

平成15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

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	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	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	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	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

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

研究要旨 抗癌剤 5-FU の薬物代謝能の個体差、遺伝的要因について検討した。サル及びイヌ初代培養肝細胞系を用いて、各種薬剤の薬物代謝誘導能を効率的に検出評価する試験系を確立した。トランスポーターの共発現系を確立し、肝クリアランス機構の多様性を示した。

分担研究者

- (1) 東北大学大学院薬学系研究科 薬物動態学分野
山添 康
- (2) 東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学
教室
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 丹羽俊朗
- (6) 大日本製薬(株) 薬物動態研究所 藤井敏彦

A. 研究目的

ヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法の構築と薬物動態における変動巾を規定する因子を解明するために、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などの薬物代謝能の個体差について検討するとともに、遺伝子多型との関連について検討する。2) 代謝酵素誘導能検索系として、サルおよびイヌ初代培養肝細胞を用いてヒトとの酵素誘導の差を検討し、各種薬剤の薬物代謝誘導能を効率的に検出評価する試験系を確立する。また、ヒト型の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確立する。3) 薬物の取り込み・排泄過程での個体差および薬物相互作用を検討する手段として、取り込み・排泄両トランスポーターを極性を維持して発現させた共発現系を構築し、速度論的解析を行い、*in vivo* における肝クリアランス全体を予測できる *in vitro* 実験系を確立する。

これらの研究を通じて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。

B. 研究方法

- 1) 代謝動態特性の個体間変動、遺伝子多型との関連についての研究

フッ化ピリミジン系薬物に対する樹立ヒト固形癌由来細胞株の薬剤感受性は、96穴マイクロタイタープレートを用いた細胞増殖阻害曲線により測定した。遺伝子多型との関連については、5-FU の作用点、チミジル酸合成酵素をコードする *TYMS* 遺伝子について、種々の繰り返し配列を有する DNA 断片を用いたサイトメガロウイルスプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子との間に挿入したベクターを構築し、レポーター活性の測定を Dual-Glo Luciferase Assay System を用いて行った。

5-FU dehydrogenase (DPD) については、¹⁴C 標識 5-FU をプールしたヒト肝可溶性画分又は 22 個体より調製された可溶性画分と反応させ、アルカリ処理後に生成する α -fluoro- β -alanine を TLC 分離し、BAS で解析することにより、DPD 活性を測定した。

2) 代謝酵素誘導能検索系についての研究

サルを用いた研究では、カニクイザル肝臓をコラゲナーゼを含む灌流液にて灌流して遊離肝細胞を調製し、HepatoZYME 培地(無血清、GIBCO)、Lanford's 培地(Long Term Culture 培地(BIOPREDIC)または Williams E (GIBCO)培地を用いて培養した。24時間毎に新しい誘導剤含有培地に交換し、72時間薬物暴露を行った。CYP3A 活性として testosterone 6 β 水酸化活性をまた CYP1A1/2 活性として 7-ethoxyresorufin 脱エチル化活性を測定した。CYP3A および CYP1A1/2 mRNA の定量は、サル培養肝細胞を誘導剤含有培地で一定時間培養後、total RNA を抽出した。サル CYP3A、CYP1A1/2、内部標準遺伝子 GAPDH 定量用に特別に設計された bDNA probe set を用い、基質(Lumi-Phos® Plus)に対する化学発光値を測定した。

イヌを用いた研究では、ビーグルイヌに rifampicin、 β -NF 又は omeprazole を1週間反復

経口投与した後、肝の一部を採取した。採取組織片から RNA を抽出し定量的 RT-PCR 法を用いて CYP1A1, 1A2 及び 3A12 の発現量を無処置のビーグルイヌから採取した肝と比較した。また、無処置イヌからコラゲナーゼ灌流法を用いて肝細胞を単離し初代培養した。培養肝細胞を上記 CYP 誘導剤による処理を行い、処理後の細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法を用いて CYP1A1, 1A2 及び 3A12 の発現量を評価し、in vivo における誘導状況との比較を実施した。

ヒト型の酵素誘導能試験系として、CYP3A4 の遺伝子上流域 (エンハンサー領域とプロモーター領域) を含むレポーターベクター (pCYP3A4-362-7.7k) をテンプレートとして、dNR1, proximal ER-6 に変異を持ったコンストラクト pCYP3A4m-362-7.7k, pCYP3A4-362-7.7km, pCYP3A4-362m-7.7km を作成した。また、dNR1 の mIE3A4 を欠失させた pCYP3A4-362-7.7k-mIE, mIE3A4 α および mIE3A4 β を含む領域を欠失した pCYP3A4-362-7.7k Δ -DR-4, mIE3A4 γ および mIE3A4 δ を含む領域を欠失させた pCYP3A4-362-7.7k Δ -DR-2 を作成した。これらのベクターを、ヒト肝臓癌由来培養細胞株 HepG2 細胞に、Cellfect Transfection kit を用いてリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は、Luciferase assay system (Promega を用いて測定した。

3) トランスポーターに関する研究

cerivastatin と gemfibrozil の薬物間相互作用メカニズムの解析については、CER の ³H 標識体ならびに非標識体を用いて、OATP2 遺伝子発現 MDCKII 細胞ならびにヒト凍結肝細胞による取り込み実験および gemfibrozil による肝取り込み過程の阻害を検討した。また、代謝阻害の影響を考慮するため、ヒト肝臓ミクロソームや代謝酵素発現系を用いた代謝阻害実験を行った。

OATP2/MDR1 共発現系の作製と、複数の共発現系を用いた肝排泄トランスポーターの寄与率評価のための検討は、OATP2/MRP2 共発現系に加え、OATP2/MDR1 共発現 MDCKII 細胞系を新たに構築した。肝排泄トランスポーター MDR1 を発現する MDCKII 細胞に、pEBV 系発現ベクターに OATP2 cDNA をサブクローニングしたものを導入して、Zeocin にてセレクションを行うことで、OATP2/MDR1 共発現系を構築した。共発現系の解析は、発現細胞をトランスウェル上にまき、標識および非標識化合物を含む buffer を片側に入れて incubation し、反対側の buffer を経時的にサンプリングすることで、経細胞輸送能力を評価した。

