や副作用発現の個人差につながることは広く認識されている。従って、個別の患者に最適な薬物療法を行うためには、ヒトでの薬物代謝の特性に影響を与える因子を解析し、個々の患者毎の薬物代謝能を予測することが重要になる。しかし、ヒトでの薬物代謝特性の解析には、実験手技および倫理的な面からの制約が多い。また、シトクロム P450(CYP)の特性には動物種差があることから、齧歯類をもちいた動物実験から得られた薬物代謝酵素の特性に関する情報をそのままヒトに外挿することはできない。以上の観点から、ヒトでの特徴的な薬物代謝能の変動をおこす修飾因子を解析し医薬品の薬効や副作用を予測する簡便な実験系の構築が求められている。そこで、本研究では細胞を用いた研究から臨床研究に至る種々のレベルでのヒト薬物代謝特性を解析する実験系を構築し、医薬品の適正使用に貢献することを目的とした。具体的には、多くの医薬品の代謝に関与し、種々の薬物によって誘導され薬物相互作用の原因となることが知られているヒト CYP3A4 の誘導能の特性を解析する実験系の構築をヒト遺伝子導入培養細胞やヒト遺伝子導入マウスを用いて試みた。また、比較的ヒトに類似した薬物代謝特性を示すカニクイザルから新たな CYP 分子種のクローニングを行いその酵素学的特徴を解析し、ヒト CYP の特徴と比較することによってカニクイザルのヒト薬物代謝モデルとしての有用性を検討した。さらに、ヒト肝臓中での含量に大きな個人差があることが知られている CYP1A2 と CYP3A4 に関して、抗喘息薬テオフィリンおよび抗悪性腫瘍薬ドセタキセルを服用している患者での薬物代謝能を測定する方法を開発し、薬物代謝特性の個人差と薬理作用の関係を検討した。

### 2. 研究方法

- (1) ヒト CYP3A4 誘導能を評価するためのレポーター遺伝子測定系の構築

CYP3A4 誘導能を評価するためのレポーター遺伝子の構築は CYP3A4 遺伝子の 5' -上流域の -362bp から +11bp

までを含む領域 (AdCYP3A4-362) と AdCYP3A4-362 に加えて-7836bp から-7208bp までを含む領域 (AdCYP3A4-362-7k) をそれぞれルシフェラーゼベクター (pGL3-Basic) に挿入し、組換えアデノウイルスを調製した。また、ヒト PXR を発現するための組換えアデノウイルス AdhPXR の作製はヒト PXR cDNA を用いて同様な方法に従って調製した。培養細胞を用いるレポーター遺伝子の転写活性の測定は CYP3A 誘導剤 (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、濃度: 10  $\mu$ M) を含む培地で 24 時間培養した細胞にレポーター遺伝子および hPXR 発現ウイルスを感染させ CYP3A 誘導剤の存在下に 48 時間培養を行った後、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。また、マウスにおけるレポーター遺伝子の転写活性の測定は、クロトリマゾールを ddY 系雄性マウスに 100 mg/kg の用量で 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与し、2 回目の CYP3A 誘導剤投与後 4 時間にウイルス液を腹腔内投与し、その 2 日後に肝臓を摘出し、肝臓ホモジネートの 9,000g 上清中のルシフェラーゼ活性を測定することによって行った。

### (2) ヒトでのテオフィリンおよびカフェイン代謝能の測定

本研究における臨床研究は国立公衆衛生院 (平成 13 年度)、東京慈恵会医科大学付属病院、共立薬科大学のそれぞれの研究倫理審査委員会の承認のもと被験者から文書による同意を得て実施した。長期的にテオフィリン徐放製剤 (テオドール) を、1 日 2 回、12 時間毎に服用している被験患者の血漿中テオフィリンおよび代謝物である 3-methylxanthine (3X)、1-methyluric acid (1U)、1,3-dimethyluric acid (13U) を HPLC 法にて測定した。また、健康人ボランティア 30 名から文書で同意を得た後、缶コーヒー 1 缶を摂取してもらい、缶コーヒー飲用後 4 時間後から 1 時間の蓄尿を行い、尿中のカフェインおよび代謝物の 1,7-dimethylxanthine (17X) と 1,7-dimethyluric acid (17U) を HPLC 法で測定した。