ヒト organic anion transporter (OAT2) の発現系については、ヒト Oat2 遺伝子をコードした cDNA を IMAGE Consortium より入手し、哺乳動物細胞への導入ベクターである pcDNA3.1 に組み込んだ。

作成した遺伝子導入ベクターを HEK-293 細胞に導入し、安定発現細胞の作製を目指した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト肝細胞下画分および cDNA は、市販 (GENTEST) もしくは複数名のプールされた臓器より単離されたもの (IMAGE Consortium 提供品) であり、提供者個人を特定する事は不可能である。よって、倫理面での問題はないと判断される。

C. 研究成果

1) 代謝動態特性の個体間変動、遺伝子多型との関連についての研究

74 株の日本人由来細胞株、および 70 名の 5-FU 投与患者に由来する TYMS 遺伝子 5' -非翻訳領域のくり返し配列数の多型を調べ、既知のくり返し数 2, 3g, 3c, 4, 5 型を確認した。固形癌由来細胞株 30 株を選定し、TYMS 遺伝子型と、フッ化ピリミジンに対する感受性との間の関連性を調べた。繰り返し数 2 回と 3 回を有する細胞について、5-FU および FUdR に対する感受性を比較したところ、Fig 1 に示すとおり、2 回繰り返しを少なくとも 1 つの対立遺伝子に有する細胞の方が、FUdR に対する感受性が有意に高いことが示された。繰り返し数 3 回を有する細胞について 5-FU および FUdR に対する感受性を比較したところ、FUdR については、3c 型の細胞は 3g 型に比べて感受性が高い傾向にあった。一方、5-FU ではそのような差は認められなかった。5'-非翻訳領域に存在する TYMS 繰り返し配列の差異が遺伝子の翻訳効率に及ぼす影響を調べるため、レポーター活性を、2 回繰り返し型、3 回繰り返し g 型、および 3 回繰り返し c 型について比較した。その結果、レポーター活性は 3 回繰り返しの g 型が最も高く、それに比較して、2 回繰り返し配列、3 回繰り返しの c 型は有意にレポーター活性が低かった。

22 個体のヒト肝可溶性画分による 5-FU DPD 活性には約 5 倍の個体差が認められた。また、性差及び年齢差は認められず、DPD 活性が欠損している個体は観察されなかった。

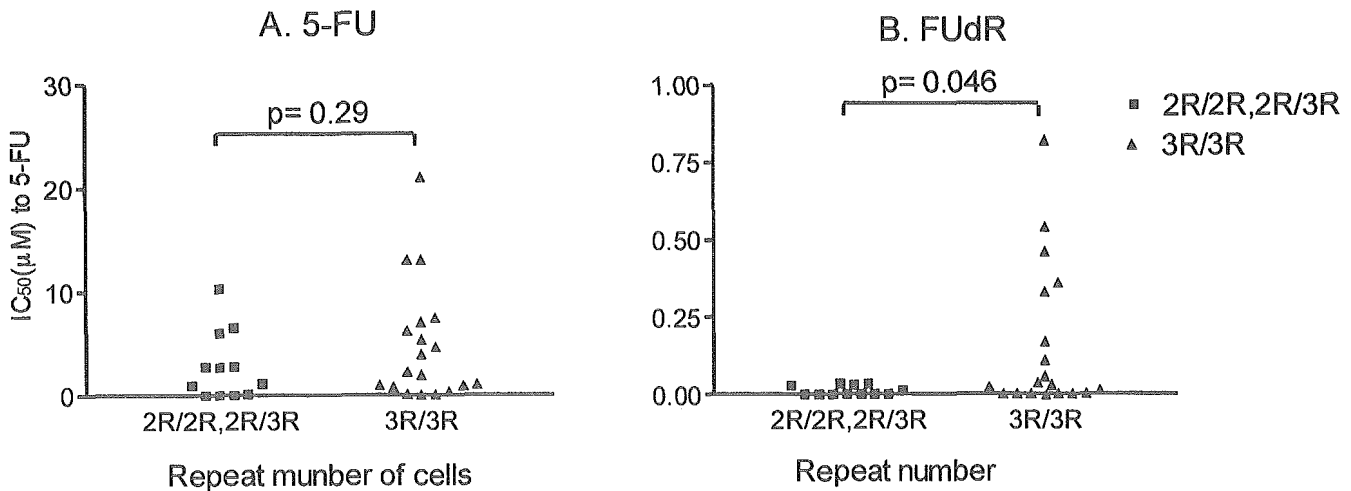


Fig1. 癌組織由来樹立細胞株の5-FUおよびFUdRに対する50%増殖抑制濃度(IC50)

2) 代謝酵素誘導能検索系についての研究

2-1) サル培養肝細胞における 酵素誘導

(Testosterone-6β水酸化活性) について検討した結果、用いる培地およびサルの個体によってコントロール値に大きなバラツキが認められたが、少なくとも rifampicin の濃度 10 μM において testosterone 6β水酸化活性の上昇が認められ、CYP3A の誘導が生じることが示された(Fig 2)。CYP3A 誘導 (CYP3A mRNA) については、両培地とも rifampicin 1 μM 以上の濃度で CYP3A の mRNA 濃度が増加すると思われた。サル培養肝細胞における CYP1A1/2 誘導(7-ethoxyresorufin 脱エチル化活性) について検討した結果、動物によって、薬物無添加時の活性 (コントロール活性) がばらつき、Lanford's 培地では 3 例の動物のうち 1 例、HepatoZYME では 3 例のうち 2 例で omeprazole による誘導が認められなかった。しかし、コントロール活性に対する比の平均値から判断した場合、omeprazole 50 μM で CYP1A1/2 活性を誘導する傾向があることが読みとれた。CYP1A1/2 誘導 (CYP1A1/2 mRNA) については、

個体によるバラツキが認められたが酵素活性値とほぼ一致した変動であり、酵素活性値で誘導の認められた例では mRNA の明らかな誘導が観察された。omeprazole 50 μM では両培地とも CYP1A1/2 が誘導される傾向が認められた。

2-2) イヌ培養肝細胞における酵素誘導

イヌを用いた研究では、ピーグルイヌに rifampicin, β-NF 又は omeprazole を 1 週間反復経口投与した結果、rifampicin 投与によって肝 CYP3A12 mRNA 量が特異的に約 8 倍増加した。β-NF 又は omeprazole 投与によって CYP1A2 の発現量が、それぞれ 9 倍及び 15 倍増加し、β-NF 投与時のみに CYP1A1 の発現増加(約 5 倍)が認められた。イヌ肝細胞を種々の CYP 誘導剤に 24 時間暴露させ、in vivo と同様に定量的 RT-PCR 法によって各種 CYP の mRNA 量の変動を評価した結果、rifampicin 処理によって濃度依存的に CYP3A12 mRNA 量が特異的に増加した。また、β-NF 又は omeprazole 処理によって CYP1A1 の発現量が 500 倍以上、CYP1A2 の発現量が 30 倍以上増加した。

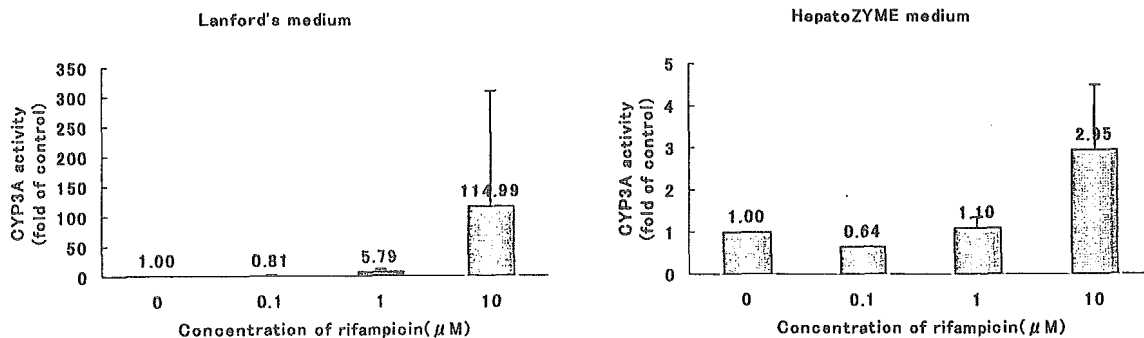


Fig 2 Testosterone 6β-hydroxylase activity in monkey hepatocytes after treatment with Rifampicin

2-3)リポーターアッセイ法によるヒト型酵素誘導試験系

HepG2 細胞にヒト CYP3A4 遺伝子の上流域を含むレポーターを組み込んだヒト型の酵素誘導能試験系について、rifampicin 添加による応答を各種の変異を施したコンストラクトを用いて検討した結果 (Fig 3)、野生型の場合は約 5 倍の誘導がかかったが、dNR1 に変異を持った pCYP3A4m-362-7.7k での応答はほとんど変化しなかった (4.6 倍)。proximal ER-6 に変異を持った pCYP3A4-362-7.7km ではその応答は減少し、弱い応答が認められるにとどまった (約 2 倍)。両者に変異を加えた pCYP3A4-362m-7.7km では rifampicin 添加による応答はわずかであった (1.6 倍以下)。次いで、clotrimazole 添加による応答について検討した結果、野生型では 15 倍程度の誘導が認められたが、pCYP3A4-362m-7.7k においては転写因子の過剰発現無しでも clotrimazole 添加による応答は極めて高かった (43.3 倍)。pCYP3A4-362-7.7km では rifampicin 添加による応答が大きく減少したのに対し、clotrimazole 添加では正常なコンストラクトと比べて応答の倍率は同程度であった (11.5 倍)。次に、mIE3A4 を欠失させた pCYP3A4-362-7.7k-mIE を用い、HepG2 細胞によるレポーターアッセイを行った結果 (Fig 4)、rifampicin 添加に対する応答は認められなかった。タンパク因子の結合が示唆された mIE3A4 $\alpha\beta$ または mIE3A4 $\gamma\delta$ を欠失させたコンストラクトを用いて解析を行ったところ、転写因子の過剰発現なしでは pCYP3A4-362-7.7k-DR-2 および pCYP3A4-362-7.7k-DR-4 のどちらも rifampicin に対する応答は認められなかった。一方、clotrimazole 添加では正常なコンストラクトと比較してレポーター活性の上昇は抑制されていたものの、消失には至らなかった。

3) トランスポーターに関する研究

cerivastatin と gemfibrozil の薬物間相互作用メカニズムの解析では、主な代謝物である gemfibrozil, gemfibrozil-M3, gemfibrozil-glucuronide の 3 物質に関して、阻害活性を測定した。まず、ヒト凍結肝細胞を用いて cerivastatin の取り込みに対する gemfibrozil および代謝物の阻害能を観察したところ、gemfibrozil そのものは、阻害定数 $K_i=72.5\mu\text{M}$ で取り込みの阻害がみられ、gemfibrozil-M3 はさらに低親和性の阻害しか見せなかったのに対し、gemfibrozil-glucuronide は、 $K_i=18.3\mu\text{M}$ と高親和性の阻害を観察した (Fig 5)。一方、ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害実験の結果、gemfibrozil-glucuronide は 3 分子種の中で最も強い阻害能を示した。さらに、cerivastatin が主に、CYP2C8, CYP3A4 により代謝されることから、次に、

recombinant CYP を用いた阻害実験を試みた。その結果、特に CYP2C8 において、gemfibrozil-glucuronide は $IC_{50}=3.46\mu\text{M}$ と高親和性の阻害を示した。さらに、血中蛋白非結合型分率を求めたところ、gemfibrozil, gemfibrozil-M3 と比較して、gemfibrozil-glucuronide は最も高い値 (0.115) を示したことから、体内で阻害に関わり得る free 濃度が最も高くなりうる分子種であることが推測された。