### (3) ヒトでのドセタキセル薬物動態解析

化学療法としてドセタキセル単剤投与を行う非小細胞肺癌患者において、(1) 肝 CYP3A4 活性とドセタキセルの薬物動態の検討、(2) ドセタキセル個別化投与量 vs. 固定投与量の比較試験、のいずれかの臨床試験に文章同意を得て登録した 89 例から各症例 10 ポイントの血中濃度採血を行い、薬物動態を解析した。ドセタキセル血漿中濃度は HPLC 法にて測定した。

### (4) カニクイザル肝臓で発現している新規 CYP 分子種のクローニングとサルとヒトにおける活性の比較

カニクイザルの肝初代細胞より、mRNA を抽出し RT-PCR によって薬物代謝酵素のクローニングを行った。CYP2C43 と CYP2C20 について基本的な性質を明らかにする目的で大腸菌を用い発現させ、ヒト型 CYP2C 分子種と酵素活性を比較した。

## 3. 研究成果

### (1) ヒト CYP3A4 誘導能を評価するためのレポーター遺伝子測定系の構築

ヒト CYP3A4 誘導能を評価するための 2 種類のレポーター遺伝子 (AdCYP3A4-362 および AdCYP3A4-362-7k) を組換えアデノウイルスを用いて作成した。CYP3A4 遺伝子の 5' -上流域の-362bp から+11bp までを含むレポーター遺伝子 (AdCYP3A4-362) と hPXR 発現ウイルス (AdhPXR) を同時に培養細胞に感染させて各種誘導剤による CYP3A4 遺伝子の転写活性化への影響を調べたところ、PXR の発現は HepG2 細胞におけるクロトリマゾールの転写活性化作用を増強した。他の細胞種に対しては有意な影響は与えなかった。また、AdCYP3A4-362 に加えて-7836bp から-7208bp までを含むレポーター遺伝子 (AdCYP3A4-362-7k) と AdhPXR を共に培養細胞に感染させた場合について検討した。その結果、HepG2 細胞ではデキサメサゾン、リファンピシンおよびクロトリマゾールのいずれの誘導剤処理によってもルシフェラーゼ活性の上昇が対照群に比べてそれぞれ約 3 倍、約 15 倍および約 60 倍高くなった。いずれの誘導剤でも AdhPXR の併用により転写活性化作用の増強が認められた。LS174T 細胞 (ヒト結腸腺癌由来細胞株) ではリファンピシンのみに CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認め

られ、AdhPXR の併用によって転写活性化作用が増強された。H4IIE 細胞(ラット肝癌由来細胞株)では AdCYP3A4-362-7k 単独投与ではデキサメサゾンとクロトリマゾール処理では誘導が認められたものの、リファンピシン処理では認められなかった。しかし、AdhPXR を併用することによって、未処理の転写活性が上昇したためにデキサメサゾン処理では見かけ上誘導率は低下したが、リファンピシン処理では CYP3A4 遺伝子の転写活性化が観察された。また、クロトリマゾール処理でも誘導の上昇が認められた。一方、AdCYP3A4-362-7k と AdhPXR とを同時にマウスに感染させて、ヒト PXR をマウス体内に発現させることにより、クロトリマゾールによる CYP3A4 遺伝子の転写活性化への影響を調べた。その結果、AdhPXR と AdCYP3A4-362-7k を同時感染させたマウスでは、クロトリマゾール処理によって肝臓内のルシフェラーゼ活性が対照群に比べて約 61 倍高くなった。対照として行った CAG-LacZ 発現ウイルス AxCALacZ と AdCYP3A4-362-7k の併用感染実験ではクロトリマゾール処理によるルシフェラーゼの活性上昇は約 16 倍であったことから、AdhPXR の併用による転写活性化作用の増強がマウスにおいても認められた。