OATP2/MRP2, OATP2/MDR1 共発現系を用いて、各種物質の輸送を測定した結果、Estradiol-17 β -glucuronide は、元来 MRP2 の良好な基質であるとされていたが、OATP2/MDR1 においても、他の単独発現系と比較して有意に basal から apical 方向への輸送が観察されたことから、MRP2 のみならず、MDR1 の基質にもなることが明らかとなった (Fig 6)。一方、Estrone-3-sulfate は OATP2/MRP2, OATP2/MDR1 両発現系ともに大きな方向性ある輸送は観察されず、従って MRP2, MDR1 の良好な基質とならないことがわかった。また、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 2 種、pravastatin, cerivastatin について経細胞輸送を観察した。その結果、pravastatin は OATP2/MRP2 共発現系では有意な方向性ある輸送が観察されるものの、OATP2/MDR1 では輸送がみられなかった。一方、cerivastatin の方は、OATP2/MRP2, OATP2/MDR1 の両方の細胞において良好な経細胞輸送が観察されており、おなじ HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるにも関わらず、胆汁排泄に関わる分子メカニズムが異なる可能性が示唆された。

ヒト OAT2 (hOAT2) にはスプライスバリエーションと考えられる 2 種類の variant が存在する。2 種類の variant について、安定発現系の構築を目指したが、遺伝子導入細胞の作製には至らなかった。一方今回、報告にない 9 塩基挿入型 hOAT2 クローンを得、その遺伝子導入細胞の作製を行った。このクローンは、開始コドンから 658 塩基の後に「GTGAGGCAG」という 9 塩基が挿入されたものである。この部分についてゲノム配列を確認したところ、スプライシングを受ける部分であることが判明し、スプライスバリエーションの可能性が考えられた。なお、この 9 塩基挿入部位付近での SNP に関する報告は現時点ではない。また、本遺伝子導入細胞における [^{14}C]Salicylate に対する認識特性を検討したが、認識はされなかった。

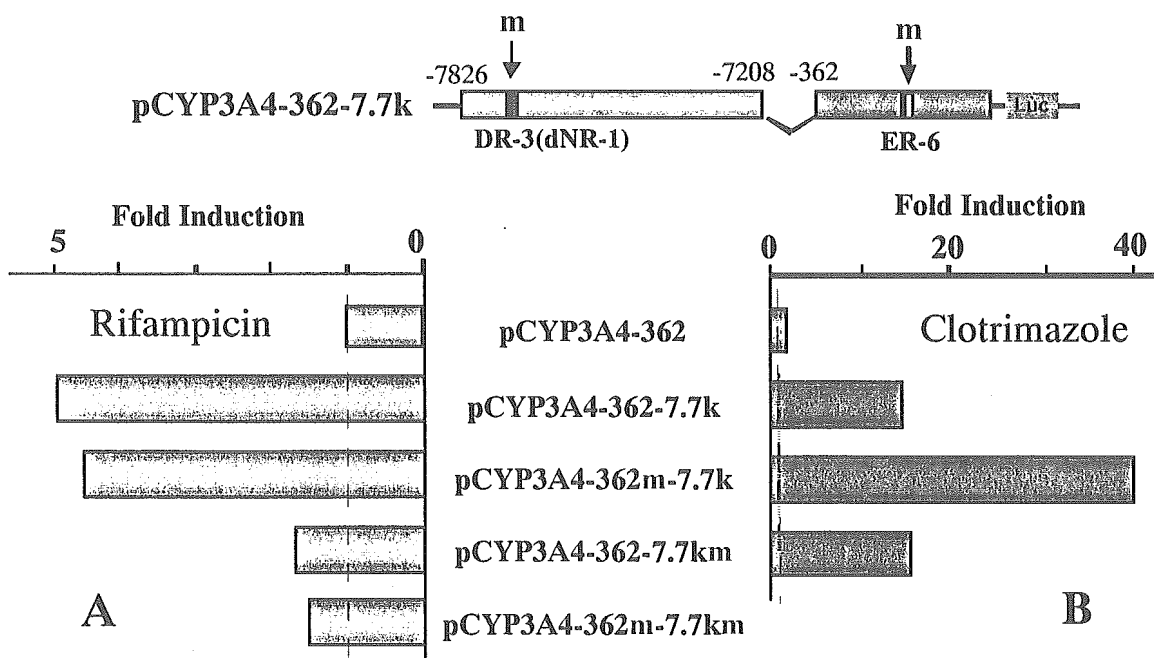


Fig 3 DR-3およびER-6への変異挿入によるCYP3A4誘導への影響

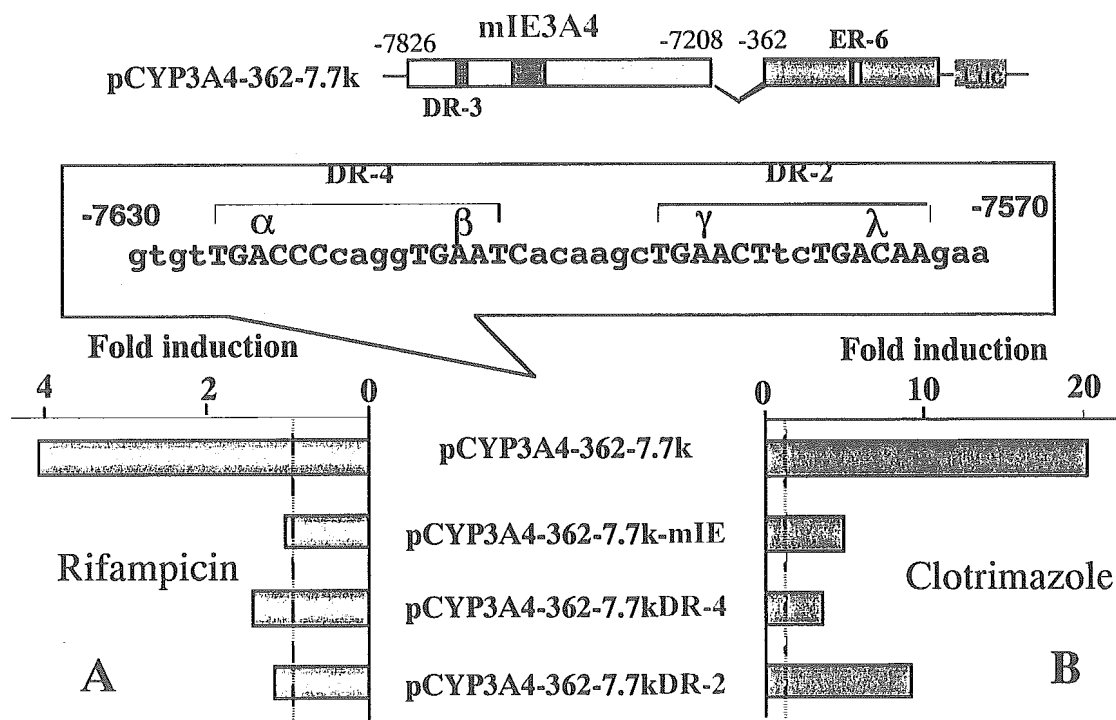


Fig 4 mIE3A4への欠損挿入によるCYP3A4誘導への影響

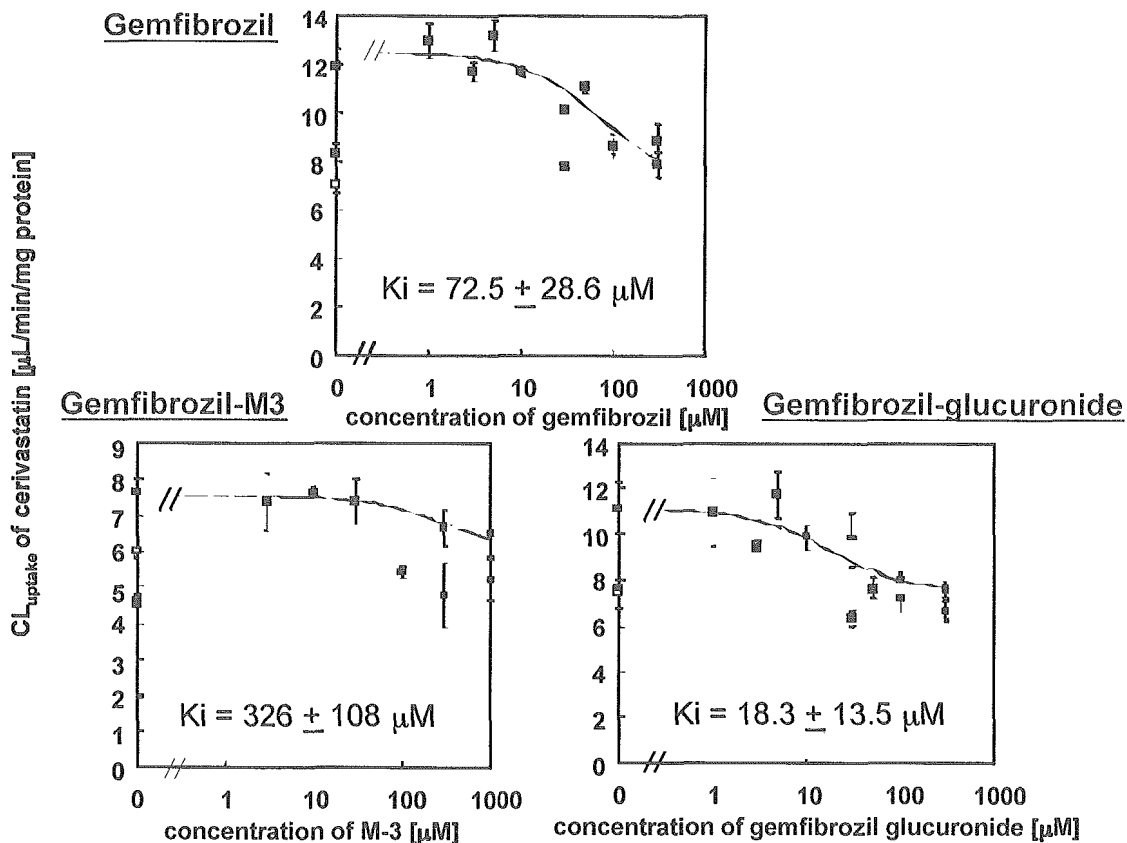


Fig 5 Inhibitory effect of gemfibrozil and its metabolites on OATP2-mediated uptake of cerivastatin.