### (2) ヒト CYP1A2 活性の個人間変動とテオフィリン代謝能の関係

CYP1A2 はテオフィリン(13X)から 3-methylxanthine(3X)への経路と 13X から 1-methylxanthine (1X)を生成し、xanthine oxidase により 1-methyluric acid(1U)を生成する経路に関与している。一方、1,3-dimethyluric acid(13U)は、CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 により生成する。そこで、テオフィリン服用患者でのテオフィリン代謝における CYP 各分子種の関与を明らかにするため、代謝能指標として血中テオフィリン濃度より  $CL_{10t}$  を計算し、併せて 4 つの指標、3X/13X、1U/13X、13U/13X、3X+1U/13X、3X+1U+13U/13X を測定した。その結果、CYP1A2 活性を示すと考えられる 3X/13X では個人差が認められたが、CYP1A2 以外の分子種が関与している代謝能を示している 13U/13X の値については 1 人を除いてほぼ一定の値を示し、大きな個人差は認められなかった。次に健常人での CYP1A2 代謝能の変動幅を評価するため、尿中のカフェイン代謝物を測定した。CYP1A2 活性の指標としてカフェイン(137X、未変化体)に対する代謝物 1,7-dimethylxanthine(17X)と 1,7-dimethyluric acid (17U)のモル濃度比(17X+17U/137X)を用い、被験者の尿中モル濃度比(17X+17U/137X)を算出した。その結果、被験者 31 人の結果を見るとかなりのばらつきがみられ、最低値は 7.40、最大値は 41.57 を示し、平均値は 26.50 であった。モル濃度比が 20 から 30 までの値を示す被験者が最も多く、全体の約 6 割を占めた。また、今回はカフェイン代謝能による性差は見られなかった。喫煙の有無に関しては、喫煙者の数も少なかったためか、喫煙者と非喫煙者との代謝能の間に有意差は見られなかった。

### (3) 抗悪性腫瘍剤ドセタキセルの薬物動態解析

本研究においては全 89 例が解析・評価可能であった。おもな患者背景としては、男性/女性：63/26、年齢中央値(range)：60 (32-76)、PS 0/1/2：10/73/6、腺癌/扁平上皮癌/その他：71/8/10、IIIA/IIIB/IV 期/術後再発：6/13/41/29、であった。放射線治療、化学療法の前治療を有する症例は各々 35、58 例で、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチンなどのプラチナ製剤を含む前治療を有する症例は 53 例であった。前化学療法レジメン数は 1 レジメンが 48 例と大半を占めた。ドセタキセル投与量は平均 59.4 (37.4-76.4) mg/m<sup>2</sup> であったが、63 例(71%)は 60mg/m<sup>2</sup> で投与された。主たる毒性は白血球減少・好中球減少であった。NCI-common toxicity criteria に基づく grade 3 以上の白血球減少は 49%の症例に認められたが、好中球減少は 84%と高頻度で、grade 4 は 55%に達した。Grade 4 の好中球減少をきたした症例の 71%には G-CSF 製剤が投与され、20%には発熱による抗生物質投与が行われた。毒性の頻度・程度については他の臨床試験結果に類似したものであった。なお、治療関連死は認められなかった。WHO criteria に基づいた抗腫瘍効果判定では、奏効率は 19.3%であった。種々の前治療歴を有する雑多な症例が登録されていたにもかかわらず、海外を含めた他の報告と比べ遜色ないものであった。ドセタキセルの血中濃度曲線は 2 相性に減衰し、平均半減期は  $t_{1/2\alpha}$ ：9.5