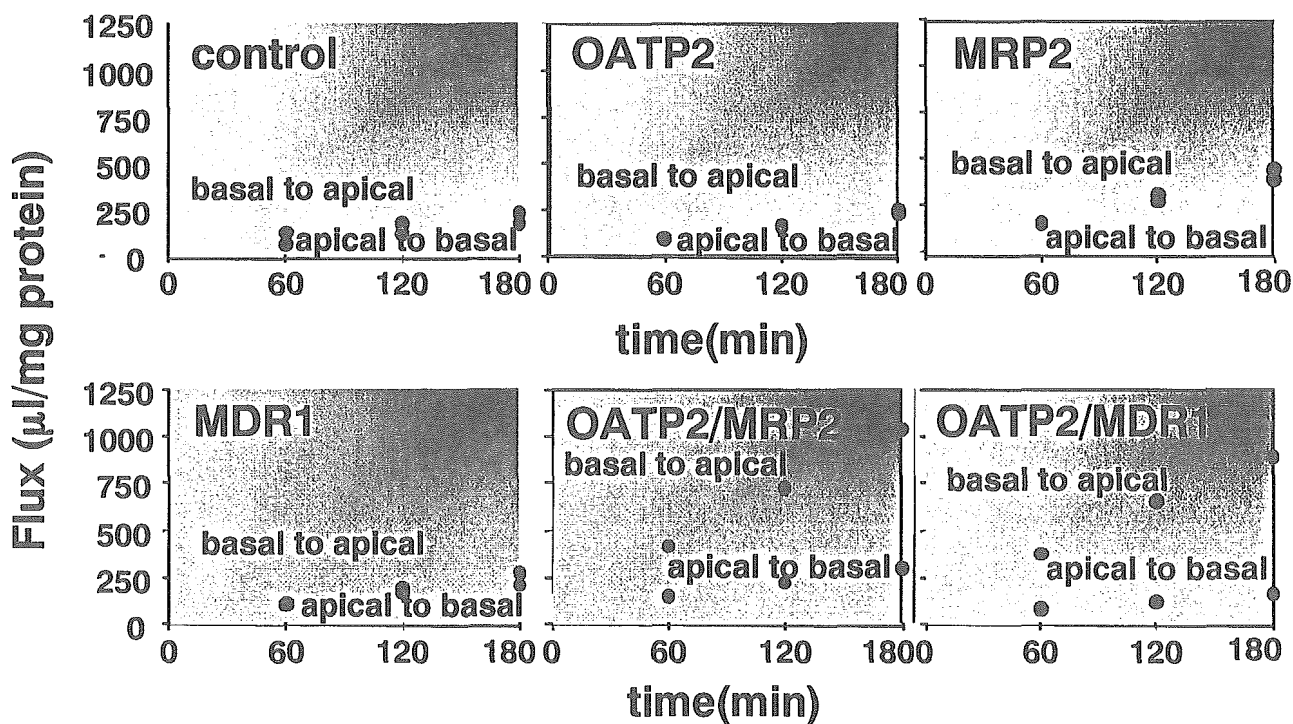


Fig 6 Time Profiles for the transcellular transport of cerivastatin

D. 考察

(1)代謝動態特性の個体間変動、遺伝子多型との関連についての研究

本研究では5-FUの主要な作用点であるTSをコードするTYMS遺伝子の発現量に関連すると想定される5'-非翻訳領域に焦点を絞り、本多型の判定を74株の日本人由来細胞株について行った。また、繰り返し配列の遺伝子発現に対する影響を調べるため、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析を行い、2, 3g, 3cの遺伝子発現への影響を評価したところ、発現量は3g>3c≈2の順であった。日本人で外科的に切除した癌組織を用いた研究から、繰り返し数3回の方が、繰り返し数2回よりもチミジル酸合成酵素の発現レベルが高いことが報告されている。また、別の研究グループより、in vitroで5-FUに長期暴露することによって作製した5-FU耐性細胞では、チミジル酸合成酵素のレベルが高いことが報告されている。報告者らが本研究で得た知見と、他の研究グループの報告を総合すると、3回繰り返し配列を示すTYMS遺伝子を有する細胞株がFUdRに対して感受性が低かったことは妥当な結果であると考えられた。また、臨床研究では、フッ化ピリミジンを含む化学療法は、TYMS遺伝子の繰り返し配列数が2である型を少なくとも一つ有する患者に奏功し、延命効果が認められたと報告されている。本研究では、FUdRについて、繰り返し数2回の遺伝子を少なくとも一つ有する細胞株の方が繰り返し数3回の遺伝子のみを有する細胞株より感受性が高かった。5-FUでも、そのような傾向が認められたが、統計的には有意ではなかった。フッ化ピリミジンによる延命効果が細胞増殖抑制を介して現れると仮定すれば、本研究の結果と臨床での結果が一致した傾向を示したと考えられた。FUdRに対する感受性とTYMS遺伝子型との関連は5-FUより明瞭であったことは、5-FUはジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD)で異化(分解)を受けることと、RNAに取り込まれる代謝経路があることで、細胞に暴露した5-FUのごく一部しか、チミジル酸合成酵素の阻害効果を発揮しないことを示すと考えられた。このように、5-FUの薬剤反応性因子として、チミジル酸合成酵素の他、DPD等も考えられる。DPDをコードする遺伝子DPYDにも遺伝子多型が存在することが示されている。今後、TYMS遺伝子型を判定した細胞について、DPD形質も考慮に入れて薬剤感受性機構を考察する必要がある。ヒト肝可溶性画分による5-FU DPD活性個体差については、文献的に報告されている5-FUのヒトにおけるクリアランスの個体間変動と同程度であったことより、ヒトにおける5-FUの薬物動態の個体間変動には、ヒト肝でのDPD活性の個体間変動が起因していることが示唆された。

(2)代謝酵素誘導能検索系についての研究

誘導に種差の存在が知られているCYP3Aに関し、培養カニクイザル肝細胞がrifampicinが10 μ Mの濃度でヒトと同様の誘導効果を示したことから、サル肝細胞はヒトにおけるCYP3A誘導を予測する上で有用なツールになり得ると考えられた。酵素誘導の評価にはtestosterone 6 β 水酸化活性とCYP3A mRNAレベルの両者で行うことが可能であった。また培養に用いる培地としてHepatoZYME培地およびLanford's培地を用いたところ、いずれも誘導が認められたが誘導倍率には違いが認められた。一方、CYP1A1/2についてはカニクイザル肝細胞のコントロール値にばらつきが認められ、一義的な誘導効果を判断するまでに至らなかったが、omeprazole 50 μ MではCYP1A1/2活性を誘導する傾向が認められた。この場合も酵素活性値(7-ethoxyresorufin 脱エチル化活性)とCYP1A1/2 mRNAレベルの間に相関する傾向が認められた。

イヌを用いた研究において、in vivoと同様の特異的なCYP mRNAの発現誘導がin vitro肝細胞培養系でも確認され、イヌ初代肝細胞培養系は、in vivoで認められる肝CYP誘導を的確に検出できる試験系と考えられる。しかも24時間という短時間の暴露で明瞭な誘導が認められたこと、さらに1個体から単離した肝細胞で多数の化合物を一度に評価することが可能であることから、医薬品開発における肝CYP誘導による問題回避を図る上で極めて有用なスクリーニング系になり得る。また、定量的RT-PCR法はマーカー酵素活性及びELISAでは分別が困難なCYP1A1と1A2の誘導の違いまで確認出来ることから、評価方法としての定量的RT-PCR法の有用性も検証できた。