分、 $t_{1/2\beta}$ :6.0時間であった。AUCは $2.66\pm 0.58$  (mean $\pm$ SD) mg/L $\cdot$ hr, CV%:21.9%であり、CLは $23.2\pm 4.8$  L/hr/m<sup>2</sup>, CV%:20.6%で、バラツキは比較的小さいものであった。好中球減少率は sigmoid E-max model において AUC との良好な相関が認められた。GOT, AGP, 年齢, Albumin, 体表面積の 5 因子が、CL との間に良好な相関が認められた。89 例中、AUC の著明高値が 2 例 (5.21, 5.41mg/L $\cdot$ hr) 認められたが、2 症例に特徴的な患者背景因子は同定されなかった。抗腫瘍効果が得られた症例とそうでない症例における平均 AUC は各々 2.89, 2.61mg/L $\cdot$ hr であり、統計学的有意差は認められないものの (p=0.07)、治療効果獲得には十分な薬剤暴露の必要性が示唆された。

#### (4) カニクイザル肝臓で発現している新規 CYP 分子種のクローニングとサルとヒトにおける活性の比較

ザルはヒトと比較的類似した薬物動態を示すことが多いが、一方、サル薬物代謝酵素の詳細については不明な点が多い。そこで、カニクイザル初代培養肝細胞から、CYP 分子種のクローニングを行った。その結果、CYP2C ファミリーに属する cDNA を 2 種類得た。その中で CYP2C43 を大腸菌で発現させ代謝活性を測定したところ、CYP2C43 はヒト型の CYP2C8, 9, 19 に比べ、ステロイドホルモン代謝活性が高いことが明らかとなった。

#### 4. 考察・まとめ

直接的な手法を用いて測定することが困難なヒトにおける薬物代謝の特性を解析するために、培養細胞や実験動物を用いたレベル、さらには臨床レベルでの実験系の開発を目指した。

まず、培養細胞を用いて薬物によるヒト薬物代謝酵素の誘導を予測することができる評価系を開発するため、ヒト PXR を発現する組換えアデノウイルス AdhPXR を作製し、ヒト CYP3A4 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだ組換えアデノウイルスと併用する *in vitro* アッセイを構築した。このレポーター遺伝子と肝細胞由来の HepG2 細胞および H4IIE 細胞においては AdhPXR を使うことによって、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による誘導増強作用を観察することが可能となった。すなわち、ヒト PXR をラット細胞内に発現させることによってヒト型のリファンピシン誘導が確認できた。ヒト結腸由来の LS174T 細胞ではリファンピシンによる転写活性化がヒト PXR の発現によって増強された。*in vivo* アッセイ系において AdCYP3A4-362-7k と AdhPXR をマウスに投与し、クロトリマゾールによる CYP3A4 遺伝子の転写活性化への影響を調べると、肝臓内のルシフェラーゼ活性が対照ウイルスを投与した場合に比べて著しく高くなり、ヒト PXR 発現による転写活性化作用の増強が *in vitro* の場合と同様に *in vivo* においても確認された。ヒト PXR をマウス肝臓内に発現させることによって、*in vivo* においても効率の高い CYP3A4 誘導を見るのが可能となった。以上、薬物によるヒト薬物代謝酵素の誘導を予測することができる評価系として、アデノウイルスベクターを用いたレポーター遺伝子測定系を構築し、薬物の CYP3A4 遺伝子誘導能を解析した。

ヒトモデルとしてのカニクイザルの有用性を検討するため、カニクイザルの CYP2C の特性をヒトと比較した。今回クローン化されたカニクイザル CYP2C 分子種は、ヒトとアミノ酸配列の相同性は約 95% と高いにも関わらず、ヒト型とは異なる薬物代謝活性を示した。これらの結果は、ヒトへの外挿性について新たな情報を提供するものと考えられる。

患者での薬物代謝能を簡便にかつ安全に測定する方法を開発し、個人差や生理的・病理的状态等の因子に基づいて薬物代謝特性を予測するシステムを確立するため、抗喘息薬テオフィリンの服用患者での代謝能と CYP1A2 活性の個人差を測定した。テオフィリン服用患者での末梢血中の未変化体および代謝物のモル濃度比を測定しテオフィリン代謝能を評価したところ、CYP1A2 が関与すること知られている代謝過程には個人差が認められた。一方、CYP1A2 のみならず、CYP2E1 と CYP3A4 も代謝に関与している代謝過程には、大きな個人差はみられなかった。従って CYP2E1 と CYP3A4 の活性に個人差が少ないと考えられた。以上の結果から、テ