レポーターアッセイを利用したヒト型の酵素誘導能試験系については、clotrimazoleとrifampicinとは異なる転写活性化の挙動が認められたことは、両薬物の作用機序が同一ではなく、そしてCYP3A4遺伝子の転写活性化には複数の作用点が存在する可能性、あるいはPXR以外の核内レセプターがCYP3A4遺伝子の転写活性化に関与している可能性を示唆している。Clotrimazoleはconstitutive androstan receptor (CAR)の転写活性化の機能を抑制する、いわゆるデアクチベーターであると報告されている。CARはCYP3A4遺伝子のproximal ER-6やdNR1に結合し転写活性化に関わることも報告されているが、mIE3A4に対しどのように機能するの点については今後の課題となるであろうと思われる。また、PXRをはじめとする転写因子間での相互作用、いわゆるクロストークについて解析する必要があるものと考えられる。

3) トランスポーターに関する研究

cerivastatinとgemfibrozilとの相互作用メカニズムを明らかにすべく、代謝酵素、トランスポーターの両面から検討を行った。gemfibrozilおよびそのグルクロン酸抱合体が肝取り込み及びCYP2C8

を介した代謝を阻害すること、臨床血中濃度では阻害し得ないことを明らかにした。しかしながら、gemfibrozil のグルクロン酸抱合体はラットにおいてはトランスポーターを介して肝に取り込まれ高濃度で肝内に存在することが報告されており、肝内に集積している gemfibrozil のグルクロン酸抱合体の濃度を考慮すると、この代謝物が細胞内で cerivastatin の代謝を阻害する可能性があることが明らかになった。一方で、gemfibrozil の主代謝物である M3 には取り込みおよび代謝のいずれに対しても、阻害活性がほとんどないことが明らかになった。おそらく今回の解析から、主に gemfibrozil のグルクロン酸抱合体による、トランスポーターの阻害ならびに CYP2C9 の阻害の両方に起因するものであると考えている。

一方、OATP2/MDR1 ならびに OATP2/MRP2 共発現系を用いて経細胞輸送解析を行った。元来、MRP2 は、有機アニオン系化合物の輸送にかかわり、MDR1 は、有機カチオンおよび中性化合物の輸送に関わるというような区分けがなされてきたが、今回の検討から、Estradiol-17 β -glucuronide や cerivastatin のような典型的な有機アニオン化合物が MDR1 にも良好に認識されることがわかったことは非常に興味深い。また、同じ HMG-CoA 還元酵素阻害薬である pravastatin と cerivastatin では、排泄経路に関わる分子が異なる可能性が本結果から示唆されており、両化合物において、トランスポーターの発現変動、SNPs が動態に与える影響が異なる可能性が示唆され、今後の検討が待たれる。

E. 結論

1) 代謝動態特性の個体間変動、遺伝子多型との関連についての研究

5-FU の作用点であるチミジル酸合成酵素をコードする TYMS 遺伝子の 5' -非翻訳領域に存在する 28 塩基対単位のくり返し配列について、日本人由来樹立培養細胞株を用いて検討し、2, 3, 4, 5 回繰り返しの配列が存在することを示した。また、3 回のくり返しを有する配列に g>c の一塩基多型を見出した。また、3 回繰り返しの配列をホモで有する細胞株は FuDR に対して 2 回繰り返しの配列を少なくとも 1 つ有する細胞に比べ、感受性が有意に低い。また、3 回繰り返しの g 型では TYMS 遺伝子の発現が高い。また、臨床研究で、3 回繰り返しの配列をホモで有する患者の癌組織はフッ化ピリミジンによる治療に抵抗性で、延命効果が低いと報告されている。フッ化ピリミジンによる延命効果が薬剤による細胞増殖抑制によると仮定すると、本研究結果は臨床研究の結果と一致していると考えられた。

22 個体のヒト肝可溶性画分による 5-FU DPD 活性には約 5 倍の個体間変動が認められた。この個体間変動の程度は文献的に報告されている 5-FU のヒトにおけるクリアランスの個体間変動と同程

度であり、5-FU の薬物動態の個体間変動には、ヒト肝での DPD 活性の個体間変動が起因していることが示唆された。

2) 代謝酵素誘導能検索系についての研究

ヒト肝細胞で CYP3A4 を誘導することが知られている rifampicin は、培養力ニクイザル肝細胞においても同様の誘導効果をもたらすことが明らかとなった。一方、CYP1A1/2 を誘導することが知られている omeprazole はサル肝細胞における誘導効果に個体によってばらつきが認められ、更なる検討が必要であると考えられた。しかし omeprazole 50 μ M の濃度では平均値として CYP1A1/2 を誘導する傾向があることが認められた。

ビーグルイヌにおいて、TaqMan ケミストリーを用いた定量的 RT-PCR 法により高感度に CYP 誘導を *in vitro* 肝細胞培養系で検出出来ることが検証できた。定量的 RT-PCR 法と *in vitro* 肝細胞培養系の組合せは医薬品開発を加速化する新たな肝 CYP 誘導能評価系として極めて有用性が高い。

ヒト型の酵素誘導能試験系において、clotrimazole と rifampicin とは異なる転写活性化の挙動が認められたことは、両薬物の作用機序が同一ではないこと、また、CYP3A4 遺伝子の転写活性化には複数の作用点が存在する可能性、あるいは PXR 以外の核内レセプターが CYP3A4 遺伝子の転写活性化に関与している可能性を示唆している。

3) トランスポーターに関する研究

cerivastatin と gemfibrozil との相互作用の分子メカニズムは、gemfibrozil の代謝物も考慮に入れて代謝・トランスポーターの両面から阻害活性を調べた結果、主に、gemfibrozil のグルクロン酸抱合体の、CYP2C9 代謝および肝取り込みトランスポーター OATP2 の阻害に起因するものであると考えられることがわかった。

OATP2/MDR1, OATP2/MRP2 共発現系をもちいることで、有機アニオン系化合物の胆汁排泄に関わるトランスポーターを簡便に同定する系を構築した。また、同じ HMG-CoA 還元酵素阻害薬でも、胆汁排泄ルートが異なる可能性を示唆し、今後、より定量的な寄与率の解析が必須である事を示した。

OAT2 については、今回、未知のスプライスバリエーションと考えられるクローンが得られ、その安定発現細胞の作製を行った。今後ヒト Oat2 遺伝子安定発現系の構築ができれば、遺伝子多型による機能変化を把握することは可能であり、アニオン系薬物の肝取り込み機構における個体差を含めた定量的な議論が可能となるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozawa S, Soyama A, Saeki M, Fukushima-Uesaka H, Itoda M, Koyano S, Sai K, Ohno Y, Saito, Y, and Sawada, J. Ethnic differences in

- genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As, and MDR1/ABCB1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, *in press*.
- 2) Takada T, Ogino M, Miyata M, Shimada M, Nagata K, and Yamazoe Y. Differences in transactivation between rat *CYP3A1* and human *CYP3A4* genes by human pregnane X receptor. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. *in press*
 - 3) Shitara Y, Li AP, Kato Y, Lu C, Ito K, Itoh T, Sugiyama Y. Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol-17 β -D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokin*, 18: 33-41, 2003
 - 4) 前田和哉、神原美由紀、平野雅、杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価. *Progress in Drug Delivery System XII*, pp.33-42, 2003
 - 5) 平野 雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATP ファミリーの関与—. *薬理と治療*, Vol.31, supplement, pp.S81-84, 2003
 - 6) 前田和哉、神原美由紀、杉山雄一、肝機能改善薬ウルソデオキシコール酸およびその抱合体の肝取り込み機構の解析. *薬理と治療*, Vol.31, supplement, pp.S85-88, 2003
 - 7) 杉山雄一、設楽悦久、加藤基浩、水野尚美 薬物動態特性の最適化戦略 (第 10 章) 「次世代ゲノム創薬」 日本薬学会 編 (編集代表: 杉山雄一) 中山書店, pp. 173-205, 2003
 - 8) Baba T, Touchi A, Ito K, Yamaguchi Y, Yamazoe Y, Ohno Y, Sugiyama Y, Effects of serum albumin and liver cytosol on CYP2C9- and CYP3A4-mediated drug metabolism. *Drug Metabol. Pharmacokin*. 17, 522-531 (2003)
 - 9) Niwa. T., Shiraga, T., Yamasaki S., Ishibashi K., Ohno Y., Kagayama A., In vitro activation of 7-benzyloxyresorufin O-debenzylolation and nifedipine oxidation in human liver microsomes. *Xenobiotica* 33, 717-729, 2003.
- ## 2. 学会発表
- 1) 八幡紋子、金秀良、久保崇、中島由起子、大野泰雄、松本宜明、福岡正道、小澤正吾、澤田純一 チミジル酸合成酵素遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) のくり返し配列多型. 日本薬学会第 123 年会 長崎 2003. 3
 - 2) 八幡紋子、金秀良、斎藤嘉朗、久保崇、中島由起子、香取典子、大野泰雄、松本宜明、小澤正吾、澤田純一 チミジル酸合成酵素遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) におけるくり返し配列多型. 日本薬学会第 124 年会 大阪 2004.3
 - 3) 前田和哉、神原美由紀、平野雅、杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価. 第 12 回 DDS カンファランス 静岡 2003.5
 - 4) 平野 雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATP ファミリーの関与—. 第 11 回肝病態生理研究会 福岡 2003.5
 - 5) 前田和哉、神原美由紀、杉山雄一、肝機能改善薬ウルソデオキシコール酸およびその抱合体の肝取り込み機構の解析. 第 11 回肝病態生理研究会 福岡 2003.5
 - 6) 前田和哉、神原美由紀、平野雅、杉山雄一 有機アニオン類の肝指向性を支配するトランスポーター OATP2, OATP8 の機能解析. 第 19 回日本 DDS 学会 京都 2003.6
 - 7) 平野 雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一、新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンの肝選択的な分布におけるトランスポーター、OATP ファミリーの関与. 第 19 回日本 DDS 学会 京都 2003.6
 - 8) Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama Functional Analysis of OATP2 (OATP-C/SLC21A6) and OATP8 (SLC21A8): Their contributions to hepatic uptake clearance. Gordon Conference (Drug Metabolism) New Hampshire, USA 2003.7
 - 9) Kazuya Maeda, Miyuki Kambara, Masaru Hirano and Yuichi Sugiyama, Evaluation of the contribution of organic anion transporting polypeptides (OATP) to overall hepatic uptake in the human liver. 12th North American ISSX Meeting Rhode Island, USA 2003.10
 - 10) 平野雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 ピタバスタチンの肝取り込み過程における OATP ファミリーの関与および寄与率の評価. 第 18 回日本薬物動態学会年会 札幌 2003.10
 - 11) 前田和哉、神原美由紀、杉山雄一 ヒト肝臓におけるウルソデオキシコール酸およびその抱合代謝物の取り込み機構の解明. 第 18 回日本薬物動態学会年会 札幌 2003.10
 - 12) 前田和哉、神原美由紀、杉山雄一 ウルソデオキシコール酸およびその抱合体の肝取り込みにおけるトランスポーターの関与およびその寄与の解明. 第 25 回胆汁酸研究会サテライトシンポジウム 旭川 2003.11
 - 13) 松島総一郎、前田和哉、設楽悦久、佐々木誠、

鈴木洋史、杉山雄一 cerivastatin の肝臓の膜透過過程における輸送機構の解明. 第 17 回日本実験動物代替法学会 神奈川 2003.11

14) 前田和哉、平野雅、神原美由紀、杉山雄一 ヒト肝臓の血中からの取り込みに関わる各トランスポーターの寄与率の評価法の検討. 日本薬学会関東支部第 28 回学術講演会 東京 2003.12

15) 松島総一郎、前田和哉、設楽悦久、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一 ヒト肝臓における膜透過過程を模倣したトランスポーター共発現系を用いた statin 類の経細胞輸送機構の解析. 日本薬学会関東支部第 28 回学術講演会 東京 2003.12

16) Kazuya Maeda, Masaru Hirano, Miyuki Kambara, and Yuichi Sugiyama, Strategies for evaluating the contribution of organic anion transporting polypeptide (OATP) family transporters to human hepatic uptake. MMT3D Tokyo 2004.2

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成15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16年9月30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