オフィリン代謝能は、CYP1A2 に依存した活性には個人差があるが、CYP2E1 や CYP3A4 に依存した活性には個人差は少ないと考えられた。カフェインは、ヒト CYP1A2 活性を *in vivo* で評価するためのプローブ薬として頻用されている。そこで、併用薬や病態の影響を受けない健康人での CYP1A2 活性の個人間変動についてカフェイン代謝を指標にして調べたところ、健康人においても CYP1A2 の代謝能にはかなりの個人差がみられることがわかった。以上をまとめると、ヒトでのカフェイン代謝や、テオフィリン服用患者での代謝能の測定結果からテオフィリンの代謝を行っている CYP1A2 の活性は他の CYP 分子種に比べて個人差が大きいことが示唆された。従って、CYP1A2 活性を予測することがテオフィリンの適正な使用にとって重要になると考えられる。

抗悪性腫瘍薬ドセタキセル服用患者での有害事象と薬物動態を解析した結果からドセタキセルは実地医療レベルにおいても十分に安全に投与可能であることが確認された。薬物動態については、海外を含めた他の報告に類似し、①抗悪性腫瘍薬の中ではバラツキは比較的小さいこと、②好中球減少は AUC に影響されること、③GOT, AGP, 年齢, Albumin, 体表面積が CL に影響すること、などが確認された。ごく一部(2%)の症例に特異な薬物動態が認められたが、今回検討した患者背景因子では説明不可能であった。ドセタキセルは CYP3A4 にて代謝されることが明らかにされており、代謝能の個体差を考慮した phenotype または genotype ベースの解析が必要と考えられた。治療効果獲得には十分な薬剤暴露の必要性が示唆され、投与量の個別設定など治療の個別化が必要と考えられた。

## 5. 研究発表

- (1) 頭金正博, Sinal, C., 宮田昌明, Gonzalez, F: 核内受容体 FXR/BAR による Cyp7a の発現調節機構 生化学 73, 2002
- (2) 頭金正博: LXR と FXR による脂質代謝制御 Molecular Medicine 39, , 2002.
- (3) Tohkin, M.: Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptor, FXR. 2<sup>nd</sup> Bone Frontier Seminar, 2002.
- (4) 秦聡美、頭金正博: ヒト末梢血液中の CYP 分子種の定量と薬物代謝能の評価 日本薬学会 121 回年会 札幌 2001
- (5) 頭金正博: 核内受容体による胆汁酸生合成の制御 第 2 回ホルモンと癌研究会 2001
- (6) Mitsuda, M., Iwasaki, M., Asahi, S. Expression and purification of recombinant monkey CYP2C isoform in *Esherichia Coli*. 14<sup>th</sup> International Symposium on Microsomal and Drug Oxidations 2002
- (7) 野崎 功, 難波正義: Human cytochrome P450 2E1 導入ヒト肝癌細胞株(HLE/2E1) の樹立とその性状. Tiss. Cult. Res. Commun. 20, 1-3, 2001
- (8) Fukaya, K., Asahi, S., Nagamori, S., Sakaguchi, M., Gao, C., Miyazaki, M. and Namba, M.: Establishment of a human hepatocyte line (OUMS-29) having CYP 1A1 and 1A2 activities from fetal liver tissue by transfection of SV40 LT. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 37, 266-269, 2001
- (9) Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M. and Asahi, S.: Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. Toxicol. In Vitro 15, 245-256, 2001
- (10) Inoue, Y., Miyazaki, M., Tsuji, T., Sakaguchi, M., Fukaya, K., Huh, N.H., and Namba, M.: Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4 $\alpha$ 2 gene. Int. J. Mol. Med. 8: 481-487, 2001

## 6. 知的所有権の取得状況

無し